

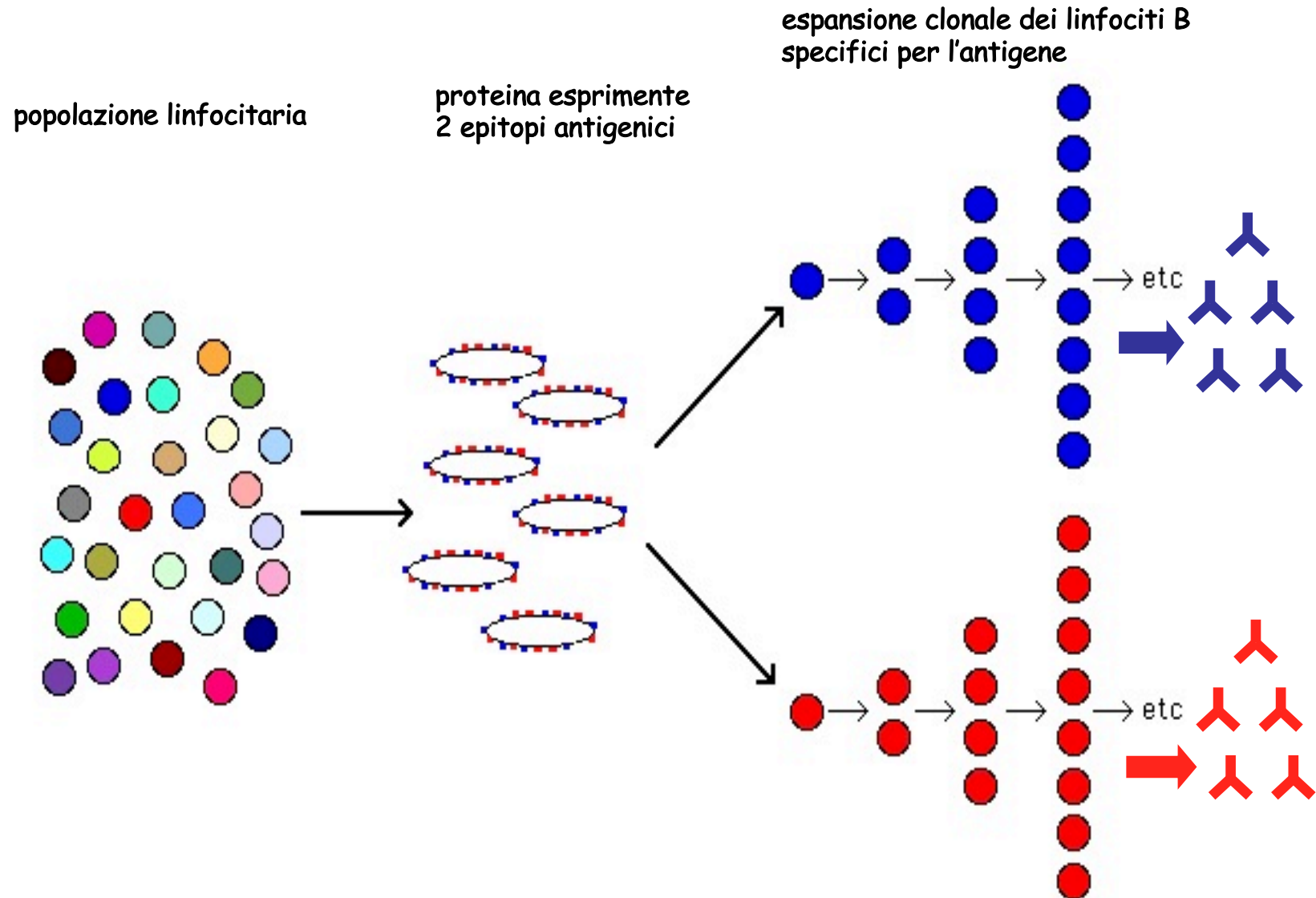
Corso di Immunologia - III anno
Prof. Paolini

Lezione 3/12/2024

"Gli anticorpi monoclonali"

Il materiale presente in questo documento viene distribuito esclusivamente ad uso interno e per scopi didattici.

LA RISPOSTA ANTICORPALE *IN VIVO* E' DI TIPO POLICLONALE



The mixture of antibodies produced in response to an antigen are referred to as **polyclonal antibodies** (they are produced by many different clones of B cells)

Anticorpi Policlonali

Anticorpi Monoclonali

Prodotti da:

Molti cloni di linfociti B

Un singolo clone di linfociti B

Si legano a:

Epitopi multipli di un antigene

Un singolo epitopo di un antigene

Classe anticorpale:

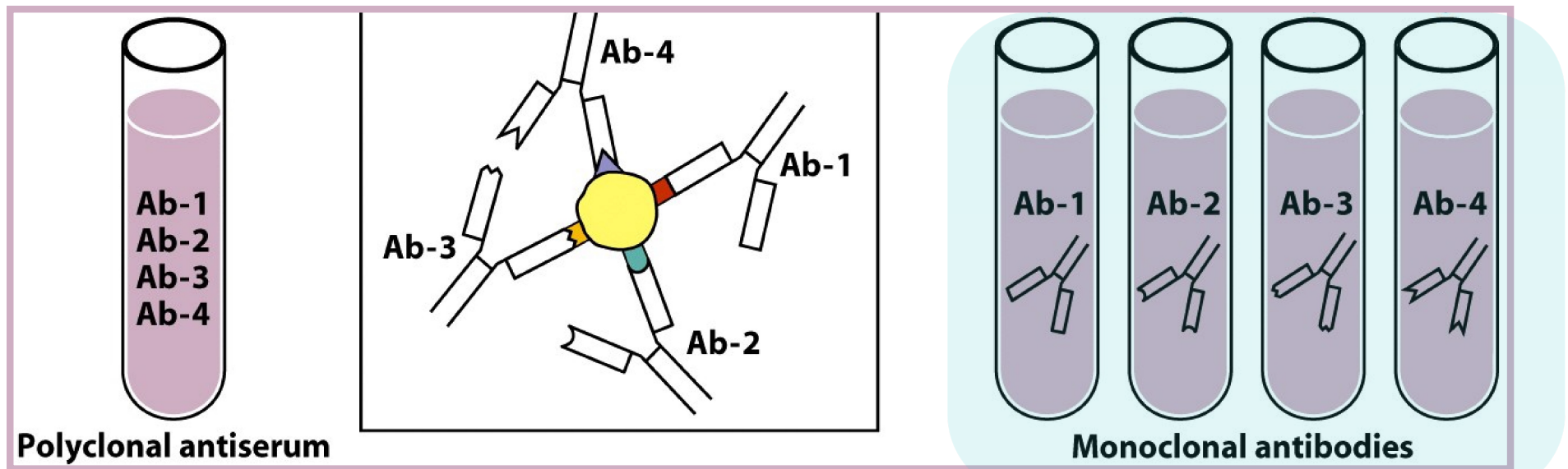
Una miscela di differenti classi

Anticorpi tutti di una singola classe

Siti di legame per l'Ag:

Una miscela di anticorpi con differenti siti di legame per l'Ag

Tutti gli anticorpi hanno lo stesso sito di legame per l'antigene



The era of monoclonal antibodies:

the story of a discovery that revolutionized science and medicine

Köhler G, Milstein C.

Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.

Nature. 1975 Aug 7



The Nobel Prize in
Physiology or Medicine
1984

"for theories concerning the specificity in development and control of the immune system and the discovery of the principle for production of **monoclonal antibodies**"

César Milstein



Georges J. F. Köhler

GLI ANTICORPI MONOCLONALI (MoAb)

Sono prodotti da 1 singola plasmacellula immortalizzata mediante fusione somatica con una cellula tumorale (mieloma)



L'anticorpo monoclonale è omogeneo

Specificità
Affinità
Isotipo

VANTAGGI:

La possibilità di scegliere l'anticorpo che ha le caratteristiche desiderate.

Specificità definita.

Produzione in grande quantità.

Disponibilità illimitata.

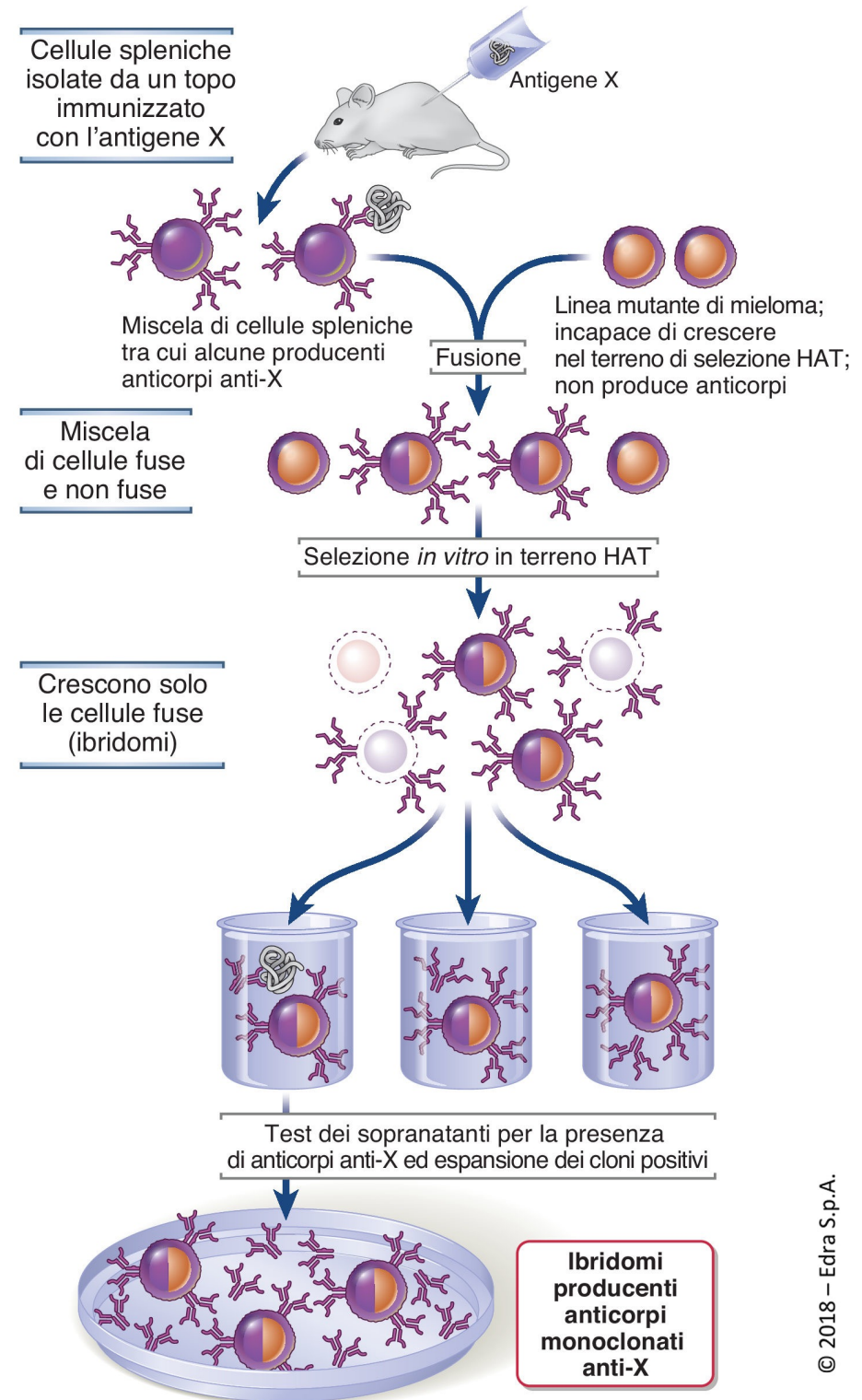
Elevata purezza.

La tecnica degli ibridomi

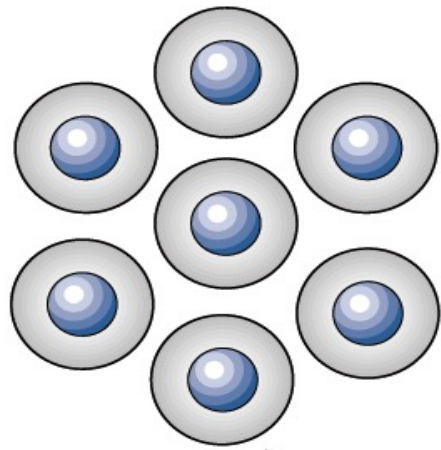
Köhler, G., and Milstein, C.

Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity.

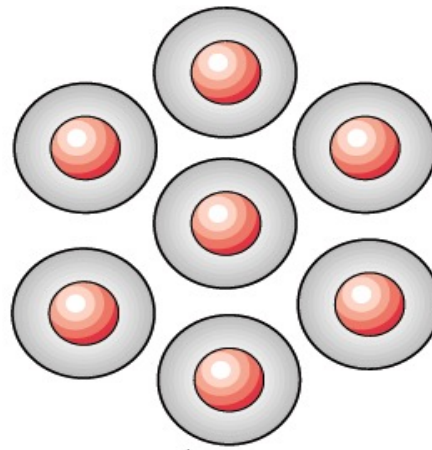
Nature, 256: 995, (1975).



Fusione cellulare

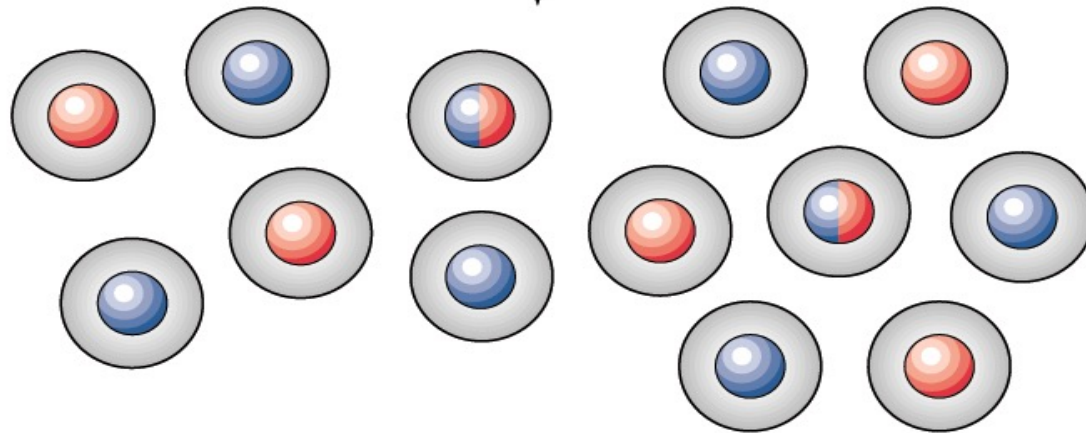


Linfociti B isolati dalla milza



Cellule di mieloma

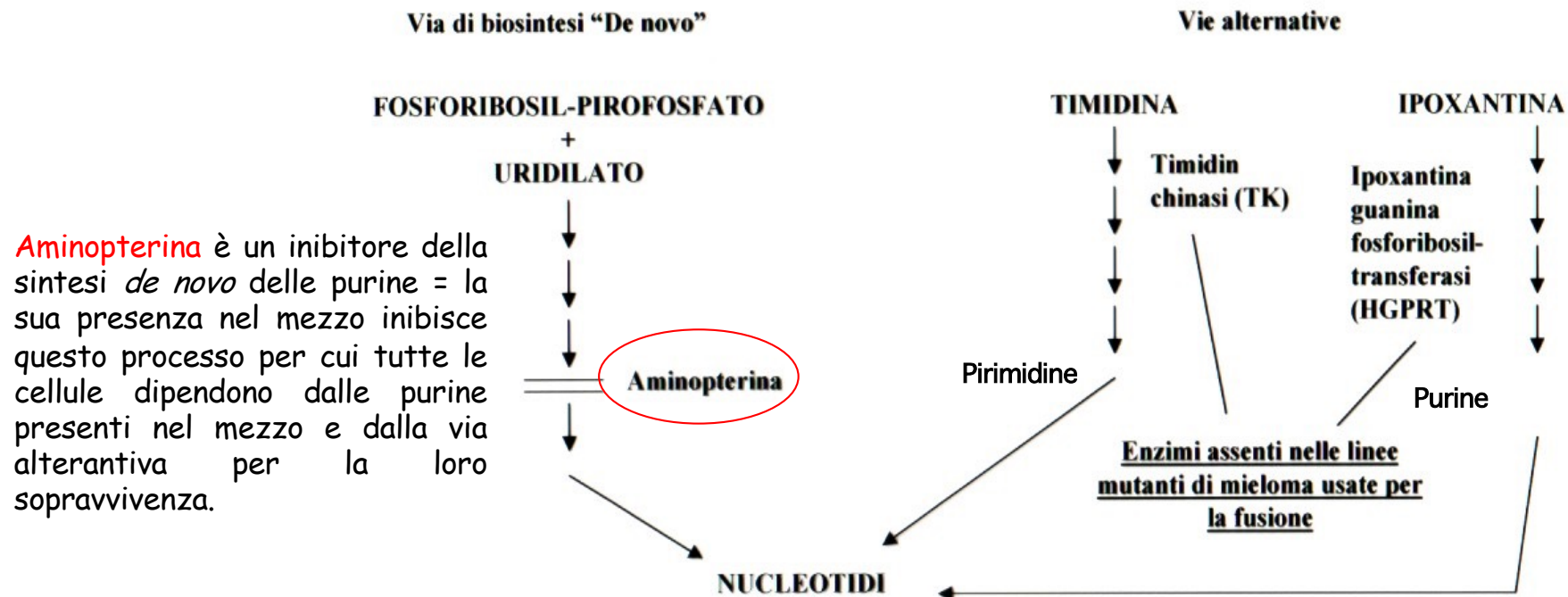
Fusione



Problema: come eliminare le cellule che non si sono fuse?

