

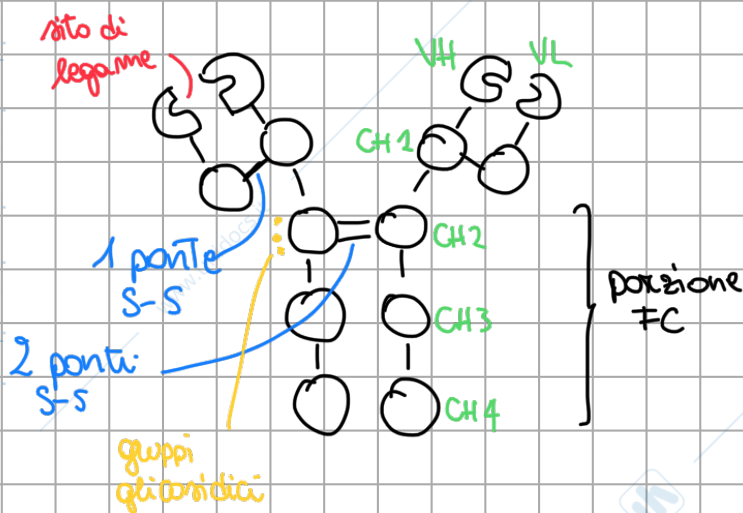
ANTICORPI RICOMBINANTI

- immunità UMORALE → produzione di anticorpi (linf. B)
- immunità CELLULO-MEDIATA → riconoscimento dell'antigene da parte dell'APC (linf. T)

LINFOCITI B: derivano dalle cellule staminali nel midollo osseo

- si differenziano in cellule circolanti e esprimono i recettori
 - possono differenziarsi in PLASMACELLE per la produzione di anticorpi
 - presentano un ampio reticolo endoplasmatico, per un'elevata sintesi proteica
- emivita: 2-3 settimane

ANTICORPO



- 2 catene pesanti (5 isoforme)
 - 2/3 domini costanti
 - = uguali anche se riconoscono antigeni diversi
 - 1 dominio variabile
 - = specifico per ogni antigene
- ogni dominio variabile è costituito da 3 domini ipervariabili

- 2 catene leggere (isotipi K e L)

Solo le IgM e IgE hanno l'extra dominio CH4

L'anticorpo riconosce una porzione dell'antigene detta EPITOPO

IgM = pentamero legato da catena J e ponti S-S

- hanno 10 siti di legame
- sono le prime ad essere prodotte
- bassa affinità di legame, ma alta avidità
- attivano il complemento per via classica

IgA = dimero unito da catena J e componente secretoria

- presenti nelle secrezioni mucose (saliva, reo, vagina, sudore)
- si legano a macrofagi e NK
- attivano il complemento

IgG = prodotte in risposta secondaria

- maggiore affinità di legame
- sono le più neutralizzanti:
 - fissano il complemento
 - si legano e attivano macrofagi e NK (metodo AGCC)
- capaci di attraversare la placenta

IgD = si trovano ancorate alla superficie del linf. B

- la regione cerniera è particolarmente lunga e tende ad essere tagliata, per questo motivo non sono circolanti.

IgE = reazioni allergiche

- concentrate sotto la cute, rappresentano la prima barriera di difesa in caso di ferite
- attraverso il fattore Fc si legano ai mastociti, ricchi di istamina, ad azione vasodilatatrice che favorisce la fuoriuscita di anticorpi
- ALLERGIE: sono dovute ad un'elevata affinità per alcuni antigeni, detti ALLERGENI, che producono una risposta immunitaria esagerata.

ISOTIPI : 5 diverse classi di Ig

ALLOTIPI : stessa classe di Ig, ma con alcuni alleli diversi

IDIOTIPI : diversa parte variabile, ma con siti di legame complementari.



In vita vengono prodotti 1-10 miliardi di anticorpi, ma l'uomo presenta solo 25 mila geni, quindi com'è possibile produrre così tante regioni variabili degli anticorpi?

