

TEKBIOFARM

SCIENZE, TECNOLOGIE E BIOTECNOLOGIE
PER L'INDUSTRIA DEL FARMACO

I

Direttore

Silvio Massimo LAVAGNA
Sapienza – Università di Roma
UNILAB S.a.S di Lavagna Silvio Massimo & Co.

Comitato scientifico

Manrico BERNARDINI
Special Product's Line, Unilab Biotech

Roberta VENTURI
Special Product's Line, Menarini Biotech

Daniela SECCI
Sapienza – Università di Roma

TEKBIOFARM

SCIENZE, TECNOLOGIE E BIOTECNOLOGIE
PER L'INDUSTRIA DEL FARMACO



L'unicità può essere il prodotto di processi
che sono essi stessi comuni a tutta la materia vivente.

Robert FOLEY

La collana è indirizzata agli operatori del mondo dell'industria farmaceutica che operano in sinergia con il mondo accademico. Accoglie e promuove opere relative ai settori scientifico disciplinari Farmaceutico tecnologico applicativo, Chimico farmaceutico, Chimico industriale, Biochimico, Biologico farmaceutico, Biotecnologico.

La collana si struttura in ventuno moduli e ciascuno di essi è composto da un numero variabile di monografie, al fine di armonizzare le tematiche trattate e per rendere più snella e accessibile la consultazione. La divisione è stata scelta per offrire contenuti sempre aggiornati e in costante evoluzione, nel pieno rispetto di quanto le normative nazionali ed europee indicano per l'intero settore.

MODULI TEMATICI

1. Farmaci biologici e biosimilari.
2. Biochimica, biochimica industriale e biotecnologie.
3. Specialità farmaceutiche solide orali.
4. Specialità iniettabili liofilizzate.
5. Specialità farmaceutiche per uso topico.
6. Impianti e tecnologie per la produzione di A.P.I. (Principi Attivi Farmaceutici).
7. Impianti per la produzione di specialità farmaceutiche per via fermentativa.
8. Ingegneria Farmaceutica.
9. Sviluppo e validazione dei metodi analitici.
10. Automazione e controllo di processo negli impianti HVAC.
11. Ambiente, sicurezza ed igiene industriale.
12. Utilities Farmaceutiche.
13. Clean rooms e classificazioni delle aree in accordo alle GMPs (Good Manufacturing Practices).
14. Rabs, Isolatori e manipolazione di A.P.I. high potency.
15. Validation Master Plan.
16. Cleaning in Place e metodi di pulizia e sanitizzazione.
17. Studio dei layouts e dei flussi del personale, delle materie prime, degli intermedi e dei prodotti finiti.
18. Magazzini di stoccaggio in/out.
19. Tecnologie e macchinari di processo.
20. Preparazioni iniettabili liquide ed acqua per uso farmaceutico.
21. Normativa di riferimento e bibliografie.

Silvio Massimo Lavagna

Dal riso biotech ai farmaci del futuro

Farmaci biologici e biosimilari da piattaforme vegetali
per la cura dei tumori e delle malattie autoimmuni

MODULO I

VOLUME I

In collaborazione con
MASSIMILIANO FLORIO





Aracne editrice

www.aracneeditrice.it
info@aracneeditrice.it

Copyright © MMXVII
Gioacchino Onorati editore S.r.l. – unipersonale

www.gioacchinoonoratieditore.it
info@gioacchinoonoratieditore.it

via Vittorio Veneto, 20
00020 Canterano (RM)
(06) 45551463

ISBN 978-88-255-0264-0

*I diritti di traduzione, di memorizzazione elettronica,
di riproduzione e di adattamento anche parziale,
con qualsiasi mezzo, sono riservati per tutti i Paesi.*

*Non sono assolutamente consentite le fotocopie
senza il permesso scritto dell'Editore.*