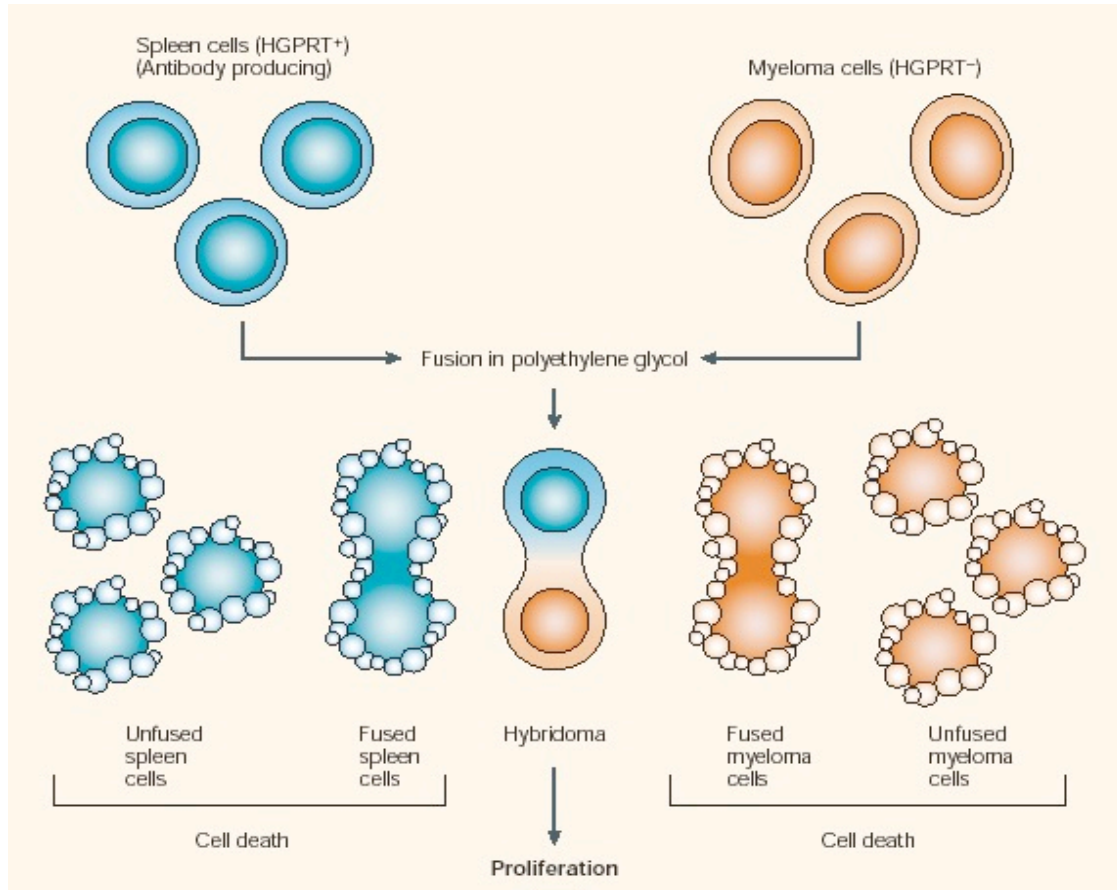
CARATTERISTICHE DEL MIELOMA

1. Immortale
2. Non produce Ig
3. Manca di HGPRT (Ipoxantina guanina fosforibosil transferasi), enzima richiesto per la sintesi delle purine mediante la via alternativa a partire da ipoxantina



Terreno di cultura HAT (aminopterina- ipoxantina - timidina)

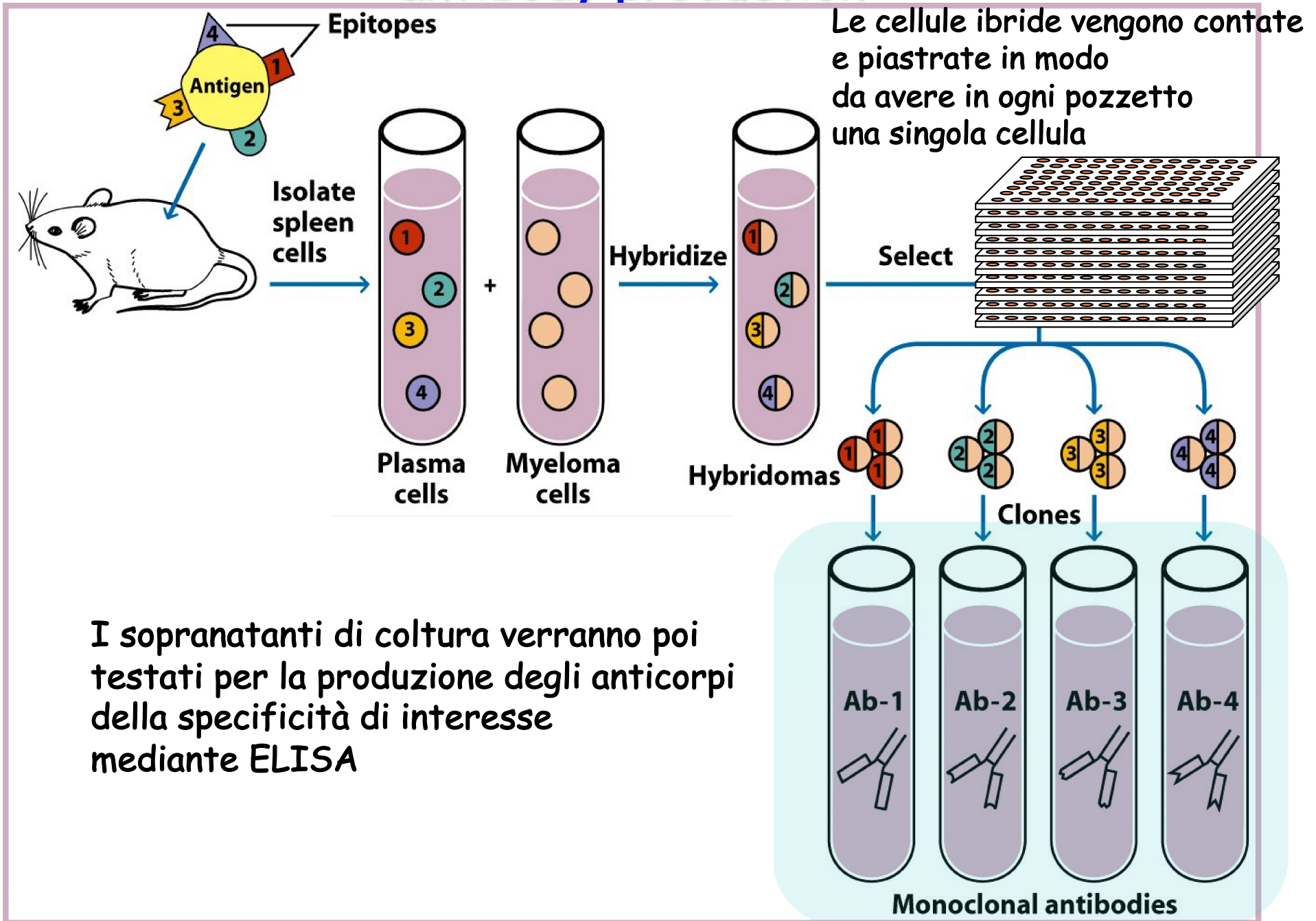
Hybridoma Selection: The "HAT Trick"



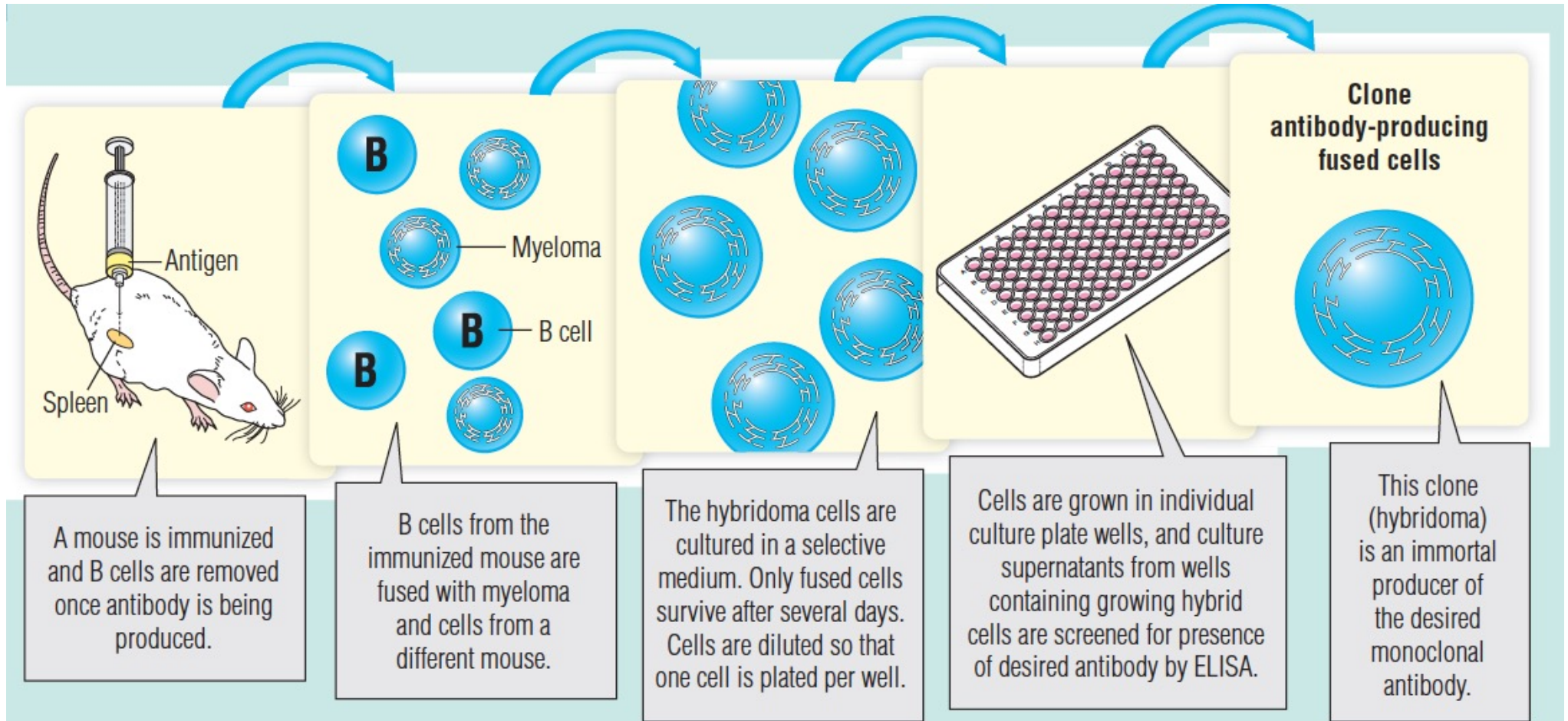
Myeloma cells lack certain enzymes so that they cannot use hypoxanthine and thymidine as a source for nucleic acid biosynthesis and will die in culture when grown in HAT medium

Only myeloma cells that have fused with B cells will survive

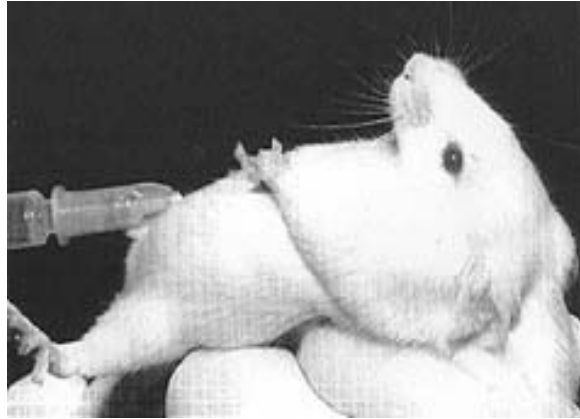
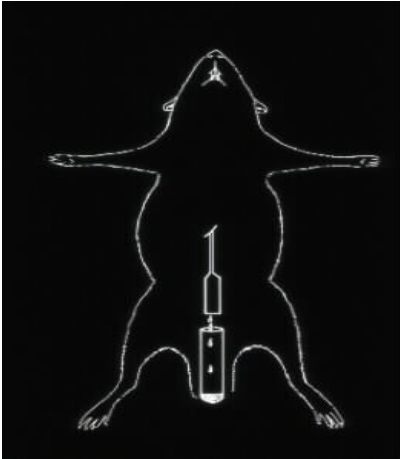
The hybridoma technique for monoclonal antibody production



La tecnica dell'ibridoma per la produzione di anticorpi monoclonali



PRODUZIONE DI ANTICORPI MONOCLONALI



*Generazione di ascite
che contiene quantità
elevate di mAb*

(5-20 mg/ml)



Bioreattori

(5-10 mg/ml)

Applicazioni degli anticorpi monoclonali

In vitro

Identificazione di sottopopolazioni cellulari mediante l'espressione di marcatori specifici

Identificazione e dosaggio di molecole di secrezione

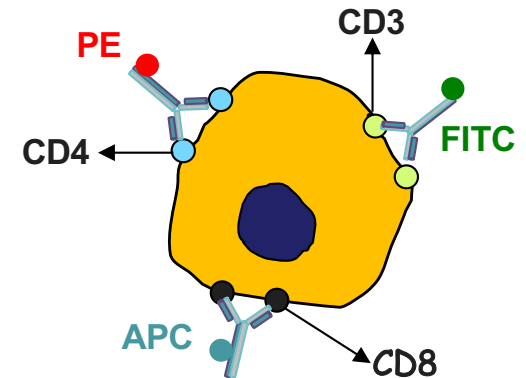
Analisi funzionale di molecole solubili e di membrana

In vivo

Diagnostica per immagini

Immunoterapia:
tumori, malattie autoimmuni, malattie infettive

Analisi del fenotipo leucocitario



- ❖ L'immunofenotipizzazione è basata sull'identificazione di antigeni di superficie per mezzo di anticorpi monoclonali coniugati con fluorocromi. La presenza di un dato antigene è, infatti, un indicatore dell'appartenenza di una cellula ad uno stipe e/o ad un definito stadio differenziativo o funzionale.
- ❖ Mediante immunofenotipizzazione è possibile quantificare diverse popolazioni cellulari.

PERCENTUALE DI LEUCOCITI NEL SANGUE

❖ Neutrofili	60-70%
❖ Eosinofili	2-5%
❖ Basofili	< 1%
❖ Monociti	3-7%
❖ Linfociti	20-30%