⇒ ESPERIMENTO DI TONEGAWA

per dimostrare l'aver luogo di una ricombinazione genetica durante la maturazione del linfocita

DNA CELLULE STAMINALI

→ indifferenziato



digeriti con enzimi di restrizione



elettroforesi



prelievo frammenti di DNA



mRNA di anticorpi maturi (già ricombinato) marcato radioattivamente.



mise una sonda nelle provette per evidenziare il DNA maturo

radioattività su 2 blocchetti



su un singolo blocchetto

Ciò significa che dallo stato indifferenziato a quello maturo i due frammenti si uniscono a formare DNA maturo codificante per un anticorpo.

RIARRANGIAMENTO GENICO

i geni per le Ig nelle cell. staminali sono organizzati in BATTERIE

CATENE LEGGERE

i loci per K e λ si trovano su due cromosomi diversi:

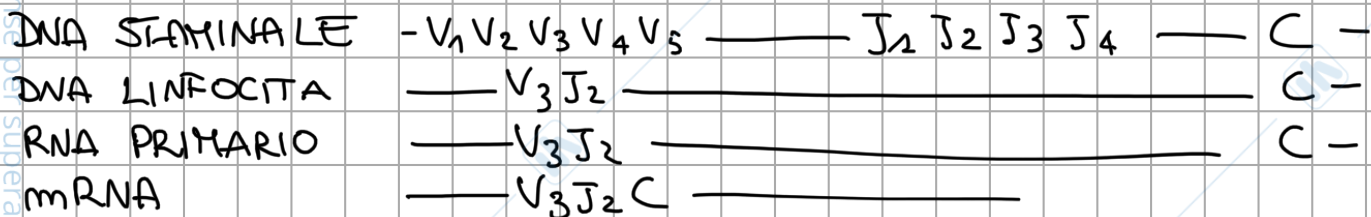
- K \rightarrow crom 2
- λ \rightarrow crom 22

batteria V
(variabile)

batteria J
(join)

gene C
(costante)

riarrangiamento : un frammento J tende ad unirsi ad un frammento V in modo casuale



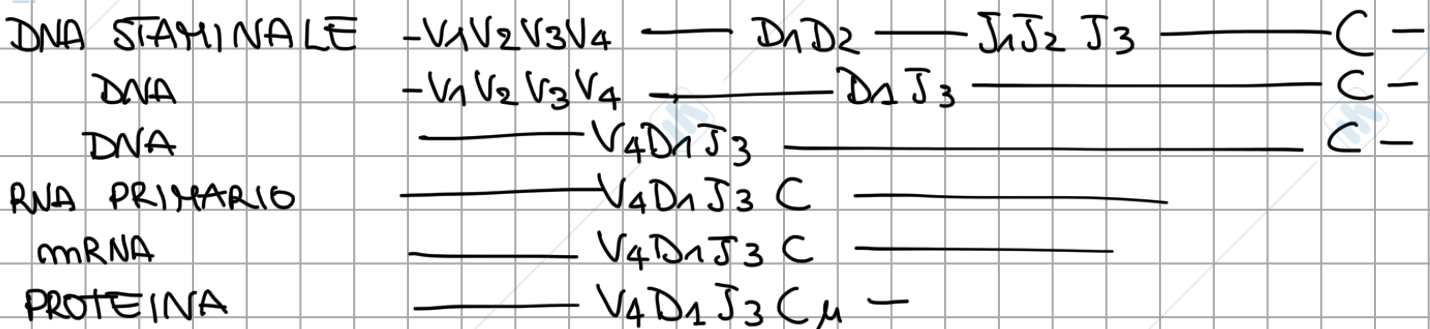
CATENE PESANTI : loci nel crom 14

batteria V

batteria D
(diversità)

batteria J

gene C
(contiene i 5 geni per le 5 classi)



il primo gene C è sempre il μ , per questo il primo anticorpo prodotto è sempre l'IgM.