I edizione: maggio 2017

Indice

- 9 *Introduzione*
- 13 **Capitolo I**
I farmaci biologici
- 1.1. L'importanza degli anticorpi monoclonali (mAbs) come farmaci target-specifici, 17.
- 25 **Capitolo II**
Le nuove piattaforme vegetali
- 2.1. L'utilizzo delle piante come biofabbriche di farmaci biologici e di biosimilari con la piattaforma PMF, 26 – 2.2. La scelta del riso come pianta di elezione e l'utilizzo del seme come organo di accumulo, 28 – 2.3. Vantaggi tecnici del seme di riso e meccanismi che influenzano il livello di espressione, 31 – 2.4. Promotori di proteine di riserva del seme del riso, 32.
- 35 **Capitolo III**
Importanza dei farmaci biosimilari
- 3.1. Differenze tra i medicinali biologici e i medicinali micro-molecolari, 39 – 3.2. Linee guida dell'EMA per lo sviluppo de mAbs biosimilari, 40 – 3.3. Il razionale scientifico alla base dell'approvazione dei medicinali biosimilari, 41 – 3.3.1. *La comparabilità*, 41 – 3.3.2. *La biosimilarità*, 42 – 3.3.3. *Intercambiabilità*, 44 – 3.3.4. *Valutazione clinica di un mAb biosimilare*, 45.
- 47 **Capitolo IV**
La regolamentazione dei medicinali biologici in Europa
- 4.1. Il percorso legale e regolatorio nell'Unione Europea, 47 – 4.1.1. *In Europa*, 48.

51 Capitolo V

Sviluppo di una piattaforma vegetale

5.1. Azione terapeutica del mAb *Rituximab*, 51 – 5.2. Meccanismi d'azione del *Rituximab*, 53 – 5.3. Utilizzo di una piattaforma vegetale con semi di *Oryza Sativa L.* Ingegnerizzati, 58 – 5.3.1. *Il processo produttivo di un mAb su piattaforma vegetale a livello industriale*, 60 – 5.3.2. *Specie di riso Biotech utilizzata*, 61 – 5.3.3. *Il seme come organo di accumulo*, 63.

67 Capitolo VI

Percorso normativo e comparabilità fisico–chimica e funzionale

6.1. Situazione attuale nel mercato dei farmaci biologici con particolare riferimento agli anticorpi monoclonali, 71 – 6.1.1. *Percorso legale e regolatorio nell'Unione Europea*, 78 – 6.1.2. *Negli Stati Uniti*, 80 – 6.2. Compatibilità fisico–chimica e funzionale tra il biosimilare proposto GP2013 prodotto con piattaforma tradizionale e il *Rituximab*, 82 – 6.2.1. *Metodi*, 82.

97 Capitolo VII

Nuove frontiere in oncologia

7.1. Ruolo degli mAbs nel trattamento del cancro del seno Her2–positivo, 98 – 7.2. Studi di efficacia clinica: il caso *Trastuzumab (Herceptin)* e dei suoi biosimilari, 98 – 7.3. Studi clinici di sicurezza, 100 – 7.4. Attività di farmacovigilanza e gestione del rischio, 101 – 7.5. Estrapolazione delle indicazioni, 102 – 7.6. Le osservazioni degli esperti & la loro visione per i prossimi 5 anni, 103.

107 *Bibliografia e sitografia*

III *Ringraziamenti*

Introduzione

Ringrazio tutti i nostri laureandi, dottorandi e dottorati, ricercatori e professori che contribuiscono con il loro costante lavoro allo sviluppo e alla crescita di questa nuova e avanzata disciplina denominata in terminologia scientifica *Plant Molecular Farming*.

Essa rappresenta in realtà una piattaforma vegetale biotecnologica ingegnerizzata che consente alle piante di esprimere farmaci biologici di cui l'umanità ha un bisogno estremo. Questi farmaci, denominati appunto biologici, tra i quali annoveriamo gli anticorpi monoclonali, gli enzimi, le proteine ed i vaccini, sono oggi prodotti in tutto il mondo con cellule di mammifero attraverso la tecnica del Dna ricombinante. Una metodologia con indubbi vantaggi ma anche con notevoli svantaggi per i molti effetti collaterali che si generano con questa tecnica e i cui costi sono a tutt'oggi proibitivi per le popolazioni più povere ed indigenti e per i servizi nazionali che proteggono la salute dei propri cittadini. Un ringraziamento particolare va al Dott. Massimiliano Florio e alla sua famiglia che hanno fortemente creduto in questa piattaforma vegetale mettendo a disposizione mezzi, spazi e personale altamente qualificato della Special Product's Line in sinergia con Sapienza — Università di Roma e con l'Università degli Studi di Udine.