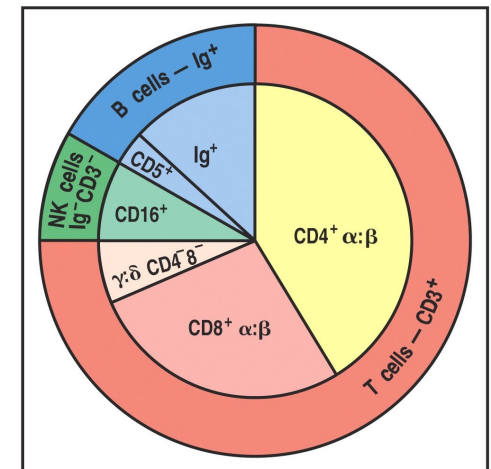
LINFOCITI T 58-88%

Helper 30-62%

Citotossici 17-42%

LINFOCITI B 2-19%

CELLULE NK 2-28%



ANALISI delle SOTTOPOPOLAZIONI LINFOCITARIE

Anti-CD45

leucociti

Anti-CD3

Anti-CD4

Anti-CD8

linfociti T

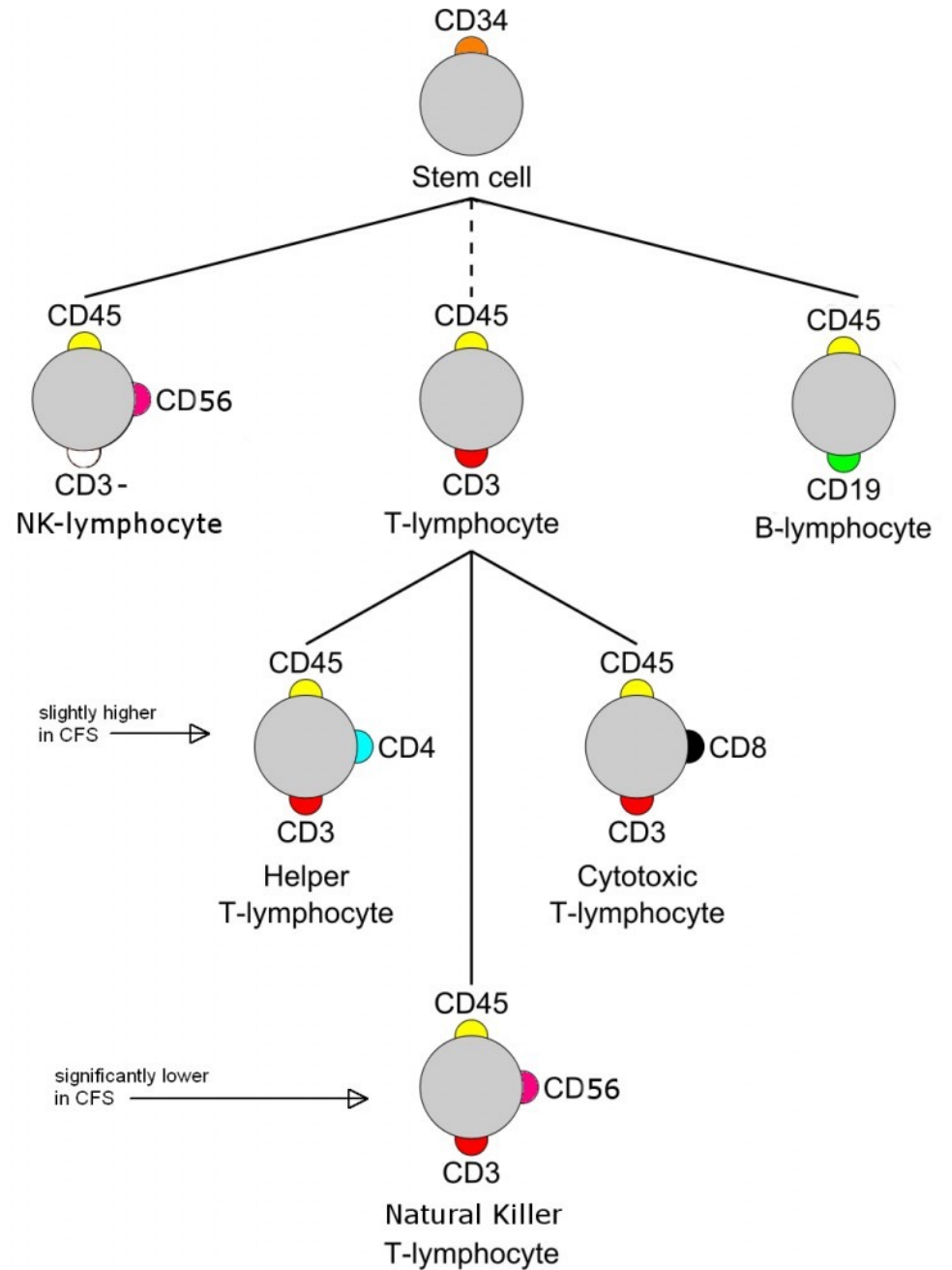
Anti-CD19

linfociti B

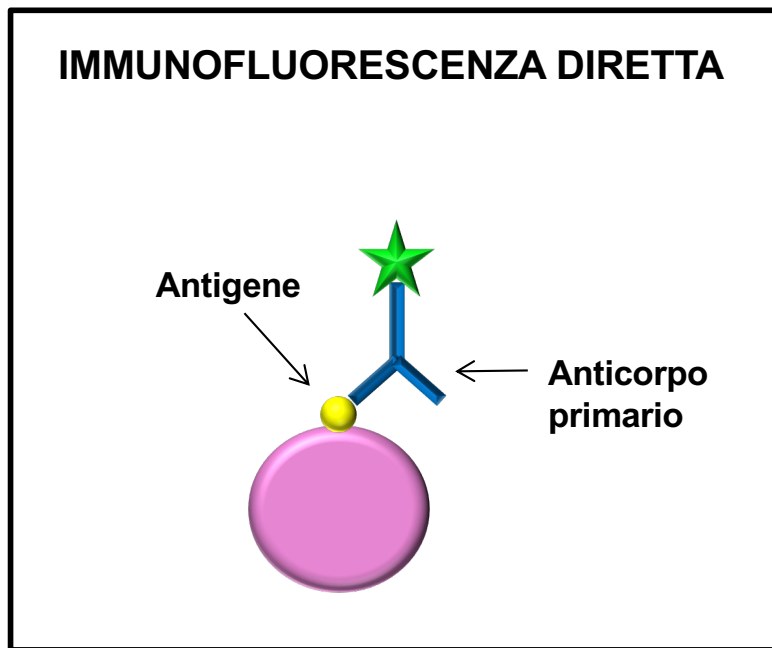
Anti-CD56

Anti-CD16

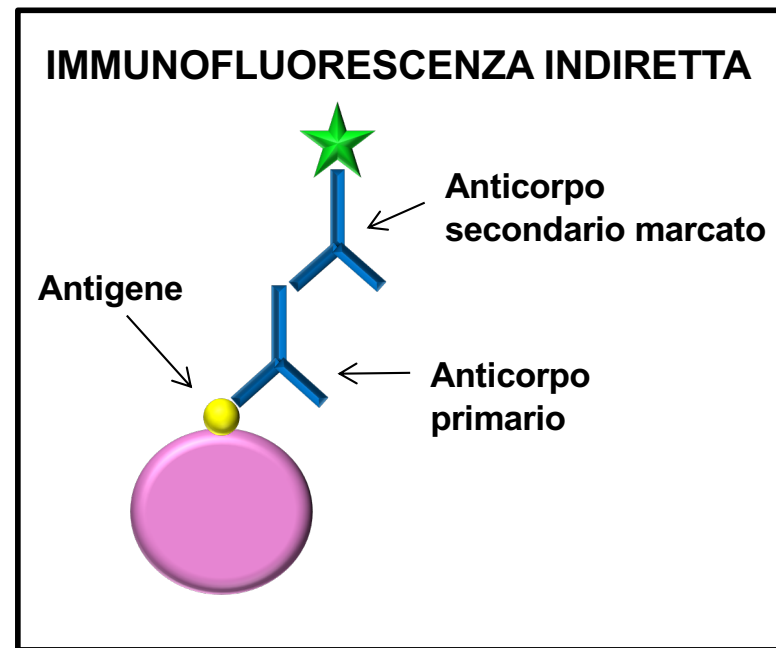
cellule NK



IDENTIFICAZIONE DI MARCATORI DI SUPERFICIE MEDIANTE IMMUNOFLUORESCENZA



Le cellule in sospensione vengono marcate con un anticorpo primario direttamente coniugato con un fluorocromo



Le cellule in sospensione vengono marcate con un anticorpo primario non coniugato seguito da quello secondario coniugato con il fluorocromo

IL CITOFUORIMETRO A FLUSSO



**FACS = Fluorescence
Activated Cell Sorter**

BD FACS Calibur



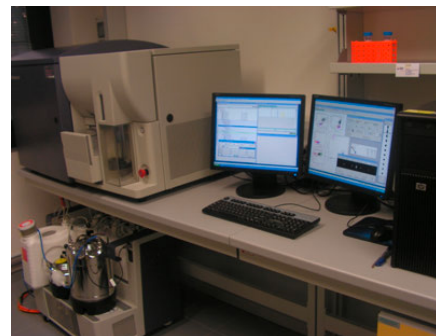
2 laser
4 colori

BD FACS Canto II



> 2 laser
> 6-7 colori

BD FACS Arial



4 laser: 488nm, 633nm, 405nm, 375nm
9 colori
Sorting

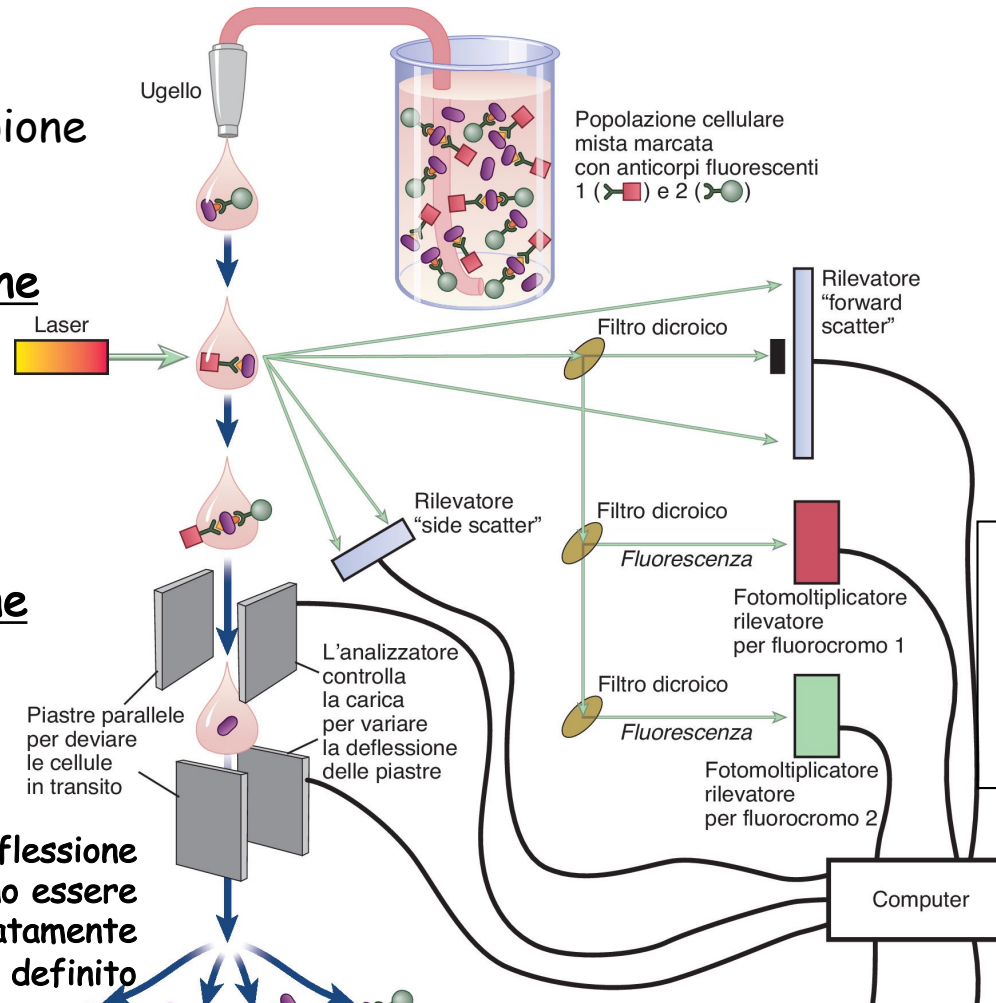
Il principio della CITOFLUORIMETRIA A FLUSSO

Sistema fluidoico per il trasporto del campione

Sistema di eccitazione

Sistema di rilevazione

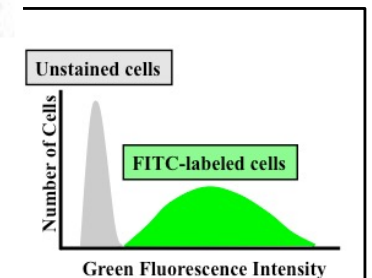
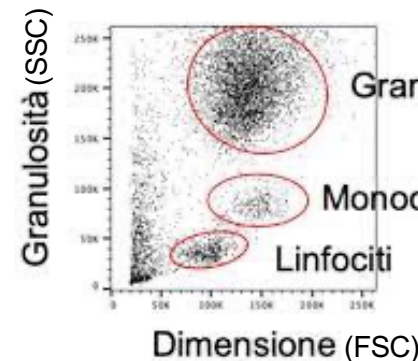
Attraverso piastre di deflessione le cellule analizzate possono essere deviate e raccolte separatamente tramite un processo definito "sorting"



Ogni singola cellula viene colpita da un fascio di luce che eccita il fluorocromo e determina l'emissione di un segnale fluorescente

Il segnale luminoso passando attraverso un sistema di filtri e specchi viene amplificato e convertito in segnale elettrico che verrà infine inviato ad un analizzatore di dati.

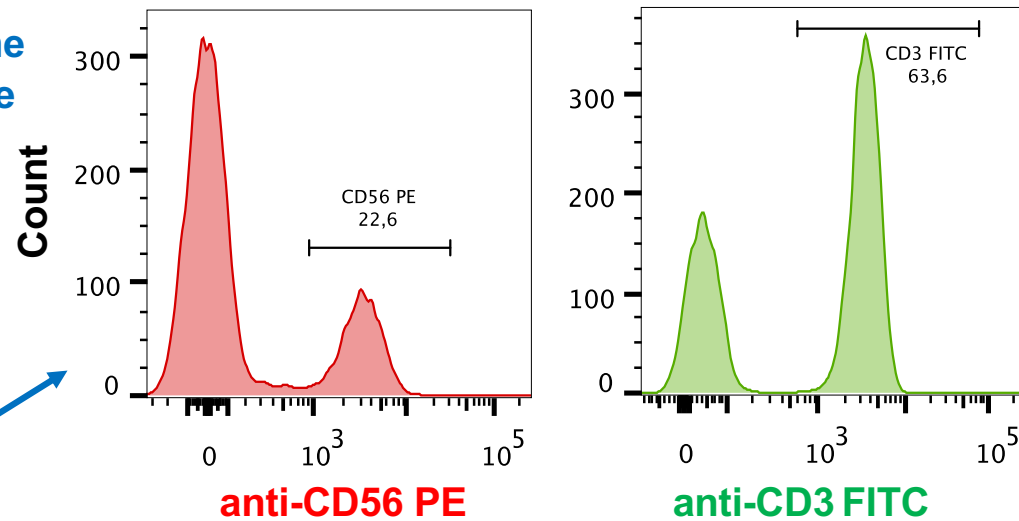
Sistema elettrico



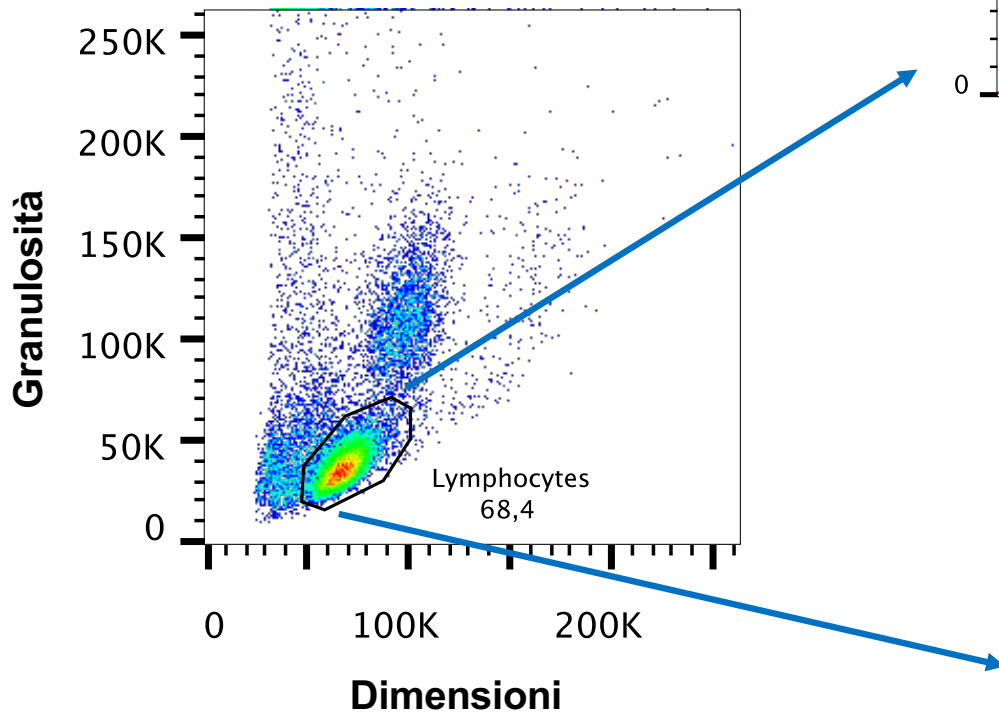
RAPPRESENTAZIONE GRAFICA DEI SEGNALE DI FLUORESCENZA

1. ANALISI SINGOLO PARAMETRO

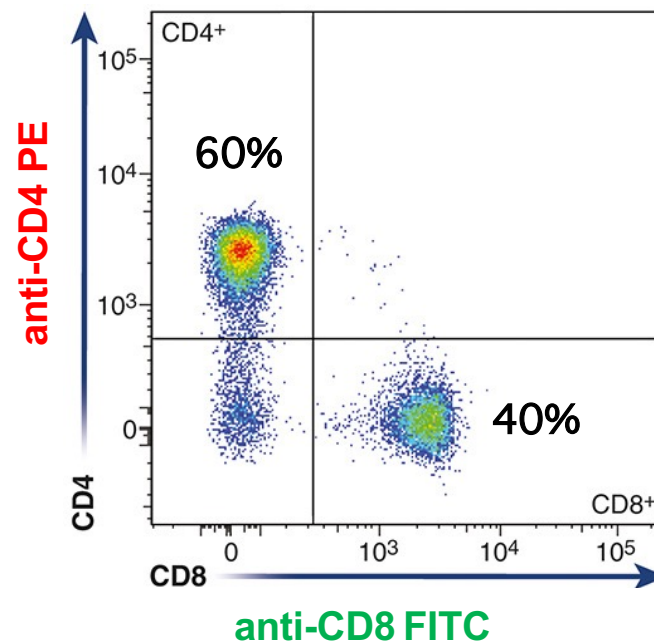
L'istogramma è la rappresentazione grafica di una singola distribuzione (un segnale di fluorescenza)