GIUNZIONI IMPRECISE DEI SEGMENTI VDJ: non è detto che se si accoppiano due frammenti si ottiene sempre la stessa sequenza di AA, poiché può esserci una diversa sovrapposizione e formazione dei legami tra i frammenti

SISTEMA DI CONTROLLO DEL RIARRANGIAMENTO

→ mediante sequenze ripetute a monte o a valle dei frammenti, che saranno poi eliminate

CATENA LEGGERA:

- a valle dei frammenti V → eptamero - 12 pb - nonamero
- a monte dei frammenti: J → nonamero - 23 pb - eptamero

CATENA PESANTE:

- a valle di V → eptamero - 12 pb - nonamero
- D ha la seq. sia a monte che a valle:
nonamero - 12 pb - eptamero - D - eptamero - 12 pb - nonamero
- a monte di J → nonamero - 23 pb - eptamero

REGIONI VARIABILI

Composte da 3 REGIONI IPERVARIABILI:

CDR1 - CDR3 - CDR2

↳ sempre in mezzo, è la più variabile

- CDR1 e CDR2 sono già codificate a livello indifferenziato nella batteria V.
- CDR3 compare solo dopo la maturazione poiché si trova in una posizione a cavallo tra le seq. V, D e J

Tra le tre CDR vi sono delle regioni FRAME (1,2,3,4) e durante il folding delle proteine si associano in diverse conformazioni a formare il sito di legame complementare all'antigene

I geni non vengono espressi prima della ricombinazione grazie ad un sistema di regolazione trascrizionale: ogni frammento V ha un suo promotore, ma non viene trascritto poiché si trova distante dall'enhancer che è a valle.

Perciò durante la ricombinazione il frammento V si avvicina all'enhancer, favorendo la trascrizione.

I frammenti J non hanno promotore.

MATURAZIONE DELL'AFFINITÀ = mutazioni puntiformi casuali con successiva selezione di quegli anticorpi più affini

COMUTAZIONE DI CLASSE (in risposta secondaria): la combinazione VDJ con l'enhancer viene spostata (taglia e cuci) in un'altra posizione, codificando perciò per un altro isotipo. Il sito di legame rimane lo stesso.

ANTICORPI MONOCLONALI = derivano tutti dalla proliferazione di uno stesso anti-corpo, perciò riconoscono lo stesso epitopo.

Produzione di anticorpi monoclonali → **TECNICA DI KOHLER** :

- topo immunizzato con l'antigene d'interesse
- dopo Δ mese → richiamo → sviluppo IgG
- prelievo dei linfociti dalla milza
- fusione con cellule mieloidi tumorali
(queste cellule sono prive dell'enzima HGPRT, implicato nella via di recupero delle basi azotate)
- formazione dell'IBRIDOMA
- le cellule vengono messe in un terreno HAT, che contiene minopterina, inibitore della sintesi ex novo dei nucleotidi
- i linfociti della milza e le cellule non fuse non riescono a crescere nel terreno, vivono solo gli ibridomi perché anche se la minopterina inibisce la sintesi di nucleotidi, sono in grado di fare la via di recupero.
- infine vengono selezionati quelli specifici contro l'antigene

Problema ⇒ possibile rigetto, poiché riconosciuti come esogeni

PRODUZIONE DI ANTICORPI DA CELLE UMANE

pazienti guariti da covid → prelievo anticorpi
→ solo una parte sono neutralizzanti → verifica della specificità per l'epitopo

ADE: alcuni virus quando vengono legati da anticorpi sono in grado di entrare nelle cellule

strategia teropeptica → modificazione del frammento FC, che veniva sfruttato per l'ade, così da evitare l'ingresso del virus nelle cellule.