La piattaforma vegetale fu un'idea che quando la proposi fu accolta con un certa perplessità dovuta non tanto alla finalità del progetto stesso che individuava una nuova linea produttiva per i farmaci biologici, quanto piuttosto perché introduceva all'interno di un'azienda farmaceutica una nuova mentalità che si collegava, almeno in parte, alle regole di un'azienda agricola che per quanto sofisticata, rimaneva comunque estranea ad un contesto Pharma (con il "PH maiuscolo"!) fatto di camici bianchi che si muovono all'interno di ambienti altamente tecnologici come le clean rooms in ottemperanza a rigide procedure di Quality Assurance e di Norme di Buona Fabbricazione (GMPs).

A sostegno della mia idea venne la notizia che l'Istituto Militare di Firenze era stato da poco autorizzato dal Ministero della Salute a

coltivare Marijuana per uso terapeutico e quindi le piante in un certo senso assunsero una loro dignità ufficiale in ambito farmaceutico.

Le piante in realtà possedevano già questa dignità, essendo state per millenni una fonte a cui attingere per poter disporre di sostanze che fossero in grado di lenire e a volte curare i mali che hanno sempre afflitto l'umanità, ma ora, con questo nuovo ed interessante progetto si poteva guardare al futuro con un occhio diverso: ovvero guidare la piante, almeno alcune varietà di esse ben individuate e selezionate della famiglia del riso e del tabacco, per obbligarle a sintetizzare molecole come gli anticorpi monoclonali (mAbs) e non solo, utilizzabili direttamente per produrre farmaci biologici e biosimilari mirati alla cura di patologie spesso difficili e complesse a volte inguaribili o altamente invalidanti.

Il microcosmo sintetico-biologico della pianta, sapientemente guidato da mani esperte, poteva così esprimere tutta la sua potenzialità dimostrando di poter fare meglio ciò che l'uomo aveva fatto e continua ancora oggi a fare utilizzando dei processi biochimici molto più complessi e non privi di rischi, manipolando batteri, cellule di mammifero e quant'altro, con risultati spesso non ottimali se non a volte addirittura discutibili.

Dunque, una nuova finestra di ricerca e di sviluppo industriale, che oggi sotto l'accezione più ampia di *Plant Molecular Farming*, si propone come una nuova via maestra in cui il mondo vegetale è posto al servizio dell'uomo non solo perché fornisce il cibo che provvede al sostentamento di tutti noi e offre un ambiente verde e ricco di paesaggi rilassanti e salutari, ma perché da questo stesso mondo vegetale si cominciano a dischiudere conoscenze in grado di offrire all'umanità nuove speranze di guarigione e di salute.

Una via appena agli albori e chissà che non sia come la scintilla della pila di Volta che nei decenni successivi alla scoperta, indusse un cambiamento radicale all'esistenza della vita degli uomini, portando l'elettricità e le sue applicazioni in tutto il mondo che subì nei successivi duecento anni, una trasformazione definitiva ed irreversibile.

Alessandro Volta, che era rimasto da solo nell'Università di Pavia abbandonata dagli austroungarici in fuga dopo la battaglia di Marengo si trovò alla presenza di Napoleone interessato a riaprire l'Accademia per dimostrare di essere portatore di cultura e non di guerra, scoccò dalla sua pila la scintilla che fece sparare a salve un cannone posizionato nell'ampio chiostro dell'Università.



Figura 1. Alessandro Volta.



Figura 2. Volta espone la Pila a Napoleone (Olio di Giuseppe Bertini, 1891, Tempio Voltiano, Como).



Figura 3. Tempio Voltiano sul lago di Como.

Napoleone da buon generale ne intravise immediatamente le possibili applicazioni militari e rimase talmente affascinato da questa scoperta che favorì in tutti i modi negli anni a venire lo scienziato Italiano con numerose onorificenze tra le quali anche quella di senatore del Regno d'Italia. « Oggi la scintilla non deve far sparare un cannone ma essere una nuova scintilla di vita e di speranza per tutta l'umanità sofferente »¹.