2. ANALISI MULTIPARAMETRICA



Il citogramma di dispersione a puntini (dot plot) è la rappresentazione grafica di due distribuzioni (due segnali di fluorescenza)



Monitoraggio dei leucociti nel corso di patologie o terapie:

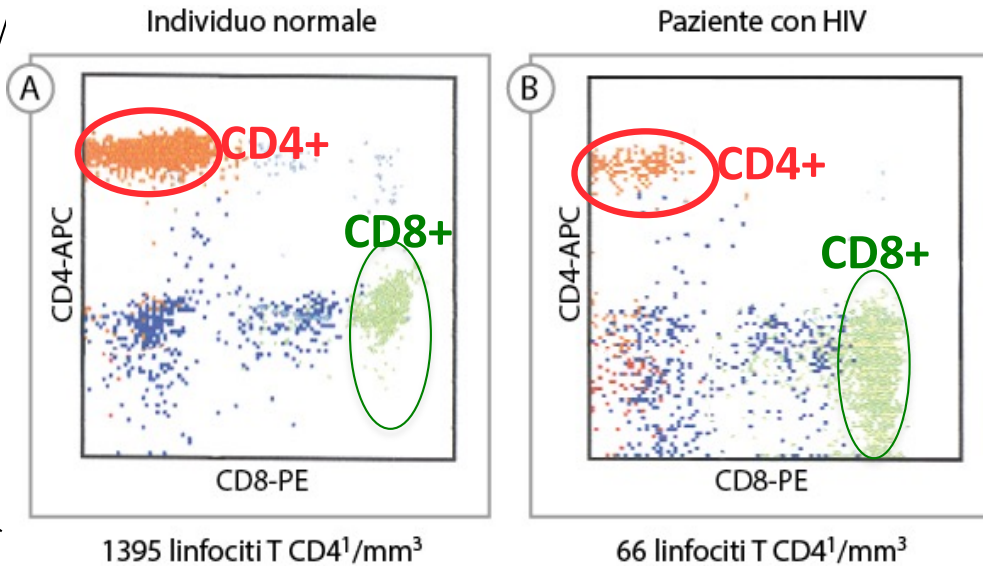
IMMUNODIAGNOSI

Esempi di situazioni patologiche associate ad un alterata composizione delle sottopopolazioni linfocitarie nel sangue

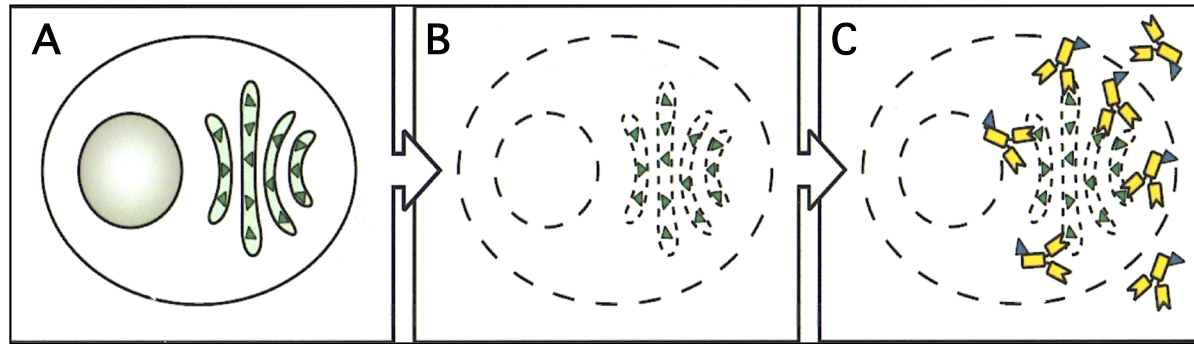
Condition	Main finding ^a
Diseases	
• Skin:	
candidiasis	CD4+ ↓
Kala Azar	CD4+ ↓
• Nervous system:	
Down syndrome	CD4+CD45R+ ↑
multiple sclerosis	CD4+CD45R+ ↑
schizophrenia	B CD5+ ↑
• Respiratory system:	
pneumonia	CD4+ ↓
pulmonary sarcoidosis	CD8+ ↑
• Alimentary system:	
coeliac disease	CD4+ ↓
Crohn's disease	CD8+ ↓
• Urogenital system:	
pyelonephritis	CD4+ ↓
• Immune system:	
AIDS	CD4+ ↓
Rush hyposensitization	CD4+CD45R+ ↓
• Endocrine system:	
Graves' disease	CD8+DR+ ↑
Hashimoto's disease	CD4+DR+ ↑
• Hematopoietic system: LLC	
idiopathic thrombocytopenic purpura	B, CD19 ↑ CD4+ ↓
• Joints and connective tissues:	
systemic lupus erythematosus	CD4+CD45+ ↓

^a ↑ increase, ↓ decrease in the numbers in the subset

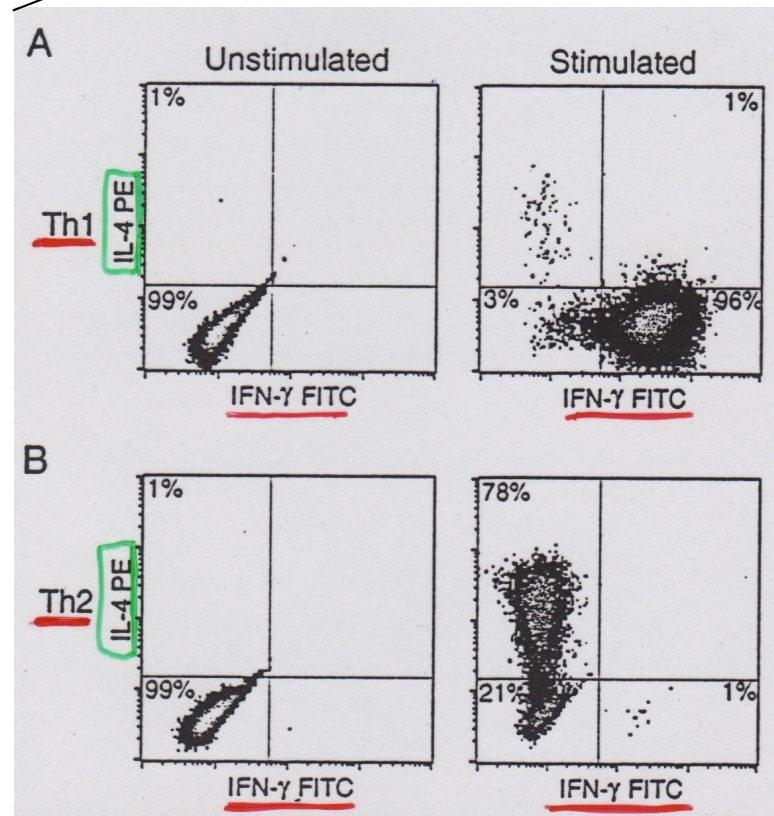
ANALISI CITOFUORIMETRICA DEI LINFOCITI T CD4+ E CD8+ DI UN PAZIENTE CON INFEZIONE DA HIV



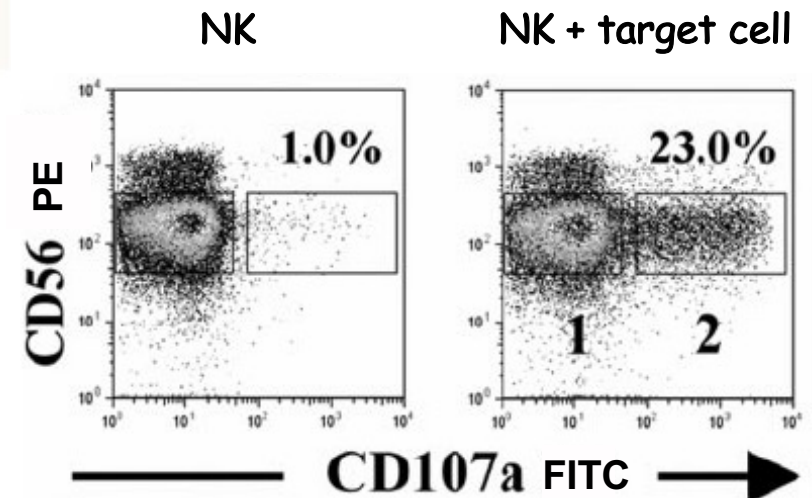
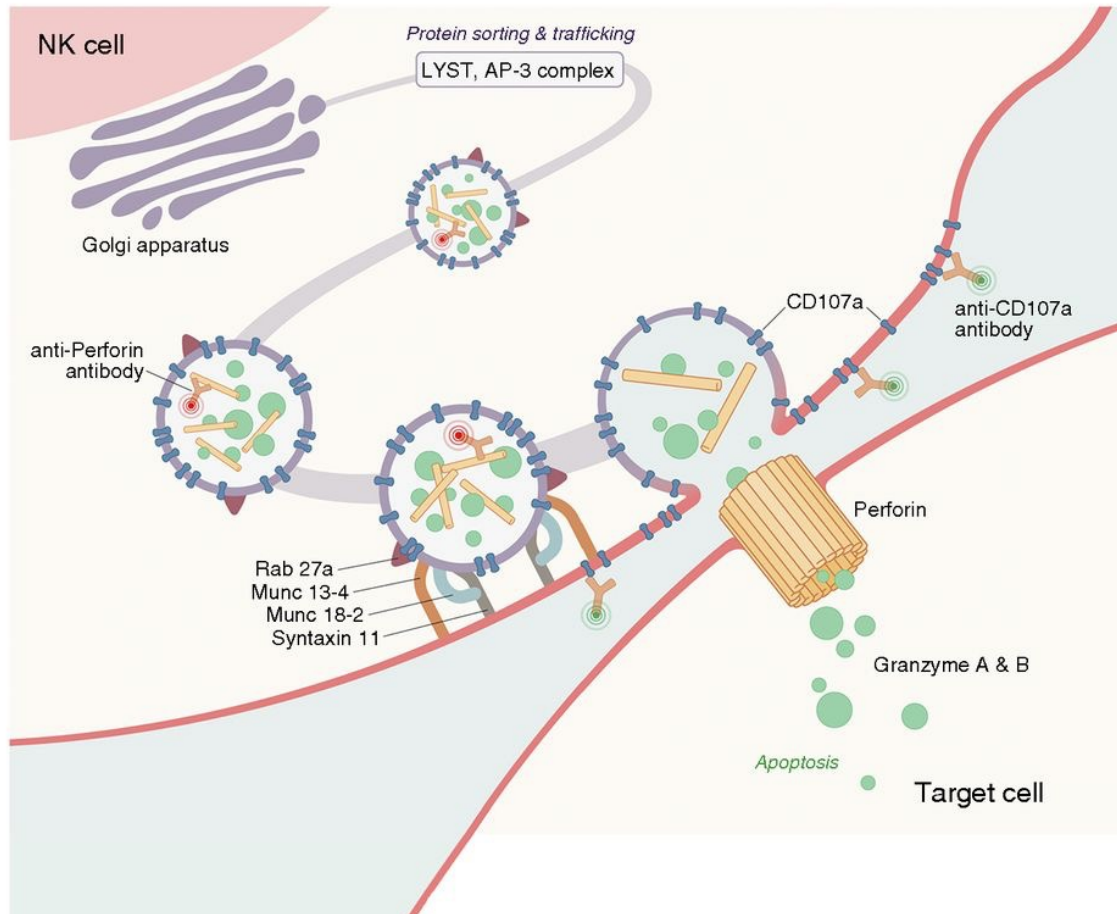
Monitoraggio dello stato funzionale delle cellule del sistema immunitario: produzione di citochine



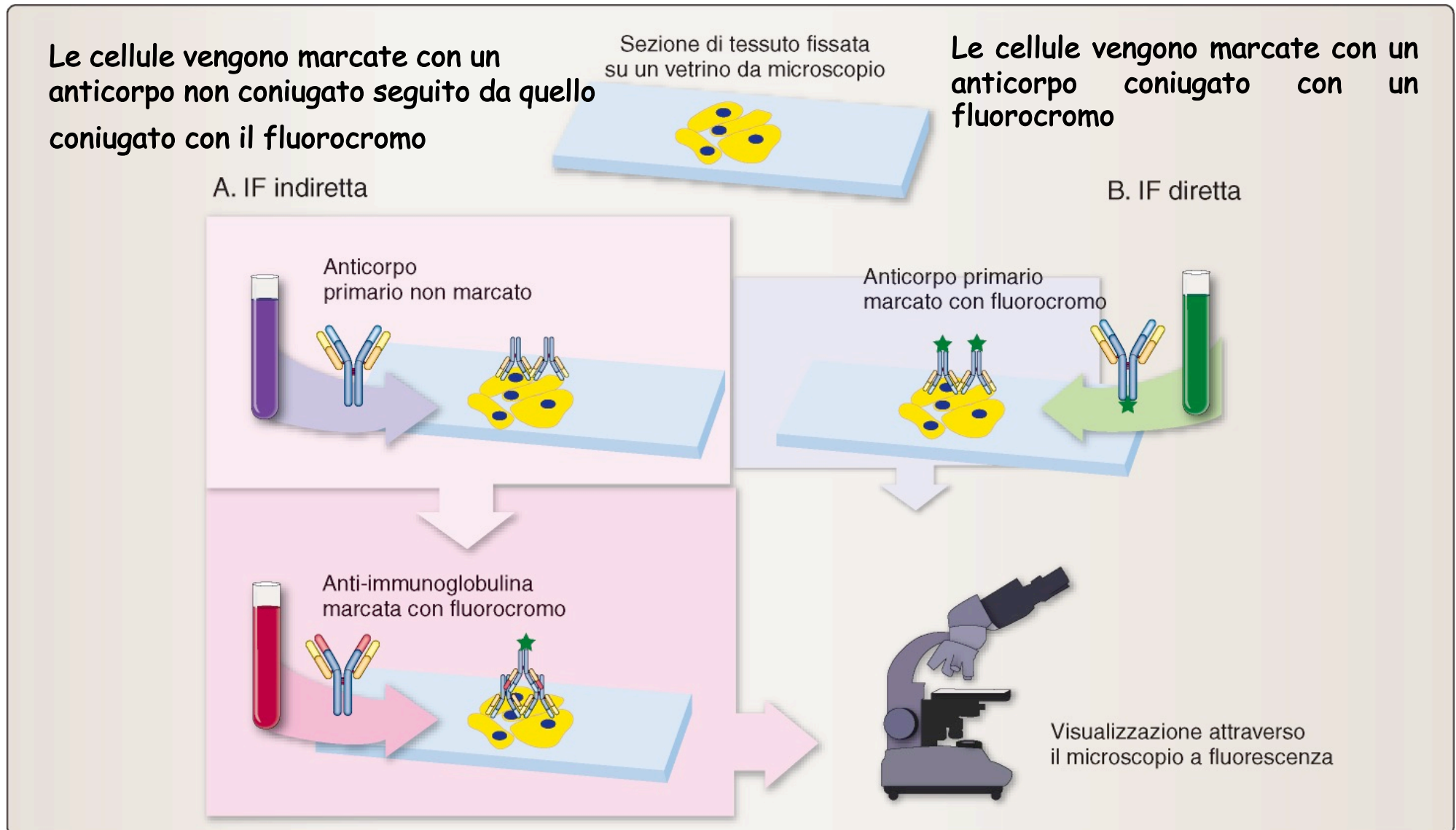
1. Stimolazione
2. Blocco esocitosi
3. Fissazione
4. Permeabilizzazione
5. Staining intracellulare



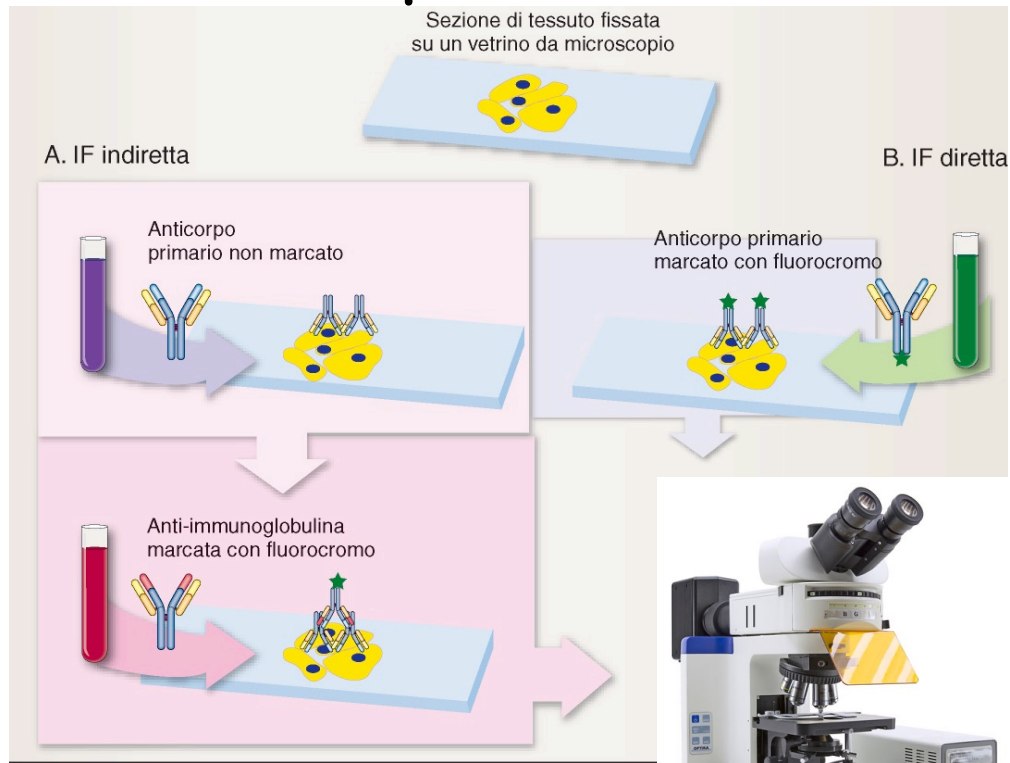
Monitoraggio dello stato funzionale delle cellule del sistema immunitario: test di citotossicità