PRODUZIONE DI ANTICORPI DA PHAGE DISPLAY

caratteristiche del BATTERIOFAGO M13:

- fago filamentoso
- DNA a singolo filamento circolare
- capside - proteina P8
- proteina P3 → mediatore dell'infezione

ricompre i recettori sul polo sessuale del batterio, trasmette il suo genoma che viene trascritto e vengono assemblati i nuovi fagi

PEPTIDE: sequenza breve di aa, che può rappresentare una proteina o essere casuale

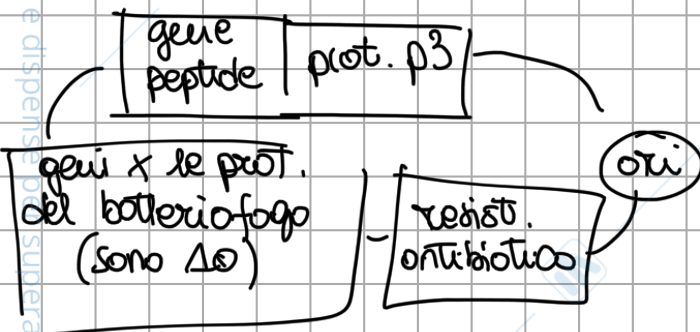
possono essere esposti su un batteriofago, in varie forme, principalmente sulla proteina P3 del capside

PHAGE DISPLAY = fusione di un peptide o un anti-corpo alla proteina p3, che può essere esposta su un batteriofago ricombinante.

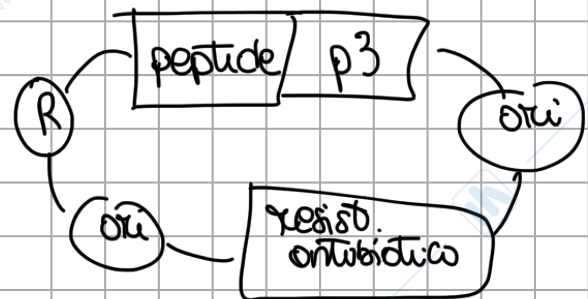
È necessario un vettore che farà codificare il peptide fuso alla prot. p3 così da collegare il fenotipo (esposizione peptide) al genotipo del virus.

2 tipi di vettore:

VEETTORE FAGICO



FAGEMIDE (plasmide)



mancono le altre 160 proteine, necessita di un fago helper che codifichi per queste.

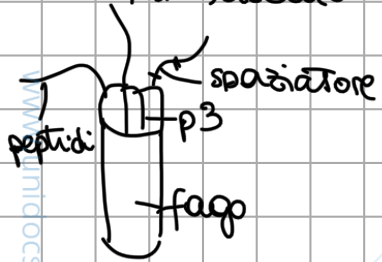
LIBRERIA FAGICA → tanti fagi che espongono peptidi diversi

formazione libreria:

- 1- sintesi del gene randomizzato e amplificazione con PCR
- 2- taglio e clonaggio
- 3- trasformazione di cellule batteriche
- 4- infezione delle cellule con fago helper

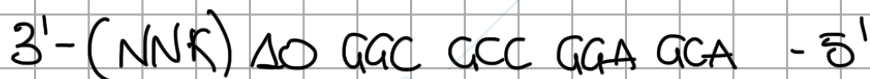
① legame tra p3 e peptide

- si inserisce un piccolo peptide spaziatore
- si usano aa semplici, come GLICINA e ALANINA



per creare i peptidi si utilizza il metodo del codice N_NK, ovvero i primi aa (N) possono essere casuali, mentre l'ultimo (K) deve essere G o T, così da diminuire la possibilità di formazione di un codice di stop.

i peptidi sintetizzati vengono amplificati tramite PCR. Posso usare gli stessi primer poiché all'inizio e alla fine sono tutti uguali.



② taglio le estremità dell'inserito con enzimi di restrizione e lo inserisco nel fagemide

③ inserisco il fagemide nella cellula batterica

④ infetto con un fago helper che permetterà di esprimere tutte le proteine virali

Perché questi fagi dovranno collegare il genotipo con il fenotipo, quindi nel fago deve esserci il gene per il peptide e non quello del fago helper, ma questo è possibile poiché il helper ha un'ori difettiva e si replica pochissimo.

Quindi la nuova progenie virale avrà la p3 che espone il peptide.