1. È bene ricordare che gli anticorpi monoclonali, a causa del loro elevato costo, in passato venivano usati solo per curare i tumori in stadio avanzato che non rispondevano alla chemioterapia standard oppure nelle recidive. Ora che ne è stata dimostrata l'efficacia, alcune terapie con anticorpi monoclonali vengono messe in atto già in fasi meno avanzate della malattia a tutto vantaggio dei pazienti che non devono subire un ciclo chemioterapico che ne indebolisce le difese immunitarie senza ottenere una guarigione efficace. Ad esempio il *Rituximab* può essere usato come terapia di prima linea in alcuni tipi di linfoma non-Hodgkin, mentre il *Trastuzumab* (*Herceptin*[®]) viene usato per curare alcune forme non avanzate di tumore al seno.

I farmaci biologici

Le nuove fonti di cura per le terapie del futuro

Le principali novità terapeutiche degli ultimi anni sono state caratterizzate dal crescente uso di tecnologie di sviluppo innovative basate sull'utilizzo di materiale biologico ovvero le biotecnologie. Esse impiegano organismi geneticamente modificati per la produzione di biofarmaci sfruttando la tecnologia del Dna ricombinante (rDna) che ha rivoluzionato la produzione di proteine di interesse farmaceutico. Il loro contributo sulla terapia di numerose patologie anche gravi come ad esempio tumori, malattie autoimmuni, malattie cardiovascolari è stato e sarà sempre più determinante.

I farmaci biologici/biotecnologici, a differenza dei farmaci tradizionali, sono molecole complesse e di grandi dimensioni. Tali farmaci, che includono le classi dei mAb, fattori di crescita, interleuchine, interferoni, ormoni e vaccini, sono impiegati in numerose aree terapeutiche. In particolare, trovano applicazione soprattutto nel trattamento di patologie di natura oncologica, reumatologica, diabetologica, gastroenterologica e dermatologica.

I farmaci biologici/biotecnologici si differenziano sotto numerosi aspetti dai farmaci di sintesi chimica.

Difatti, contrariamente ai farmaci di sintesi, ottenuti da materiale non vivente tramite reazioni chimiche standardizzate e riproducibili, il prodotto di origine biologica/biotecnologica consta di proteine o peptidi, estratti da sistemi viventi attraverso complesse tecniche di purificazione e sviluppati, nel caso di prodotti di origine biotecnologica, attraverso la tecnologia del Dna ricombinante. La produzione di un farmaco biologico/biotecnologico richiede, pertanto, un processo produttivo molto elaborato che ne definisce le sue caratteristiche. Nello specifico, la complessità del processo di produzione

dipende dal substrato biologico/organismo utilizzato, da fattori ambientali, dal materiale e dalle condizioni di crescita/fermentazione, dalla possibile manipolazione genetica e, infine, dalle metodiche di estrazione e purificazione. Proprio in virtù di tale complessità, anche una minima modifica al processo produttivo può alterare significativamente la composizione del farmaco, la sua efficacia così come il suo profilo di tollerabilità¹. Pertanto, la definizione *the product is the process* rende perfettamente il concetto di unicità di ciascun farmaco biologico/biotecnologico.

Tuttavia a causa della complessità dei processi produttivi che rende i farmaci biotecnologici molto costosi e della scadenza brevettuale, la quale solitamente dura circa 20 anni, l'industria farmaceutica si è rivolta verso lo sviluppo di farmaci biotecnologici definiti biosimilari ed in alcuni casi bio-better su idonee piattaforme produttive. Le applicazioni industriali della tecnologia del Dna ricombinante (rDna) negli ultimi vent'anni hanno rivoluzionato la produzione di proteine di interesse farmaceutico, e hanno dato vita a un settore industriale il cui fatturato ammonta a circa cento miliardi di euro². La produzione di proteine ricombinanti che utilizza i batteri come organismi ospite è tecnologicamente complessa e onerosa dal punto di vista finanziario e inoltre gli organismi di questo genere non si prestano sempre allo scopo per una serie di ragioni, fra cui l'assenza di un ambiente adeguato a favorire il corretto *folding* della proteina, la mancanza di processamento post-traduzionale, la tossicità esercitata dalla proteina ricombinante nei confronti dell'organismo ospite e, nel caso di produzione di biofarmaci iniettabili per via endovenosa, il significativo rischio di contaminazione del prodotto finale da parte di componenti altamente tossiche dell'organismo ospite. Per questo motivo, a fianco degli organismi ospiti microbici, sono stati sviluppati sistemi fondati su colture di cellule mammifere (es. CHO) o di insetto (es. SF9), di cellule e tessuti vegetali, nonché sulla produzione di animali e piante transgenici. A tutt'oggi, pertanto, la produzione di farmaci biologici avviene per la quasi totalità in sistemi animali, per lo più in colture

1. T. MORROW, L.H. FELCONE, *Defining the difference: What Makes Biologics Unique*, « Biotechnology Healthcare », 2004, vol. 1 no. 4, pp. 24-9.