Valutazione della distribuzione nei tessuti: microscopia a fluorescenza e confocale

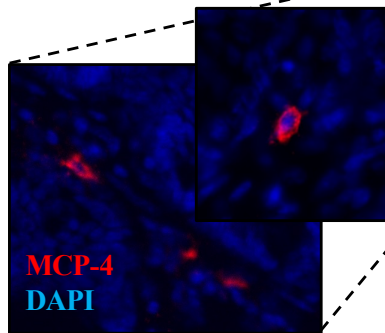
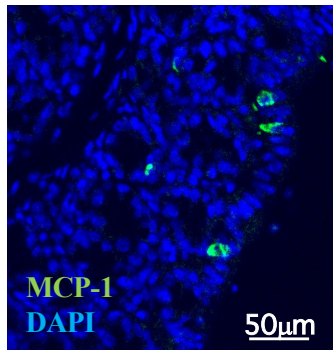


Valutazione della distribuzione nei tessuti: microscopia a fluorescenza e confocale

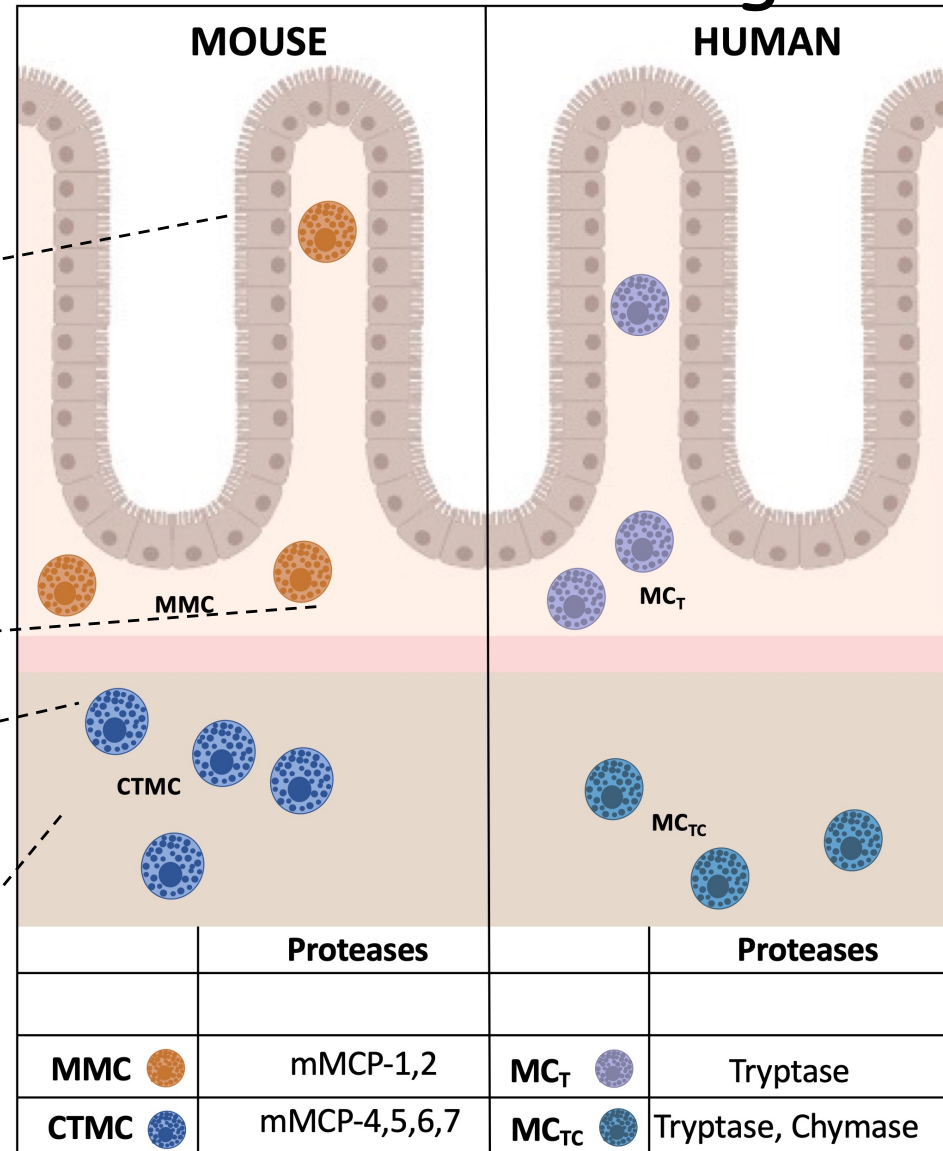


I mastociti dell'intestino includono due sottopopolazioni che esprimono proteasi diverse nei loro granuli

MCP-1 = triptasi espressa nei granuli di mastociti mucosali



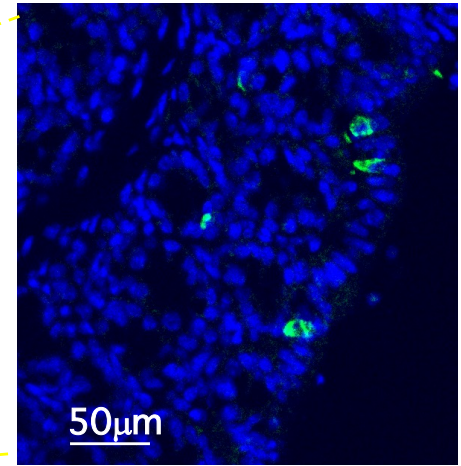
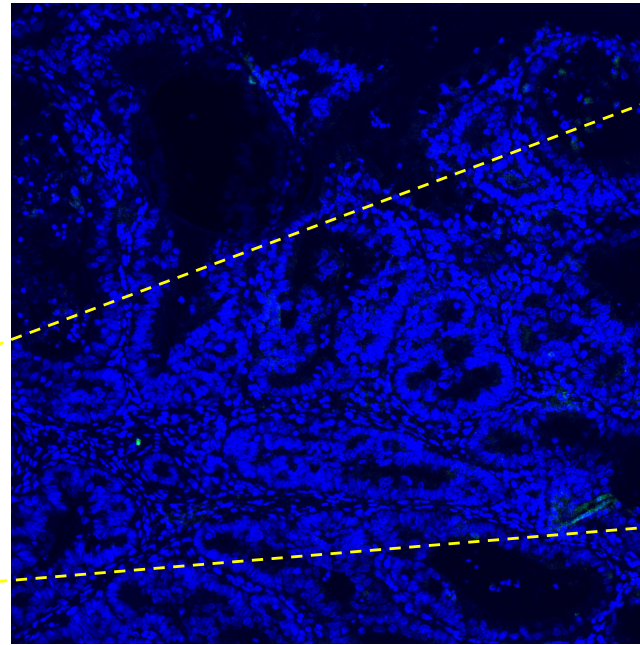
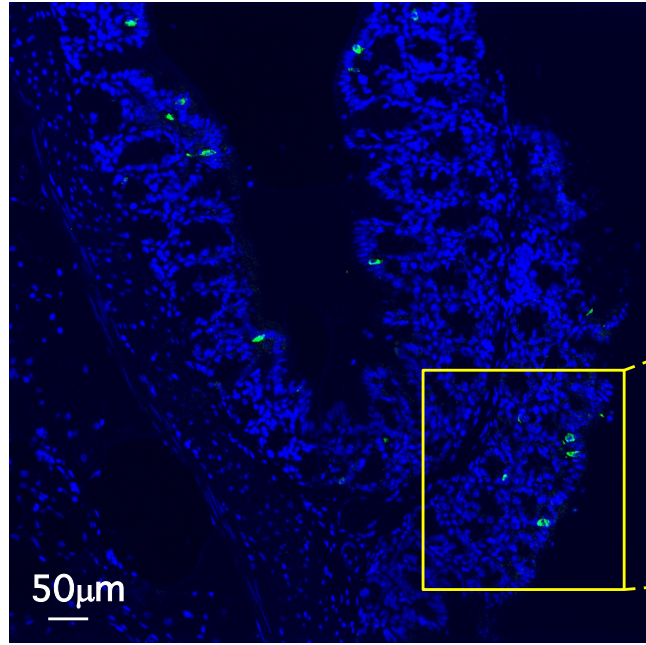
MCP-4 = chimasi espressa nei granuli di mastociti del connettivo



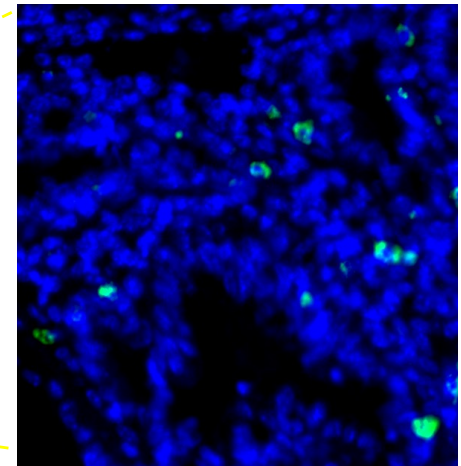
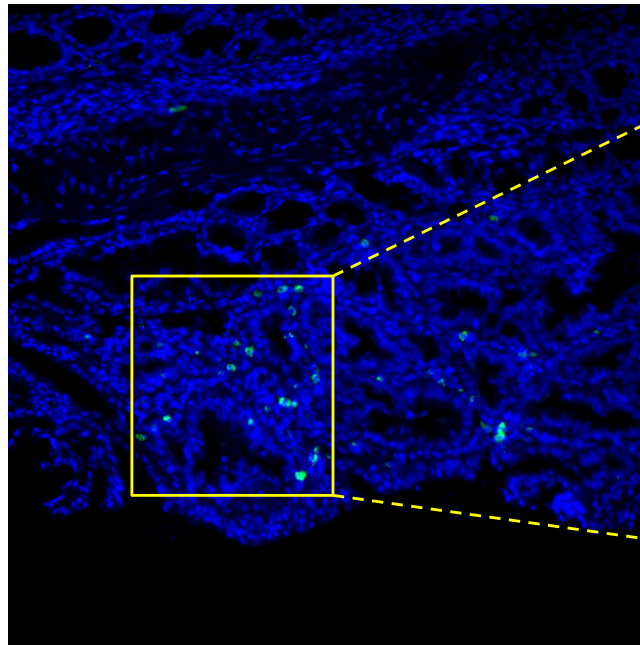
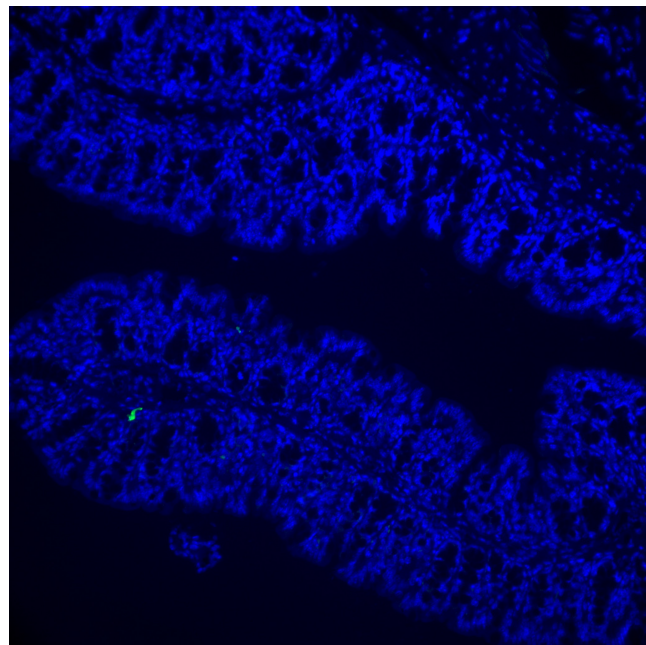
Colon sano

Tumore

mMCP-1



mMCP-4



Applicazioni degli anticorpi monoclonali

In vitro

Identificazione di sottopopolazioni cellulari mediante l'espressione di marcatori specifici

Identificazione e dosaggio di molecole di secrezione

Analisi funzionale di molecole solubili e di membrana

In vivo

Diagnostica per immagini

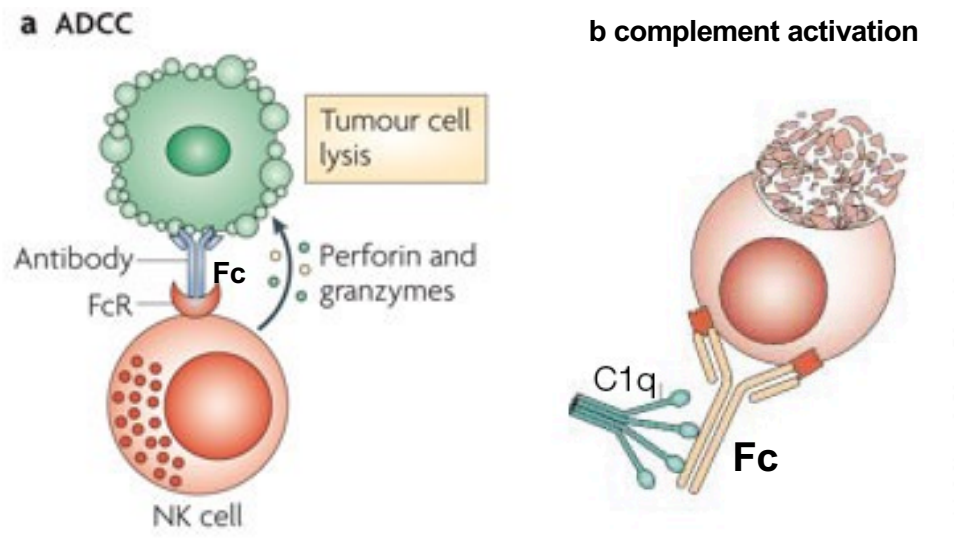
Immunoterapia:
tumori, malattie autoimmuni, malattie infettive

Anticorpi terapeutici ottenuti con la tecnologia dell'ibridoma

- Ha reso possibile l'ottenimento di grandi quantità di anticorpi specifici per un determinato antigene.
- Storicamente, il primo anticorpo monoclonale il cui uso è stato autorizzato nei pazienti è un anti-CD3 sui linfociti T, **MUROMONAB** o **ortoclone OKT3**, per trattare il rigetto acuto dopo trapianto di rene.
- L'uso prolungato di anticorpi murini nei pazienti determina l'insorgenza di sindromi "allergiche" caratterizzate da rigonfiamento delle articolazioni, eruzioni ed insufficienza renale.
- La produzione viene interrotta nel 2010

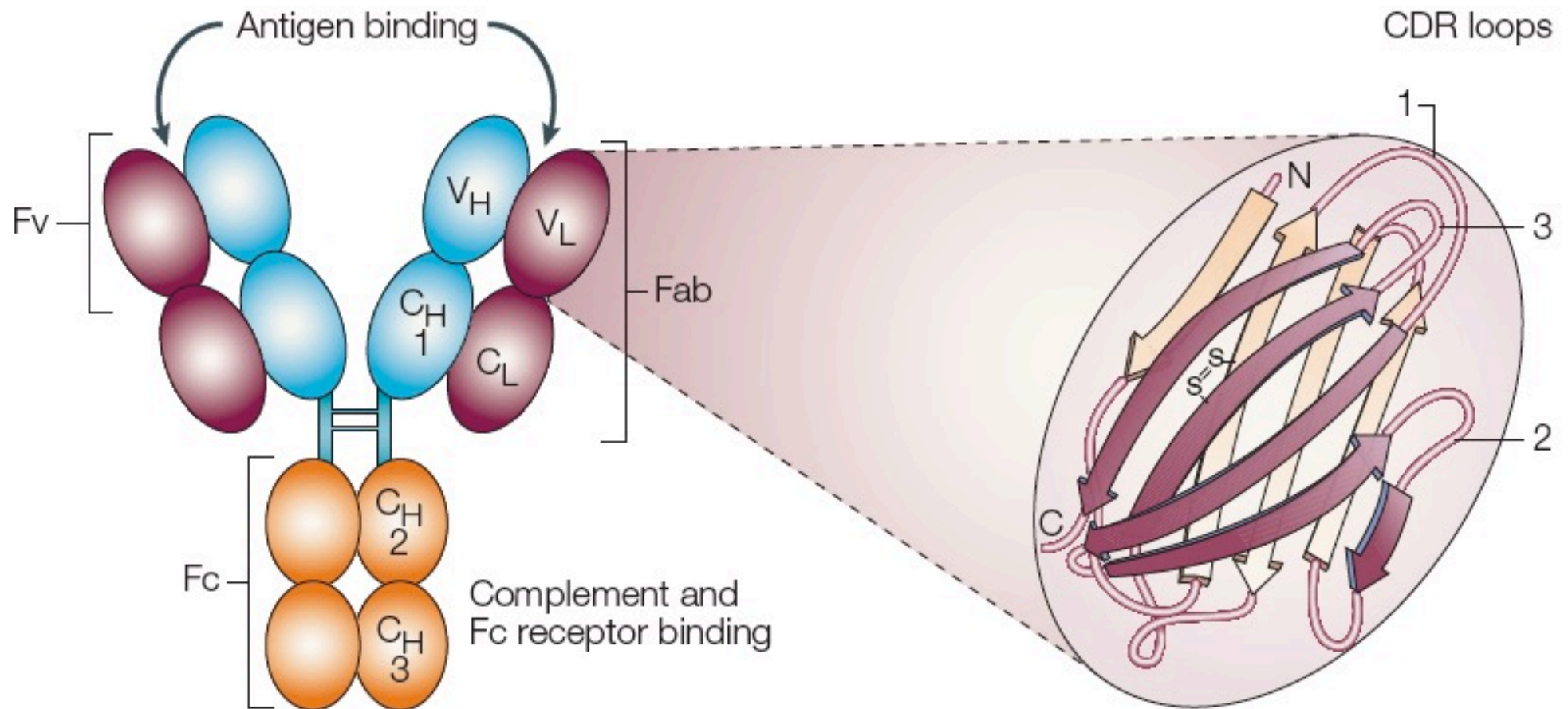
Obstacles to the *in vivo* use of therapeutic mAb