DIMENSIONI DELLE LIBRERIE FAGICHE: n° di particelle virali che espongono peptidi

VARIABILITÀ = possibili combinazioni di aa
→ 20^x

• 6 aa randomizzati = 20^6 N-XXXXXX-C

• 7 aa randomizzati = 20^7 N-XXXXXXXX-C

PANNING = tecnica per selezionare un peptide specifico

- provetta contenente bersaglio immobilizzato
- inserisco i peptidi della libreria
- si legano solo quelli specifici, lascio via gli altri
- per staccare quelli che si sono legati basta variare la forza ionica, pH, poiché si tratta di legami deboli.

ALTRO METODO:

- bersaglio libero in soluzione in forma biotinilata (ovvero legata alla BIOTINA che ha un'elevata affinità di legame per la STREPTAVIDINA)
- inserisco la libreria
- alcuni peptidi si legano
- inserisco delle sfere di ferro portanti streptavidina
- uso un magnete che attira la sfera con la biotina e il batteriofago
- infine rompo il legame S-S tra biotina e batteriofago

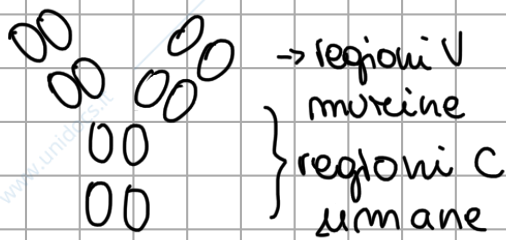
PANNING PER COMPETIZIONE:

Come prima, ma per staccare il batteriofago uso una molecola simile che prende il suo posto. Il competitore deve avere affinità al bersaglio maggiore del batteriofago.

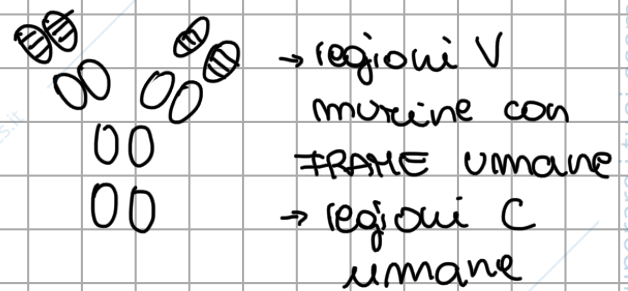
TEST ELISA : per capire quali sono i cloni positivi
 → faccio aderire i cloni al bersaglio → se specifico
 mi colora di blu

TECNICA PER UMANIZZARE ANTICORPI ANIMALI (Greg Winter)

ANTICORPO CHIMERICO



ANTICORPO UMANIZZATO



sCFV = single chain FV

composta solo dal sito di legame,
 senza porzione FC

LIBRERIE DI ANTICORPI

2 tipi : • NAÏVE → a partire da geni di linfociti circolanti,
 quindi la ricombinazione VDJ è già avvenuta

• SINTETICHE → a partire dalle linee germinali degli anticorpi umani, a cui vengono aggiunte mutazioni sito-specifiche, poiché non c'è ancora stata la ricombinazione e quindi non c'è il sito di legame

LIBRERIA ETH SINTETICA

il frammento DP 47 è il più espresso nei frammenti V della catena pesante e DP 22 nella catena leggera.

Al frammento V del DP 47 (due sono già espresse CDR1 e 2) si attacchiamo il CDR3 attraverso la PCR e lo randomizziamo (codice NNK)

Nel fagemide il gene per p3 e scFv sono già attaccati

→ si inserisce in mezzo un codone Amber (TAG) cod. di stop
 → nei ceppi batterici SupE di E. coli viene letto come
 ACIDO GLUTAMICO e quindi si procede con la trascr.
 → produzione di scFv sul fago

→ nei ceppi batterici non-SupE viene letto come codone di stop.

Q/D → produzione di scFv solubili

Per selezionare utilizzo ancora la tecnica del panning e poi FUSA, qui per essere riconosciuto dall'anticorpo secondario viene utilizzato il tag.

