

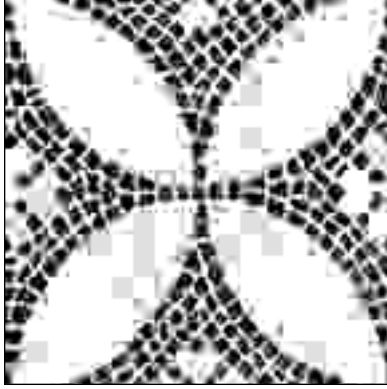
Sped. in A. P. 45% - art.2 comma 20/b legge 662/96 - n° 31 - Gennaio 1988 - Direttore responsabile: Sergio Rassu - Editore: Medical Systems S.p.A. Genova - Contiene I.P. - Stampa: Tipolitografia Nuova ATA Genova

www.medicalsystems.it  
http://medicalsystems.editoria.com

ISSN 0394 3291

# Caleidoscopio

*Italiano*



**Norman P. Kubasik**

## **Ibridomi ed anticorpi monoclonali**



**31**

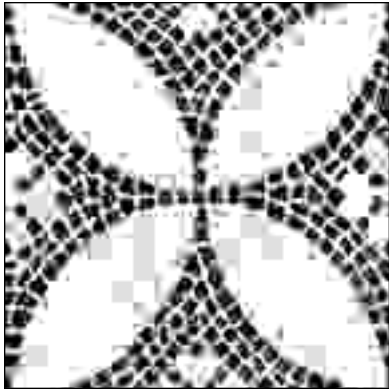
Direttore Responsabile  
**Sergio Rassu**

---

Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. 010 83.401  
Stampato a Genova 1988

# Caleidoscopio

*Italiano*



**Norman P. Kubasik**

The genesee Hospital Rochester (USA)



## **Ibridomi ed anticorpi monoclonali**

Traduzione e realizzazione grafica  
Sergio Rassu e Antonello Masala



Direttore Responsabile  
**Sergio Rassu**



---

Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. 010 83.401  
Stampato a Genova 1988

## ISTRUZIONI PER GLI AUTORI

**INFORMAZIONI GENERALI.** *Caleidoscopio* pubblica lavori di carattere monografico a scopo didattico su temi di Medicina. La rivista segue i requisiti consigliati dall'*International Committee of Medical Journal Editors*. Gli Autori vengono invitati dal Direttore Responsabile. La rivista pubblica anche monografie libere, proposte direttamente dagli Autori, redatte secondo le regole della Collana.

**TESTO.** La monografia deve essere articolata in paragrafi snelli, di rapida consultazione, completi e chiari. I contenuti riportati devono essere stati sufficientemente confermati. E' opportuno evitare di riportare proprie opinioni dando un quadro limitato delle problematiche. La lunghezza del testo può variare dalle 60 alle 70 cartelle dattiloscritte. Si prega di dattilografare su una sola facciata del foglio formato A4 con margini di almeno 25 mm. Usare dovunque doppi spazi e numerare consecutivamente. Ogni sezione dovrebbe iniziare con una nuova pagina.

**FRONTESPIZIO.** Deve riportare il nome e cognome dell'Autore(i) -non più di cinque- il titolo del volume, conciso ma informativo, la Clinica o Istituto cui dovrebbe essere attribuito il lavoro, l'indirizzo, il nome e l'indirizzo dell'Autore (compreso telefono, fax ed indirizzo di E-mail) responsabile della corrispondenza.

**BIBLIOGRAFIA.** Deve essere scritta su fogli a parte secondo ordine alfabetico seguendo le abbreviazioni per le Riviste dell'Index Medicus e lo stile illustrato negli esempi:

1) Björklund B., Björklund V.: Proliferation marker concept with TPS as a model. A preliminary report. *J. Nucl. Med. Allied. Sci* 1990 Oct-Dec, VOL: 34 (4 Suppl), P: 203.

2 Jeffcoate S.L. e Hutchinson J.S.M. (Eds): *The Endocrine Hypothalamus*. London. Academic Press, 1978.

Le citazioni bibliografiche vanno individuate nel testo, nelle tabelle e nelle legende con numeri arabi tra parentesi. La Redazione è collegata on-line con le più importanti Banche Dati (Medline, Cancerlit, AIDS etc) e fornisce ogni eventuale assistenza agli Autori.

**TABELLE E FIGURE.** Si consiglia una ricca documentazione iconografica (in bianco e nero eccetto casi particolare da concordare). Figure e tabelle devono essere numerate consecutivamente (secondo l'ordine di citazione nel testo) e separatamente; sul retro delle figure deve essere indicato l'orientamento, il nome dell'Autore ed il numero. Le figure realizzate professionalmente; è inaccettabile la riproduzione di caratteri scritti a mano libera. Lettere, numeri e simboli dovrebbero essere chiari ovunque e di dimensioni tali che, se ridotti, risultino ancora leggibili. Le fotografie devono essere stampe lucide, di buona qualità. Gli Autori sono responsabili di quanto riportato nel lavoro e dell'autorizzazione alla pubblicazione di figure o altro. Titoli e spiegazioni dettagliate appartengono alle legende, non alle figure stesse.

Su fogli a parte devono essere riportate le legende per le figure e le tabelle.

**UNITÀ DI MISURA.** Per le unità di misura utilizzare il sistema metrico decimale o loro multipli e nei termini dell'International system of units (SI).

**ABBREVIAZIONI.** Utilizzare solo abbreviazioni standard. Il termine completo dovrebbe precedere nel testo la sua abbreviazione, a meno che non sia un'unità di misura standard.