- HAMA (Human Anti-Mouse Antibodies) responses
- Murine mAb do not effectively activate Fc-mediated effector functions (ADCC, attivazione del complemento)

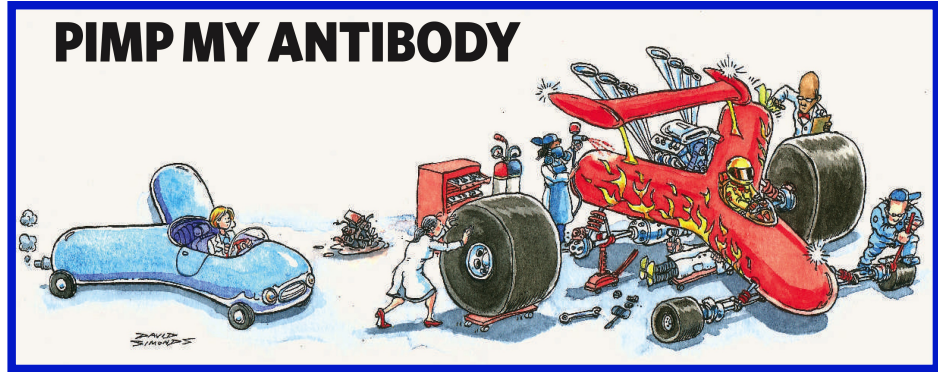


- Human Ab have longer half-life (FcRn-Brambell receptor -binding on endothelial cells, continuous Ig recycling)

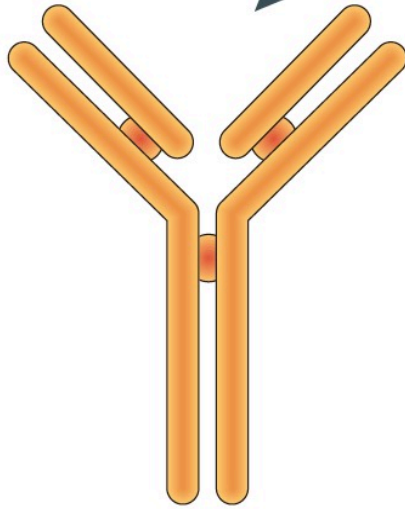
The modular structure of immunoglobulins



Monoclonal antibodies
can be genetically
manipulated!

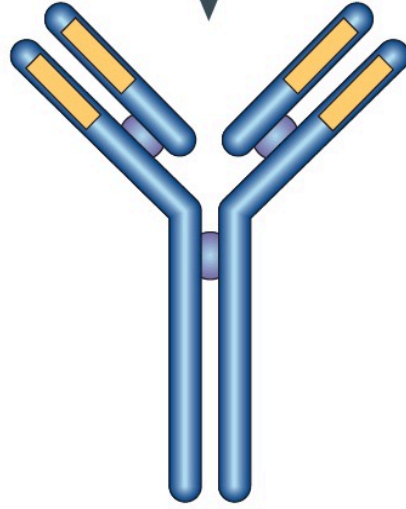


Mouse hybridoma



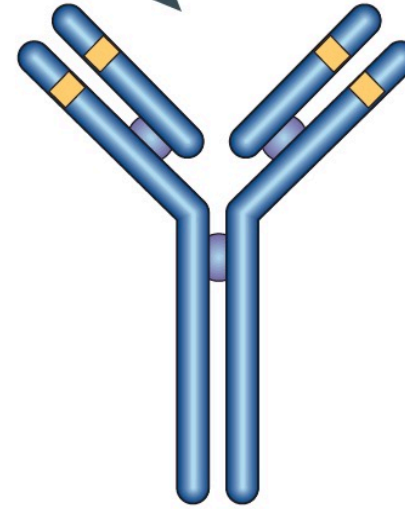
Mouse

Suffix: **-momab**



Chimeric
(65% human)

Suffix: **-ximab**

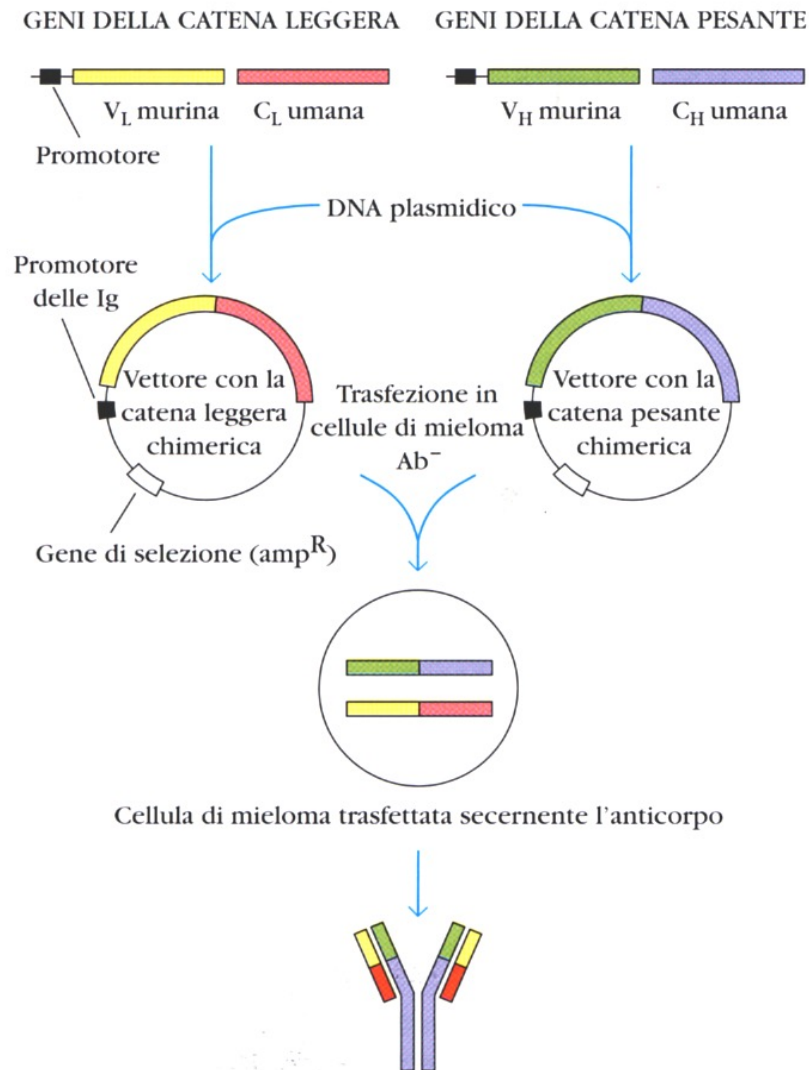


Humanized
(>90% human)