Q/D } tag

SPECIFICITÀ = capacità di un anticorpo di reagire esclusivamente con un singolo antigene e non con altri.
 Più antigeni riconosce più è bassa.
 La specificità è **INDIPENDENTE** dall'affinità.

AFFINITÀ = forza con cui il sito di legame di un anticorpo si lega all'antigene come valore termodinamico.
 È detta anche "affinità intrinseca".

AVIDITÀ = capacità legante dell'anticorpo e dipende dal numero di siti di legame.

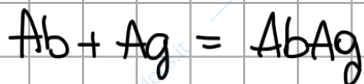
CALCOLO DELL'AFFINITÀ DI LEGAME

K_a = costante di affinità

K_d = costante di dissociazione

K_{off} = cinetica di dissociazione

K_{on} = cinetica di associazione → velocità con cui l'anticorpo lega l'antigene



$$K_d = \frac{[Ab][Ag]}{[AbAg]}$$

$$K_d = \frac{K_{off}}{K_{on}}$$

$$K_a = \frac{1}{K_d}$$

MATURAZIONE DELL'AFFINITÀ → dato che le regioni CDR3 conferiscono la specificità, non possono essere combinate, quindi avverranno mutazioni peritipiche su CDR1+2

PRODUZIONE DI UN FARMACO BIOTECNOLOGICO

1- INDIVIDUARE IL TARGET PATOLOGICO

2- GENERAZIONE DEL COMPOSTO PRINCIPALE (→ brevetto)

3- OTTIMIZZAZIONE DEL COMPOSTO (maturazione affinità)

4- FASE PRE-CLINICA: studio tossicità in vitro e in vivo (su 2 specie animali diverse) e messa a punto del processo produttivo

5- FASE CLINICA = trial clinico

· fase 1: volontari sani (non devono avere la malattia) per verificare la tossicità.

· fase 2: pazienti aventi la malattia per verificare l'efficacia del farmaco

· fase 3: aumento del numero di pazienti

6- COMMERCIALIZZAZIONE

ANGIOGENESI: nascita di nuovi vasi sanguigni che tendono a ramificarsi.

Le masse tumorali si creano vasi attorno a sé per alimentarsi e crescere mediante il fattore di crescita endoteliale VEGF e alcune proteine che degradano la matrice extracellulare per favorire la crescita. Intorno al vaso neoformato è presente la FIBRONECTINA.

ESPERIMENTO IN VIVO CON scFv: possibilità di marcare gli anticorpi.
scFv pesa circa 25 kDa (1/2 delle Ig)

→ il scFv può legarsi al dominio ED-B della fibronectina, senza però avere funzioni effettrici. Queste possono essere conferite attraverso il legame con altri complessi:

- IMMUNOCONIUGATI
- IMMUNOTOSSINE
- IMMUNOCITOCINE

• Vanno fatti degli studi di BIODISTRIBUZIONE, poiché anche se l'anticorpo è specifico per il tumore passando in circolo c'è il rischio che legni e attacchi donni agli altri vasi.

• Per gli esperimenti sui topi, se voglio inserirvi un tumore umano, è necessario immunosopprimere il topo tramite farmaci o privandolo del timo per evitare che il loro sistema immunitario lo uccida.

Procedo coniugando al scFv un TISSUE FACTOR che produce coaguli nel sangue, così da bloccare l'apporto di sangue e nutrienti al tumore.

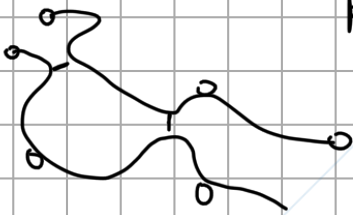
Altri usi dell'anticorpo anti-ED-B
 → malattie vascolari dell'occhio

utilizzo marcatori fotosensibilizzanti che se colpiti dalla luce genera un "OSSIGENO SINGOLETTO" che ha effetto tossico e quindi può eliminare il letto capillare che genera la malattia.