2. E. EGELKROUT, J.A. HOWARD, V. RAJAN, (a cura di), *Overproduction of recombinant proteins in plants*, « Plant science », 2012, vol. 184, pp. 83-101.

cellulari, sebbene il mercato richieda, spesso con urgenza, innovative piattaforme produttive efficaci, sicure e che abbattano i costi dei farmaci³.

Per decenni il pilastro del trattamento medico dei carcinomi è stata la chemioterapia citotossica somministrata per via endovenosa. I “bersagli” dei farmaci utilizzati in questo tipo di trattamento sono le cellule in rapida proliferazione, che comprendono sia le cellule cancerose sia le cellule “normali” di alcuni tessuti. I pazienti trattati possono pertanto sviluppare alcuni classici effetti tossici, come alopecia, sintomi gastrointestinali e inibizione midollare. Nel corso dell’ultimo decennio si è tuttavia assistito ad un grosso cambiamento nella terapia dei carcinomi. Anche se la chemioterapia citotossica tradizionale rimane il trattamento di scelta di molte neoplasie maligne, le terapie mirate sono ormai entrate a far parte del trattamento di molti tipi di carcinoma, come i carcinomi della mammella, del colon-retto, del polmone e del pancreas, ed inoltre di linfomi, leucemie e mieloma multiplo. Dei nuovi farmaci anti-cancro approvati dalla *Food and Drug Administration* (FDA) degli Stati Uniti a partire dal 2000, 15 rappresentano terapie mirate, mentre solo 5 sono agenti chemioterapici tradizionali⁴.

I due tipi principali di terapie mirate sono gli anticorpi. Grazie ai loro specifici meccanismi di azione, ed agli specifici effetti tossici, questi farmaci hanno modificato molti aspetti della pratica dell’oncologia. Alcuni di essi sono efficaci nei pazienti che possiedono uno specifico “bersaglio” molecolare, mentre non lo sono in pazienti che non presentano tale bersaglio; le terapie mirate hanno pertanto ampliato il concetto di terapia del cancro adattata al singolo paziente. L’efficacia del trattamento può essere influenzata da fattori come le caratteristiche etniche del paziente, il sesso, così come dall’istologia della neoplasia⁵. Le terapie mirate hanno reso necessari nuovi approcci per la determinazione del dosaggio ottimale, per valutare l’adesione del paziente al trattamento, nonché per la valutazione dell’efficacia. Occorre infine ricordare come il costo di queste terapie, che può essere superiore

3. Tesi di dottorato di ricerca Dr. P. CRISTIN, *Studi finalizzati ad aumentare l’espressione di transgeni in endosperma di riso mediante ingegnerizzazione di promotori chimerici seme-specifici*, Università degli Studi di Udine.

4. Centerwatch, *Drugs approved by the FDA*, 2007, centerwatch.com, Accessed May 8, 2007.

5. E. CALVO, J. BASELGA, *Ethnic differences in response to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors*, «Journal of Clinical Oncology», 2006, vol. 24, no. 14, pp. 2158–2163.

a diverse migliaia di dollari al mese⁶, possa costituire un problema significativo dal punto di vista dei costi dell'assistenza sanitaria.