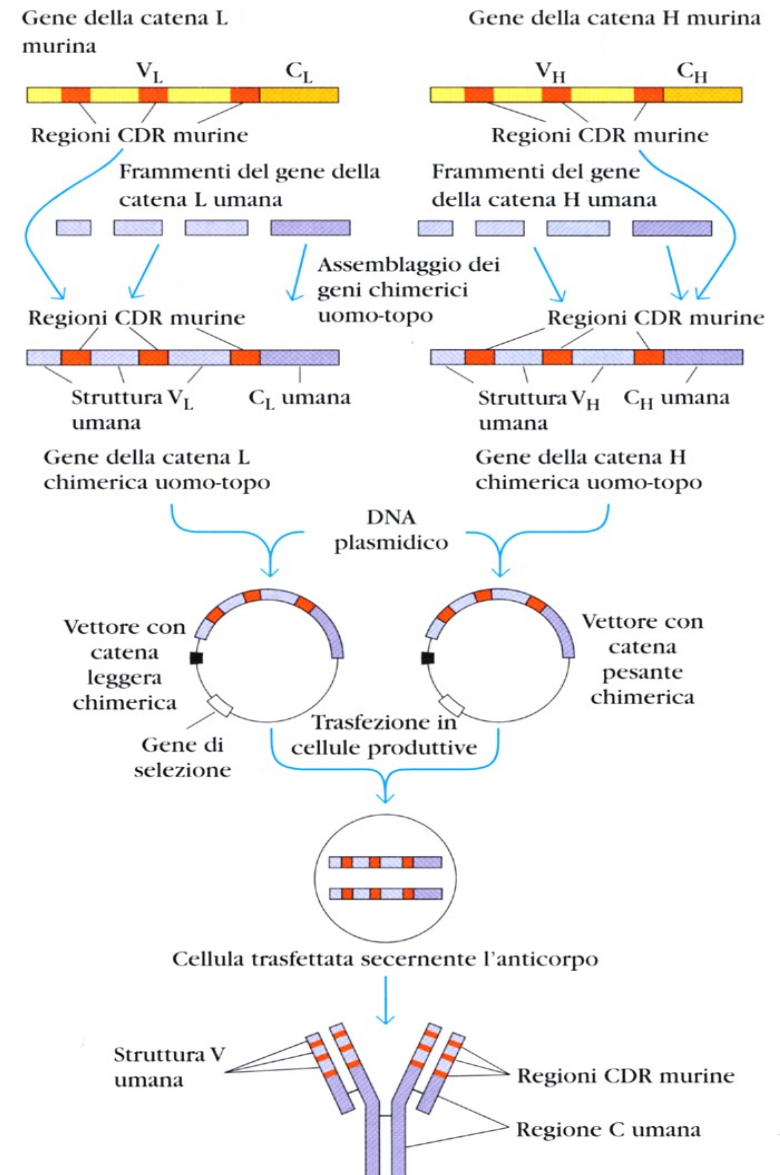
Suffix: **-zumab**

Produzione di anticorpi monoclonali chimerici ed umanizzati

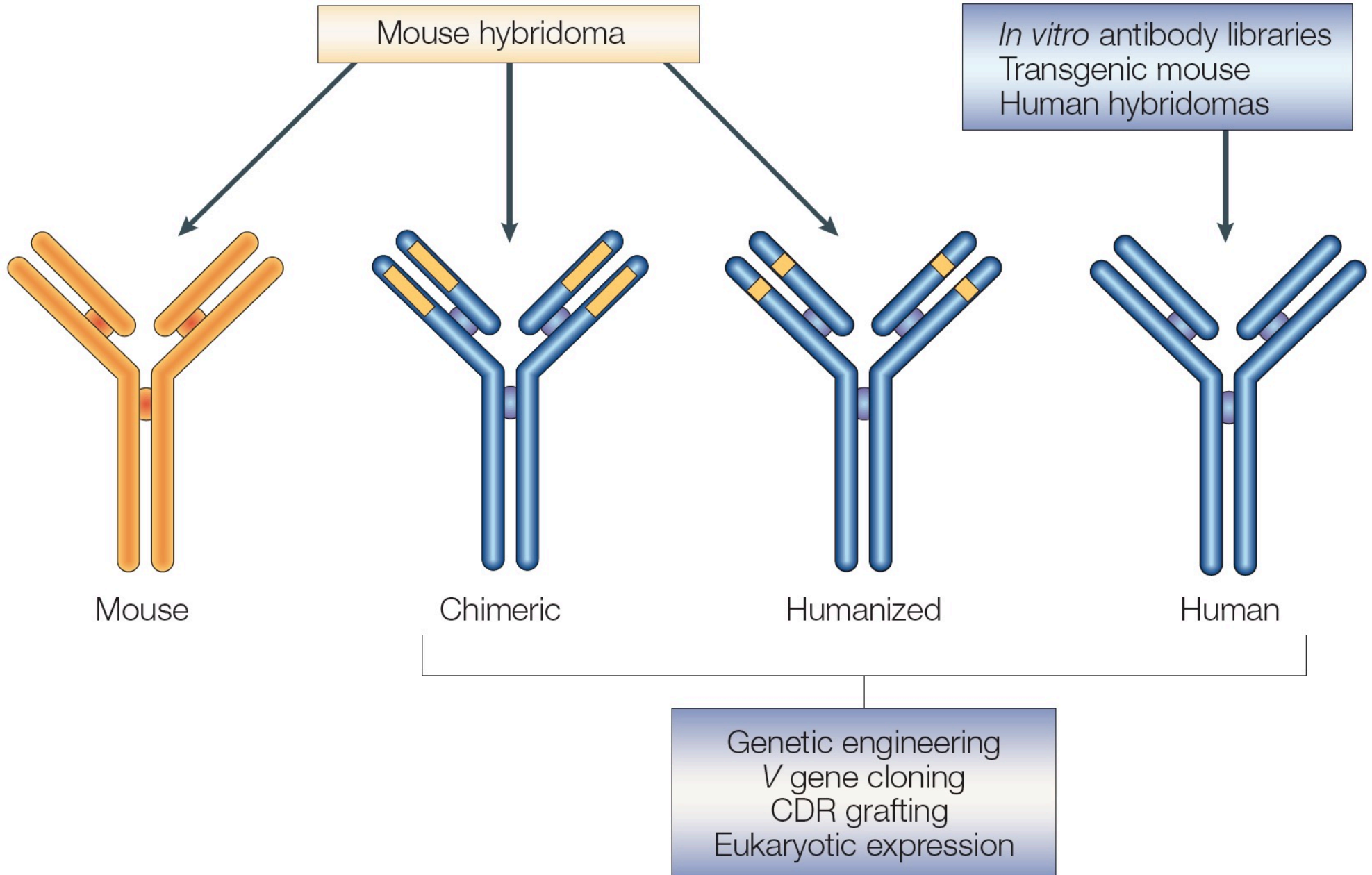
Anticorpo chimerico



Anticorpo umanizzato

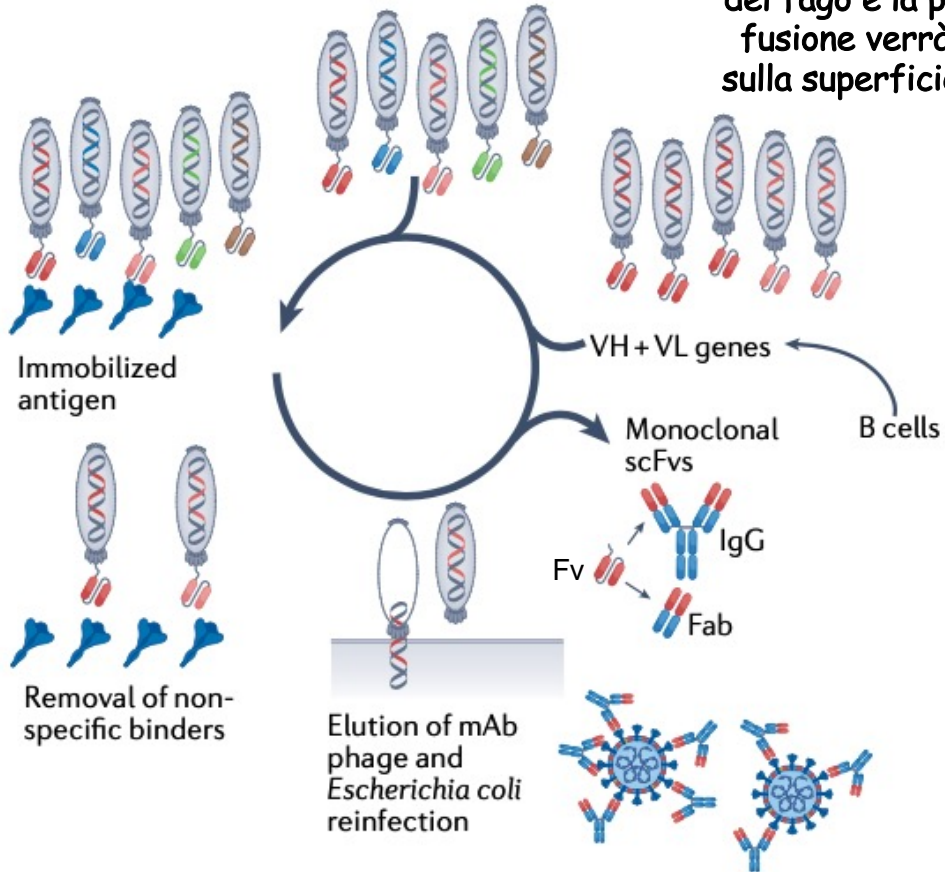


Antibody engineering



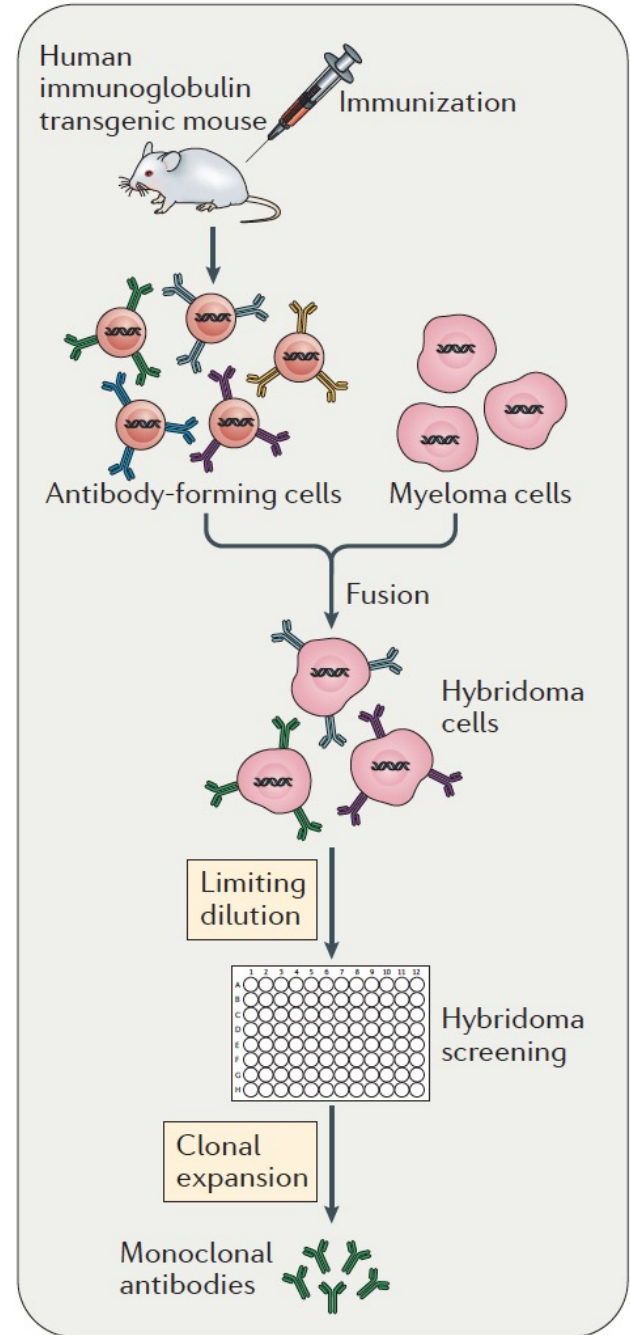
In vitro and in vivo human antibody techniques: phage display and transgenic mouse technologies

Human antibody library



I geni che codificano le regioni **VH** e **VL** vengono espressi con il gene della proteina di superficie del fago e la proteina di fusione verrà esposta sulla superficie del fago

Selezione dei fagi che espongono il frammento **Fv specifico** mediante assorbimento sull'antigene immobilizzato



Evolution of therapeutic antibody technologies and progress to the clinic

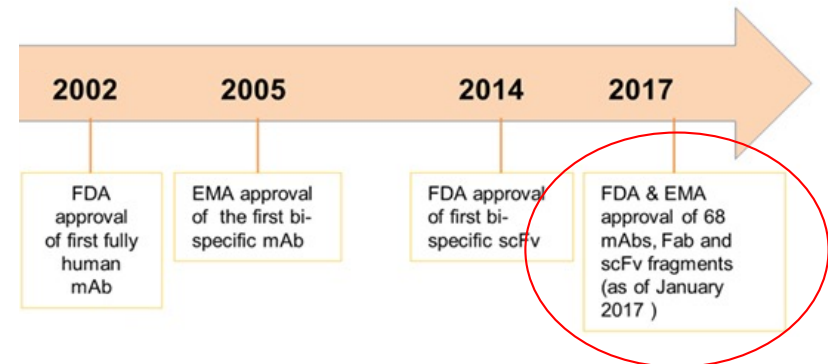
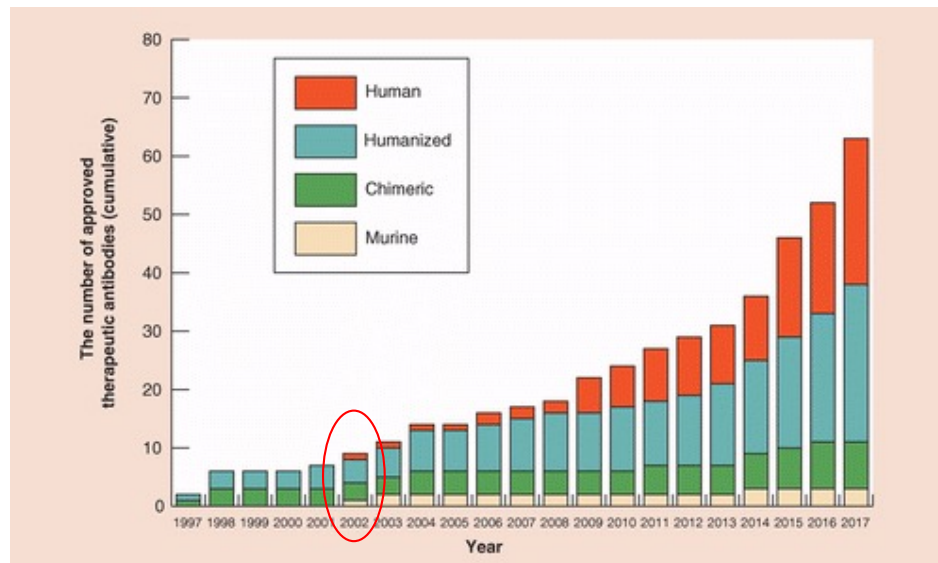
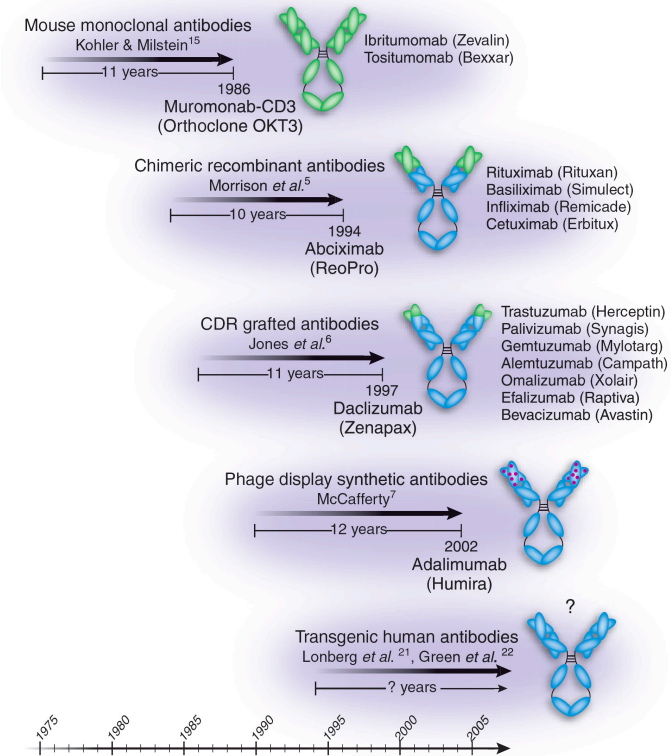
1. Murine Mabs

Manipolazione genetica dei mAb murini

- mAb chimerici (V murino, C umano)
- mAb umanizzati (solo CDR murini)

2. Human Mabs

- Phage display (= adalimumab)
- Transgenic mice (= panitumumab)



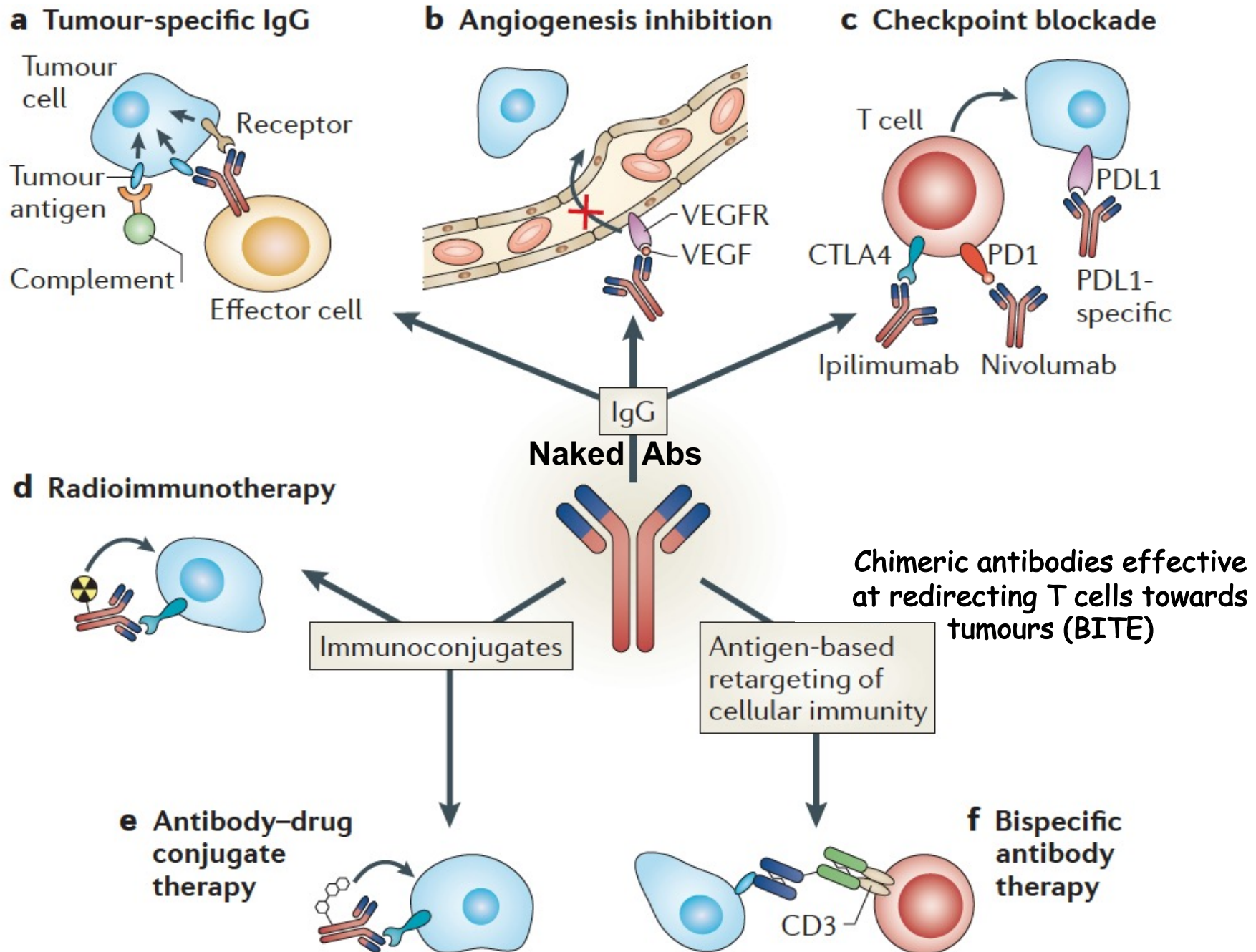
CAMPI DI APPLICAZIONE TERAPEUTICA DEGLI ANTICORPI MONOCLONALI

- **Malattie oncologiche**
- **Malattie autoimmuni**
- **Malattie allergiche**
- **Malattie infettive**

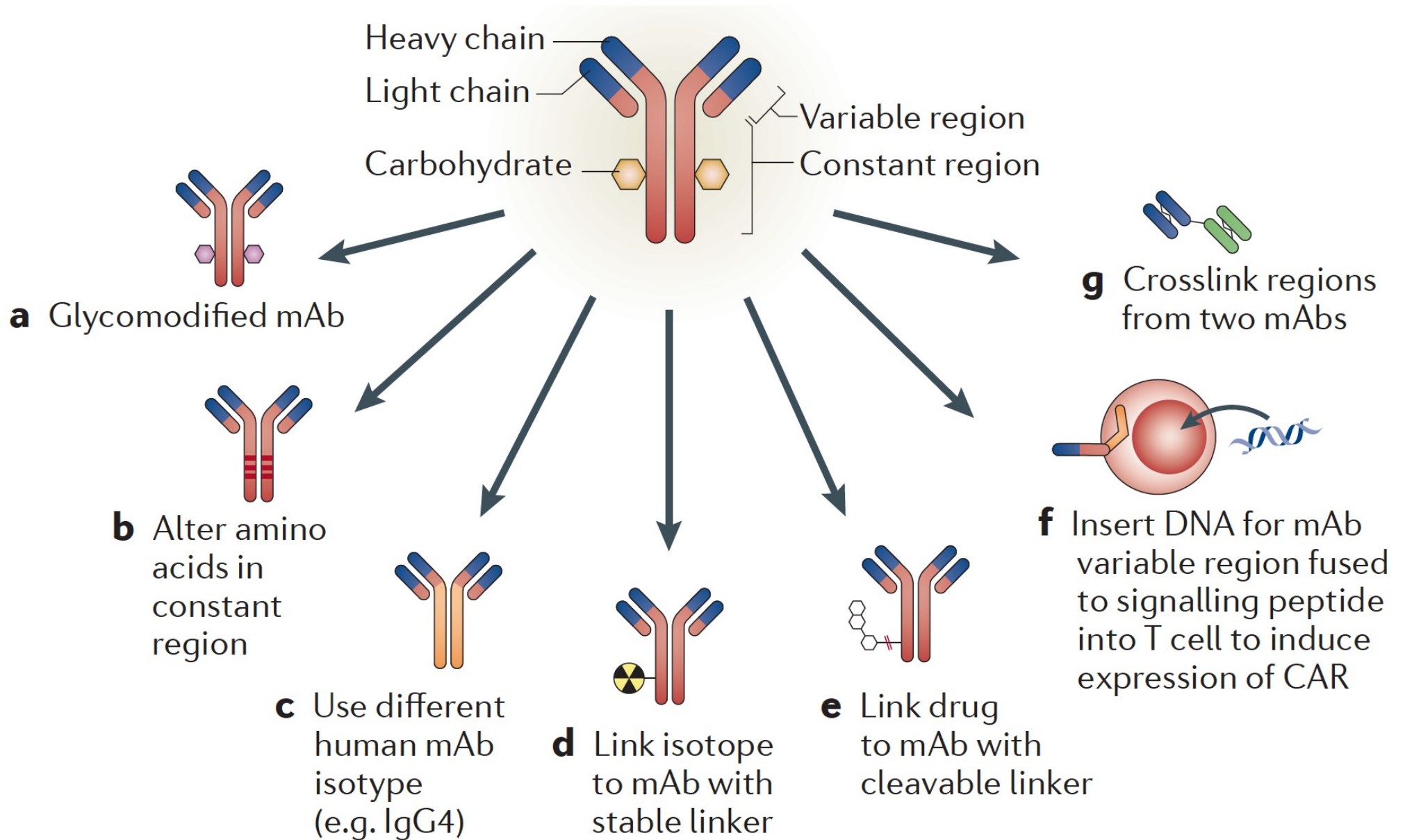
Nome	Specificità	Malattia
Trastuzumab (Herceptin)	Her2	Cancro della mammella
Rituximab	CD20 (B cells)	Linfoma Non-Hodgkin
Adalimumab (Humira)	TNF	Artrite reumatoide
Omalizumab (Xolair)	IgE	Asma
Motavizumab	Virus respiratorio sinciziale	Broncopolmonite

Qual è il razionale all'uso di anticorpi terapeutici?