PEPTIDI

MAGIC BULLET: molecole capaci di bersagliare in modo specifico un determinato target

- HEMATIDE = si attacca al recettore dell'ERITROPOIETINA per la produzione di eritrociti.

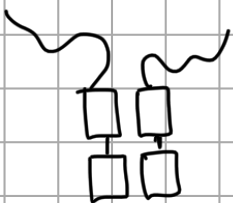


viene utilizzato nelle ANEMIE (sfruttato anche per il doping)


↳ dimero unito da ponti S-S

- se legato al PEG (poly etilen glicole) risulta molto biocompatibile, aumenta la solubilità e ne aumenta le dimensioni così da aumentare anche l'emivita.

- N-PLATE = stimola la produzione di piastrine



per aumentare l'emivita vengono aggiunti due frammenti FC.

- CALBITOR = peptide somministrabile Tab e quale
 utilizzato per l'angioedema non allergico

- Il problema dei peptidi come farmaci è che sono facilmente degradabili da enzimi
- Si possono usare ad in conformazione D così le peptidasi non li riconoscono
 - Facendo molecole ramificate, creando dimeri e trimeri

FARMACI DI PEPTIDI ANTIMICROBICI

La membrana batterica al contrario di quella eucariotica all'esterno è ricca di cariche negative.

QKKIRVRLSA (peptide M6) → KKIRVRLSA (peptide M33)

peptide anfipatico



non sempre venivano ottenuti buoni risultati, poiché la GLUTAMINA (G) interferiva sull'efficienza

molto + efficace!



usata su una molecola ramificata formando un tetramero

meccanismo d'azione = legame alla membrana esterna dei gram- che presentano il lipopolisaccaride (che è carico negativamente e quindi facilmente attaccabile da cariche positive)

La molecola ha 19 cariche positive:

$$\begin{array}{r}
 16 \times \text{gli aa} + \\
 4 \times \text{gli N-Term} - \\
 1 \times \text{C-term} = \\
 \hline
 19
 \end{array}$$

Il legame del peptide con l'LPS permette di avvicinarsi alla membrana e disgregarla per fuoriuscita del citoplasma e ingresso di H_2O .

EFFETTO SINERGICO: quando due sostanze applicate insieme hanno effetti superiori rispetto alla somma delle singole somministrazioni di ciascuno.

NANOPARTICELLE CONTENENTE PEPTIDE
usate per il rilascio controllato dei peptidi e per evitare effetti tossici.

Le nanoparticelle devono essere biodegradabili e sono rivestite da PEG (glicole polietilenico) che aumenta la solubilità e diminuisce la tossicità in quanto il farmaco viene rilasciato in piccole concentrazioni.

Sono sotto forma di polveri secche, quindi facilmente nebulizzabili per aerosol.

Attività antimicrobica in vitro → somministrazione del farmaco a cellule in piastra con diverse concentrazioni di nutrienti.

Attività dose dipendente → in base alla concentrazione.

Significativa statistica → risultati non dovuti al caso.

Esperimento in vivo → infezione endoteliale su topi immunodepressi e somministrazione del farmaco in nanoparticelle (+ controllo, + nanopart. scariche).

SEPSI = infezioni che diventano sistemiche (SEMICEMIA) ed avvolgono colpendo gli organi.

cura → fase precoce: ANTIBIOTICI

→ fase avanzata: l'antibiotico potrebbe aggravare la situazione, poiché anche se i batteri vengono distrutti, le tossine persistono ed incrementano i livelli di infiammazione aggravando ancora gli organi.

Macchinario per circolazione extracorporea che filtra il sangue, per cercare di eliminare le tossine:

- il filtro contiene il peptide POLYXINA B in grado di legarsi con grande affinità all'LPS.
- altro peptide che lega le citochine
- ALBUMINA lega in modo aspecifico, poiché ha una consistenza appiccicosa
- peptide 133 legato al supporto tramite un ponte S-S
- per la matrice può essere usato l'agarosio.