L'immunoterapia come terapia alternativa per il cancro, ha avuto negli ultimi venti anni un importante sviluppo. Il suo ruolo nel trattamento delle neoplasie, è quello di migliorare la qualità della vita del paziente e prevenire la diffusione metastatica. A causa della loro instabilità genetica le cellule neoplastiche esprimono sulla loro superficie proteine alterate (antigeni associati al tumore), che non sono espresse o lo sono in misura molto ridotta, sulla superficie delle cellule normali. Gli antigeni tumore-associati (TAAs), esponendo nuovi epitopi "non-self" nel sistema immunitario dell'ospite innescano una risposta. Tale risposta ha però solo effetti marginali sul tumore stesso. Tuttavia, a causa della capacità delle cellule neoplastiche di ridurre la risposta immunitaria favorendo la secrezione di fattori immunosoppressivi come l'Interleuchina 10 (IL-10) e il Fattore di crescita tumorale β (TGF β), la risposta immunitaria citotossica contro i tessuti neoplastici risulta inibita. L'espressione di antigeni TAA da parte dei tumori umani e la consapevolezza che il sistema immunitario ha le potenzialità per riconoscere ed eliminare le cellule neoplastiche, (immunosorveglianza del tumore) costituiscono il razionale fondamento dello sviluppo di strategie immunoterapeutiche per mediare la regressione dei tumori. Un'immunoterapia "ideale" dovrebbe essere specifica, cioè capace di discriminare tra cellule normali e tumorali, sensibile, ossia in grado di eliminare anche una singola cellula tumorale residua; inoltre dovrebbe essere duratura fornendo protezione contro un eventuale recidiva. Con questi presupposti, attualmente, varie strategie immunoterapeutiche sono state sperimentate sull'uomo e gli approcci utilizzati possono essere classificati in due categorie: immunoterapia attiva, con l'obiettivo di indurre nell'ospite una risposta anti-tumorale e immunoterapia passiva, che consiste nel trasferimento nell'ospite, di effettori cellulari o umorali diretti contro cellule tumorali.

L'immunoterapia passiva determina un legame tra TAAs e risposta immunitaria attraverso un'immunoglobulina (Ig) antigene-specifica, il cui frammento costante Fc interagisce con il sistema immunitario

6. D. SCHRAG, *The price tag on progress-chemotherapy for colorectal cancer*, « The New England Journal of Medicine », 2004, vol. 351, no. 4, pp. 317-319; M. NEYT, J. ALBRECHT, V. COCQUYT, *An economic evaluation of Herceptin in adjuvant setting: the Breast Cancer International Research Group 006*, « Annals of Oncology », 2006, vol. 17, no. 3, pp. 381-390.

dell'ospite. Gli effetti biologici della somministrazione di anticorpi monoclonali (mAb) sono molteplici e includono il meccanismo di agglutinazione, di neutralizzazione delle proteine di segnale e di blocco dei siti di legame dei recettori cellulari. L'immunoterapia passiva richiede comunque un'elevata quantità di anticorpi specifici e a differenza di quella attiva, è di breve durata. La terapia con anticorpi monoclonali mostra un'elevata risposta clinica sia nelle malattie ematologiche sia nei tumori solidi; nelle prime, cioè le neoplasie ematologiche, sono solitamente utilizzati come targets del mAb i numerosi recettori ancorati alla superficie di membrana (*cluster* di differenziazione), come CD20, CD22 e CD52.

1.1. L'importanza degli anticorpi monoclonali (mAbs) come farmaci target-specifici

Gli anticorpi, o immunoglobuline (Ig), sono proteine coinvolte nel riconoscimento di sostanze esogene, come batteri o virus⁷. La sostanza che viene riconosciuta e legata dall'anticorpo è definita antigene. La struttura delle immunoglobuline consiste di due parti (Fig. 1.1): una porzione che riconosce e lega l'antigene e un'altra che media le funzioni biologiche ed è caratteristica della classe dell'anticorpo, chiamata regione costante poiché è uguale in tutte le classi di anticorpo⁸.

Le immunoglobuline sono glicoproteine appartenenti alla famiglia delle gammaglobuline, tutti gli anticorpi condividono la stessa struttura di base e differiscono solo nel sito di legame antigenico in cui vi è elevatissima variabilità. Una molecola di anticorpo ha una struttura simmetrica, a forma di "Y", composta da due catene proteiche "leggere" (L) e da due catene proteiche "pesanti" (H), entrambe identiche fra loro, tenute insieme da legami a idrogeno e ponti disolfuro. Le regioni N-terminali delle catene L e H formano in ciascun

7. E.M. NICHOLLS, *The evolution of an immune system*, « Medical Hypotheses », 1979, vol. 5, no. 2, pp. 225-235; G.H. LOWELL, L.F. SMITH, M.S. ARTENSTEIN, G.S. NASH, R.P.Jr. MACDERMOTT, *Antibody-dependent cell-mediated antibacterial activity of human mononuclear cells. I. K lymphocytes and monocytes are effective against meningococci in cooperation with human immune sera*, « The Journal of Experimental Medicine », 1979, vol. 150, no. 1, pp. 127-37.