Monoclonal Antibody-based therapeutic strategies

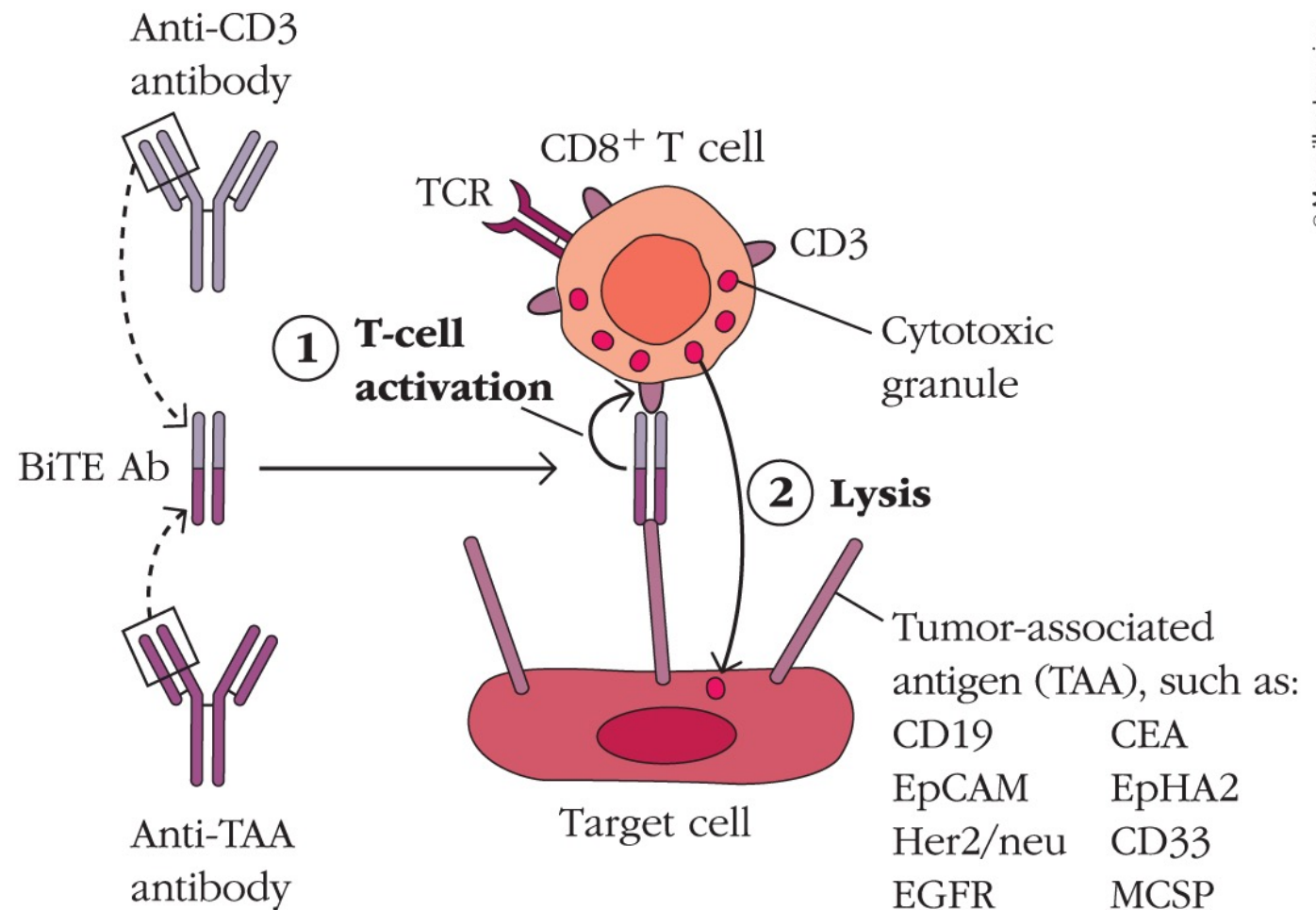


Modifying monoclonal antibody structure



Bispecific T-cell engagers (BiTEs) used in cancer immunotherapy

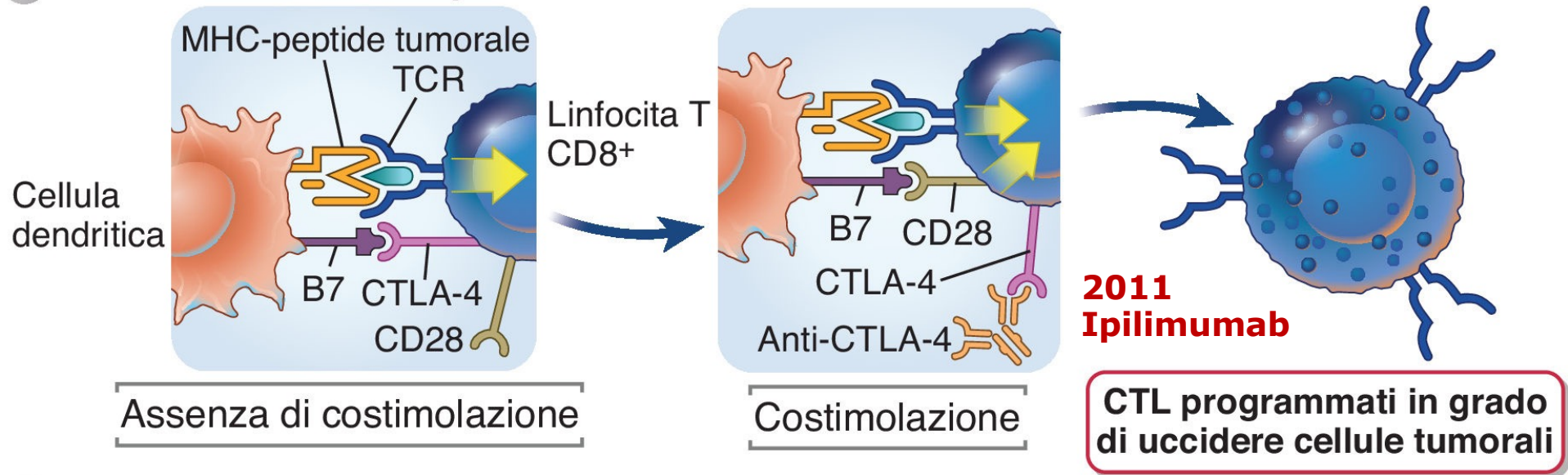
- BiTEs are made by combining light- and heavy-chain variable regions of two antibodies into a single chain
- recognize two target epitopes
- activate T cells



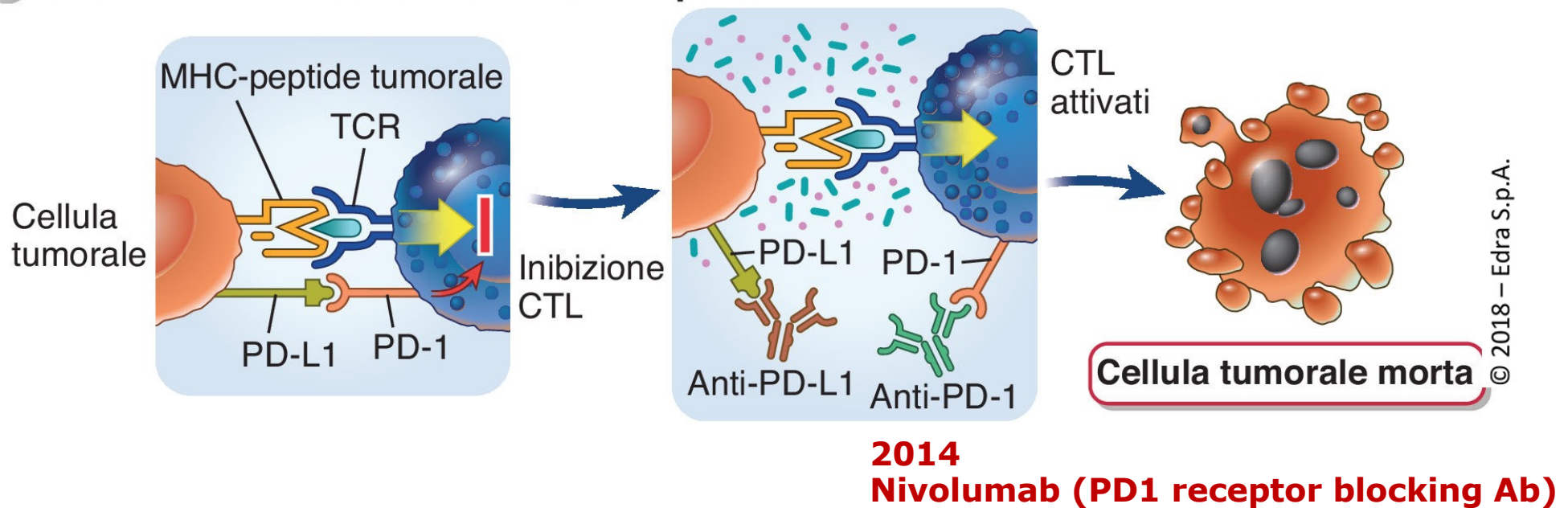
Anticorpi monoclonali inibiscono i check point immunologici

Blocco dei segnali di CTLA-4 o PD-1

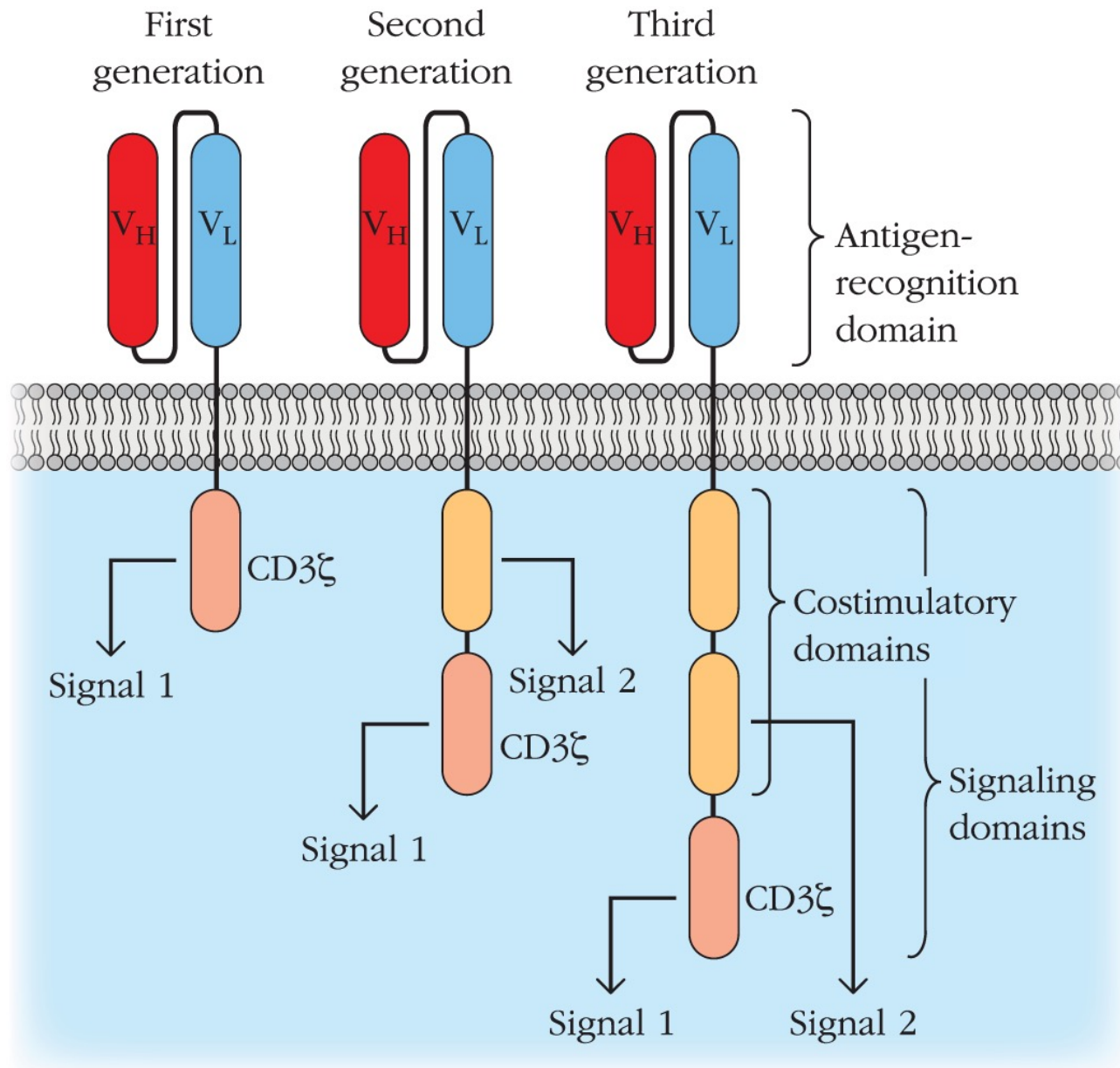
A Attivazione di una risposta antitumorale nel linfonodo



B Uccisione delle cellule tumorali da parte dei CTL



Driving Cancer Away with CAR T Cells

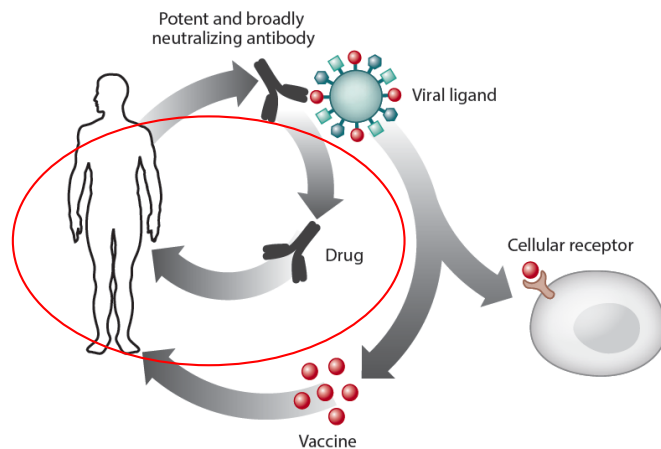
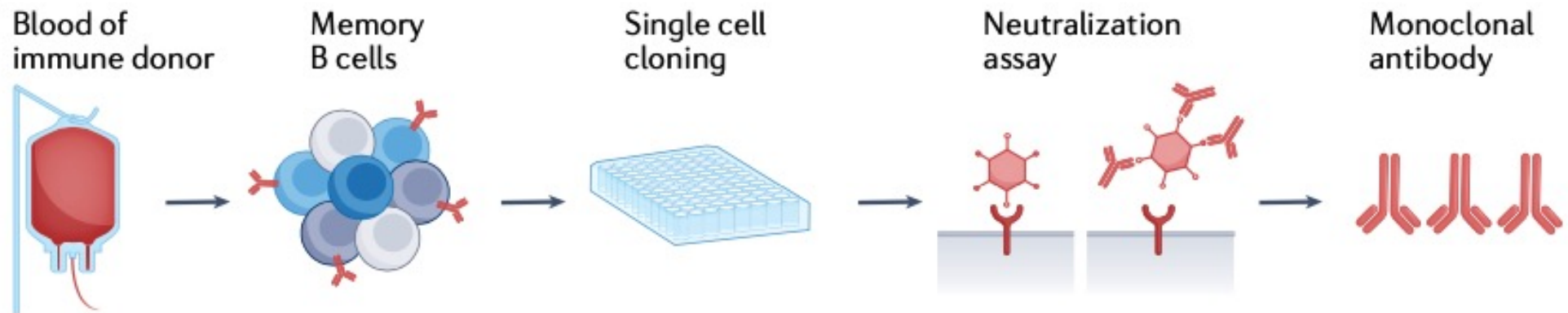
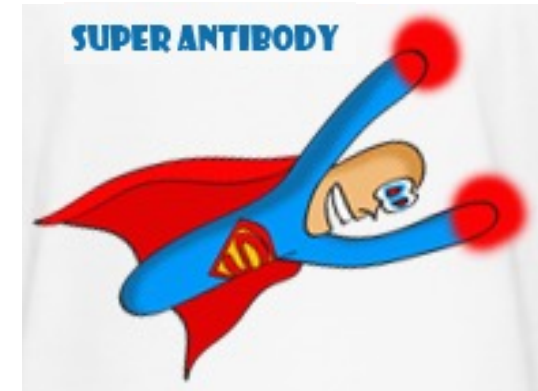


CAMPI DI APPLICAZIONE TERAPEUTICA DEGLI ANTICORPI MONOCLONALI

- Malattie cardiovascolari
- Malattie autoimmuni
- Malattie oncologiche
- Malattie allergiche
- Malattie infettive

Human monoclonal neutralizing antibodies : a novel agnostic approach

Only a very small proportion of infected individuals generates **broadly and potent neutralizing antibody**



Super-antibodies offer a new promise for prophylaxis and therapy of infections for viruses that are highly antigenically variable, are newly emerging or have pandemic potential

Human monoclonal antibodies for prevention or treatment of infection diseases

Table 1 | FDA-approved mAbs for infectious disease indications

Drug (brand name; company)	Target	Format	Technology	Indication	Year of FDA approval
Palivizumab (Synagis; MedImmune/AbbVie)	RSV	Humanized IgG1	Hybridoma	Prevention of RSV infection	1998
Raxibacumab (ABthrax/Anthrax; GlaxoSmithKline/Human Genome Sciences)	<i>Bacillus anthracis</i> PA	Human IgG1	Human scFv phage display library	Anthrax infection	2012
Bezlotoxumab (Zinplava; Merck & Co.)	<i>Clostridioides difficile</i> enterotoxin B	Human IgG1	Transgenic mice	Prevention of <i>C. difficile</i> infection recurrence	2016
Obiltoxaximab (Anthim; Elusys Therapeutics)	<i>B. anthracis</i> PA	Chimeric IgG1	Hybridoma	Prevention of inhalational anthrax	2016
Ibalizumab ^a (Trogarzo; TaiMed Biologics)	CD4 receptor (domain 2)	Humanized IgG4	Mice	Treatment of HIV-1 infection	2018
Ansumvimab (Ebanga; MedImmune/Ridgeback Biotherapeutics)	Ebola glycoprotein	Human IgG1	Human	Prevention and treatment of Ebola infection	2020
Atoltivimab, maftivimab and odesivimab (Inmaze; Regeneron Pharmaceuticals)	Ebola glycoprotein	Human IgG1	Transgenic mice	Prevention and treatment of Ebola infection	2020



FDA, US Food and Drug Administration; mAb, monoclonal antibody; PA, protective antigen; RSV, respiratory syncytial virus; scFv, single-chain variable fragment. ^aAntibody with a host target, rather than a pathogen target.

Antibody Therapy Shows Promise Against Ebola