AVASTIN (BEVACIZUMAB → nome generico)

è l'anticorpo più utilizzato nel cancro al colon retto
→ adenocarcinoma metastatizzante mediante polipi
agisce contro l'angiogenesi (Anti-VEGF) vascular endothelial
contiene una proteina ricombinante grow factor

vita media: 20 giorni

È un anticorpo umanizzato (93% umano, 7% murino (CDR))

Anti impieghi: cancro pancreas
cancro retto
cancro a cellule squamose
cancro rene

Non agisce direttamente sulle cellule tumorali, per questo
c'è bisogno anche di una cura chemioterapica.

VEGF receptors → tirosin chinasi dimeriche

L'anticorpo lega il VEGF impedendogli di legarsi al recettore

È importante l'affinità, più che l'avidità, poiché ha un
solo epitopo e quindi sarebbe comunque legato da un
solo sito del recettore.

L'elevata affinità è fondamentale che sia maggiore di
quella per il recettore.

LUCENTIS (RANIBIZUMAB)

deriva dallo stesso anticorpo dell'avastin, lega sempre il VEGF

utilizzato per la degenerazione maculare dell'occhio
 → il tessuto vascolarizzato ha eccessiva attività e genera delle macchie

dopo averlo umanizzato vengono fatte delle mutazioni puntiformi per aumentare l'affinità di legame

Non presenta il dominio FC quindi non attiva il complemento, non viene distrutto dalle cellule immunitarie
 pesa 48 kDa, perciò è molto penetrante ed ha un'emivita di 3 gg.

Dosaggio 0,5 mg

HARCEPTIN (TRASTUZUMAB)

principale anticorpo umanizzato per il cancro alla mammella

Dosaggio: HER-2 receptor (solitamente overespresso nel tumore)
 questo recettore deve dimerizzare per trasmettere il segnale di proliferazione

il farmaco si lega al monomero di HER-2 e ne impedisce la dimerizzazione

In questo caso l'effetto avidità è molto importante

Presenta il frammento FC quindi può richiamare macrofagi e NK.

RITUXAN (RITUXIMAB)

anticorpo chimico per i linfomi

Il marcatore fisiologico CD20 è overespresso in quasi tutti i linfomi non-Hodgkin a cellule B
CD20 → proteina non glicosilata di membrana
Rituxan agisce contro il CD20 nel dominio extracell.

Il farmaco si lega al CD20 e rimane sulla superficie

- citotossicità mediata dall'anticorpo (macrotopi e NK)
- CDC: citotossicità dipendente dal complemento
- apoptosi

SYNAGIS (PALIVIZUMAB)

anticorpo contro virus respiratorio sinciziale che colpisce principalmente i bambini prematuri.

Viene dato come cura preventiva per evitare la formazione di sincizi.

emivita: 20-25 gg

ARTRITE REUMATOIDE → malattia infiammatoria che colpisce le articolazioni con erosione ossea dovuta alla produzione di citochine.

es. citochina TNF α → innesca la produzione di tutte le altre citochine
prot. trimERICA
solubile

FARMACO HUMIRA (ADALINUMAB)

→ primo anticorpo umano ottenuto col fage display

È un IgG1 e si lega in modo specifico al TNF α con un' elevata affinità di legame in quanto il TNF α è solubile

Può legarsi al TNF α sia quando è in forma solubile sia inizialmente quando è attaccato alla membrana

emivita : 20 gg

ETANERCEPT : recettore dimerizzato del TNF α legato al frammento FC di un anticorpo

può attivare l' antibody depended antitoxicity quando il TNF α è ancora legato alla membrana con la recettore la cellula

N PLATE (ROMIPLOSTIM)

agonista della trombopoietina

peptide selezionato con phage display per legarsi al recettore della Trombopoietina per aumentare la produzione di piastrine.

poiché il peptide è corto, verrebbe degradato, quindi è stato modificato:

- attacco di anticorpi umani
- dimerizzazione della molecola, quindi attacco 2 peptidi.

CUNICAL TRIALS:

- risposta alla proliferazione piastrinica breve
- risposta generale (abbondante in fase iniziale)