8. D.C. HEINER, *IgG subclass composition of intravenous immunoglobulin preparations: clinical relevance*, « Review of Infectious Diseases », 1986, vol. 8 (Supplement 4), pp. S391-S395.

anticorpo il sito di riconoscimento dell'antigene. I siti che riconoscono e fissano gli antigeni sono costituiti da tre regioni determinanti la complementarità (CDR) collocate nell'ambito delle regioni variabili (VH e VL) alle estremità N-terminali delle due catene H e delle due catene L. Le CDR costituiscono la parte della molecola anticorpale che presenta la massima variabilità della sequenza amminoacidica. Oltre alle regioni variabili (VH e VL), ogni catena L contiene una regione, o dominio, costante (CL), e ogni catena H ha tre regioni, o domini, costanti definiti CH₁, CH₂, CH₃ (Fig. 1.1).

Gli anticorpi monoclonali sono anticorpi a specificità nota derivanti da singoli cloni produttori, ossia molecole anticorpali identiche tra loro e specifiche per un certo determinante antigenico definito epitopo.

La scoperta degli anticorpi monoclonali indicati con la sigla mAb, risale al 1975 quando due ricercatori Cesar Milstein e Georges Kohler misero a punto la tecnica per la loro sintesi (Fig. 1.2).

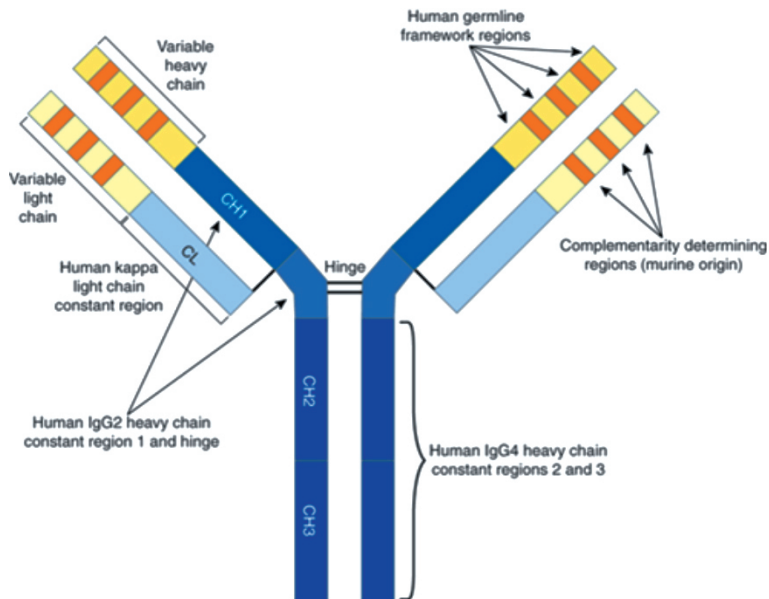


Figura 1.1. Struttura di un anticorpo monoclonale umanizzato.

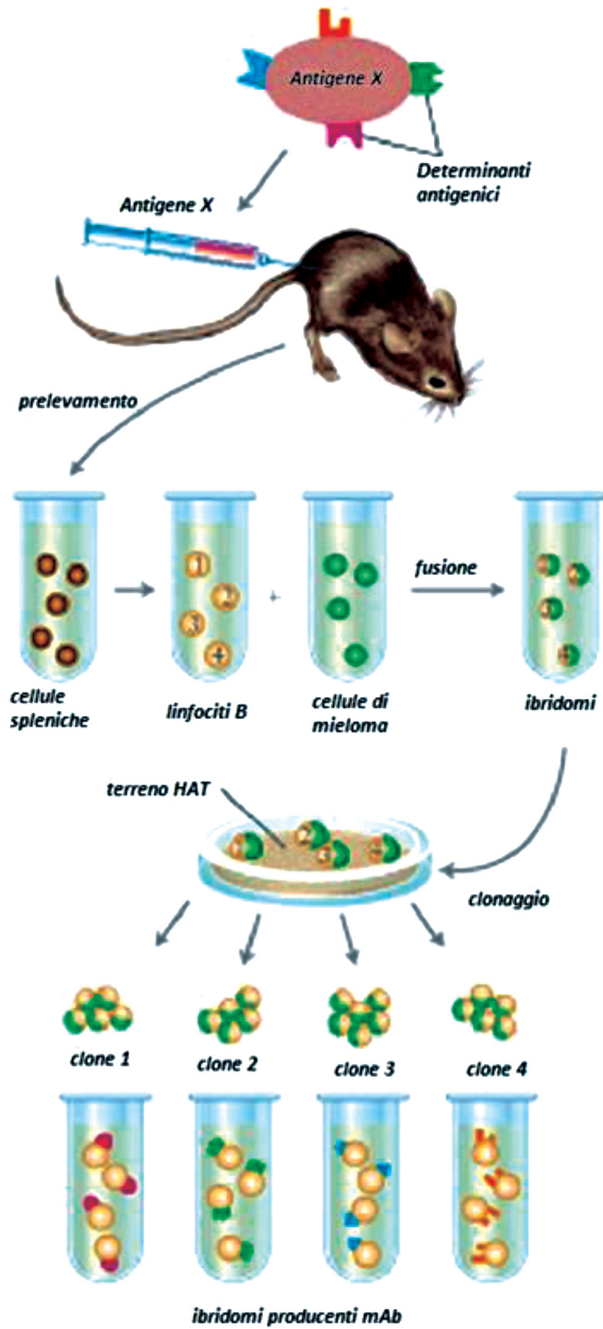


Figura 1.2. Tecnica dell'ibridoma.

Essi vengono prodotti da ibridi cellulari, detti ibridomi, costituiti da linfociti B murini specifici per un determinato antigene (Ag), fusi con cellule mielomatose non anticorpo secernenti. Tale tecnica conferisce agli ibridomi due caratteristiche fondamentali ovvero:

- a) immortalità, conferita dalle cellule mielomatose;
- b) secrezione di anticorpi, propria dei linfociti B.

Per produrre un anticorpo monoclonale specifico per un certo antigene è quindi necessario immunizzare un topo con tale antigene e successivamente isolare i linfociti B dalla milza o dai linfonodi dell'animale. Si procede poi alla fusione dei linfociti B con la linea immortalizzata adatta. Le linee di mieloma sono i partners di fusione migliori per i linfociti B, dato che, queste cellule, tendono a fondere e dare origine ad ibridi stabili con più efficienza rispetto ad altre cellule immortalizzate. Gli ibridi generati vengono selezionati in terreni di coltura selettivi contenenti ipoxantina, aminopterina e timidina (terreno HAT).

In queste condizioni si osserva che le cellule di mieloma non fuse muoiono e che i linfociti B non fusi sopravvivono per meno di due settimane. Di conseguenza crescono e rimangono in vita per lungo tempo solo gli ibridi.

Le cellule fuse vengono poi seminate in diluizione limite, ossia in maniera tale che ogni pozzetto di coltura contenga solo una cellula di ibridoma; i sovrannati di ciascun pozzetto vengono quindi saggiati per la presenza di anticorpi in grado di reagire con l'antigene impiegato per l'immunizzazione. Una volta identificati i pozzetti positivi, ovvero i pozzetti contenenti l'anticorpo della specificità voluta, le cellule vengono clonate e i cloni produttori l'anticorpo vengono identificati con uno screening simile al primo.

Strutturalmente gli anticorpi monoclonali sono equivalenti ai classici anticorpi prodotti fisiologicamente dai vertebrati in seguito all'esposizione ad agenti estranei definiti antigeni. Sono rappresentati da glicoproteine di grandi dimensioni le quali appartengono alla superfamiglia delle immunoglobuline, Ig, che sono suddivise in 5 classi ovvero IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Esse presentano una struttura quaternaria simmetrica costituita dall'insieme di quattro catene polipeptidiche, due pesanti e due leggere, legate tra loro covalentemente tramite ponti disolfuro. Entrambe le catene presentano una regione variabile