**PRESENTAZIONE DELLA MONOGRAFIA.** Riporre le fotografie in busta separata, una copia del testo e dei grafici archiviati su un dischetto da 3.5 pollici preferibilmente Macintosh.

Il dattiloscritto originale, le figure, le tabelle, il dischetto, posti in busta di carta pesante, devono essere spediti al Direttore Responsabile con lettera di accompagnamento. L'autore dovrebbe conservare una copia a proprio uso. Dopo la valutazione espressa dal Direttore Responsabile, la decisione sulla eventuale accettazione del lavoro sarà tempestivamente comunicata all'Autore. Il Direttore responsabile deciderà sul tempo della pubblicazione e conserverà il diritto usuale di modificare lo stile del contributo; più importanti modifiche verranno eventualmente fatte in accordo con l'Autore. I manoscritti e le fotografie se non pubblicati non si restituiscono.

L'Autore riceverà le bozze di stampa per la correzione e sarà Sua cura restituirle al Direttore Responsabile entro cinque giorni, dopo averne fatto fotocopia. Le spese di stampa, ristampa e distribuzione sono a totale carico della Medical Systems che provvederà a spedire all'Autore cinquanta copie della monografia. Inoltre l'Autore avrà l'opportunità di presentare la monografia nella propria città o in altra sede nel corso di una serata speciale.

L'Autore della monografia cede tutti i pieni ed esclusivi diritti sulla Sua opera, così come previsti dagli artt. 12 e segg. capo III sez. I L. 22/4/1941 N. 633, alla Rivista *Caleidoscopio* rinunciando agli stessi diritti d'autore (ed acconsentendone il trasferimento ex art. 132 L. 633/41). Tutta la corrispondenza deve essere indirizzata al Direttore Responsabile al seguente indirizzo:

**Dott. Sergio Rassu**  
**Via Pietro Nenni, 6**  
**07100 Sassari**

# Caleidoscopio

## *Italiano*

### **Editoriale**

*Dopo la pubblicazione dei volumi sul dosaggio radioimmunologico, fluoroimmunologico ed enzimologico, mi pare naturale e logica conseguenza la pubblicazione di questo lavoro del dottor Norman P. Kubasik su "Ibridomi ed anticorpi monoclonali".*

*Le premesse di ordine immunologico, poste nei volumi 9 e 11 del Caleidoscopio, vengono riprese in questo volume ed ampliate per dare un quadro, come solitamente sa fare l'Autore, chiaro e lucido.*

*Questo volume non rappresenta certo una revisione di quanto oggi si sa sugli anticorpi monoclonali ma vuol semplicemente porre una base per poter affrontare e capire i principi e le ragioni che stanno alla base del vertiginoso interesse ed impiego degli anticorpi monoclonali nel campo medico.*

*Ringrazio quindi il dottor Kubasik per questa ulteriore prova delle proprie capacità esemplificative e didattiche, sicuro che il volume incontrerà l'interesse che sinora hanno riscosso i precedenti.*

*Un invito, infine, a tutti i lettori a partecipare al concorso fotografico abbinato alla rivista. Inviare le vostre fotografie. I premi sono, ritengo, interessanti e questa iniziativa, se supportata dalla vostra inalienabile adesione, sarà seguita da altre, in campi differenti, che si ispireranno al principio di stabilire un contatto continuo e diretto con i nostri lettori.*

Sergio Rassa

**Figura 1. L'ANTIGENE**

Col termine di “antigene” viene definita “ogni sostanza capace di provocare una risposta immune” (la produzione di anticorpi). Col termine di “immunogeno” viene definita in maniera simile “ogni sostanza capace di indurre una risposta immune”. È stato suggerito da alcuni di sostituire il termine “antigene” con quello di “immunogeno”. Il termine “antigene” potrebbe quindi essere utilizzato per definire una sostanza capace di combinarsi con un anticorpo.

Gli antigeni sono sostanze (generalmente di basso peso molecolare) che, quando inoculate in un ospite, non inducono la formazione di anticorpi. Tuttavia l'antigene può essere reso antigenico se accoppiato ad una voluminosa sostanza estranea (per esempio proteina o polipeptide) per formare un antigene. Un determinante antigenico è una regione attiva ed esposta della molecola antigenica con la quale si combina l'anticorpo.

I termini “epitopi” ed “epitopi” possono essere usati per i determinanti antigenici.

**Figura 1 L'ANTIGENE**

---

**ANTIGENE**

Una sostanza capace di stimolare la produzione di anticorpi.

**IMMUNOGENO**

Una sostanza capace di indurre una risposta immune.

**APTENE**

Una sostanza di basso peso molecolare che non induce la formazione di anticorpi; viene usata anche per descrivere un determinante antigenico.

**DETERMINANTE  
ANTIGENICO**

Area esposta attiva dell'antigene con la quale si combina l'anticorpo: conosciuto anche come aptene o epitopo.

---

**Figura 2. L'ANTICORPO: DEFINIZIONE E FUNZIONI**

Gli anticorpi sono proteine sieriche e sono prodotti dalle cellule della serie linfoide. Essi appartengono alla famiglia delle immunoglobuline. Gli anticorpi hanno la capacità di reagire con la configurazione antigenica responsabile della loro produzione.

Gli anticorpi combattono le sostanze estranee con:

1. La neutralizzazione - Gli anticorpi bloccano efficacemente le sostanze estranee, impedendo la loro azione dannosa. La sostanza neutralizzata, insieme con l'anticorpo, viene quindi fagocitata e distrutta dai fagociti.
2. La formazione di complessi antigene-anticorpo. I complessi causano la precipitazione e la rimozione dell'antigene dal circolo.
3. L'agglutinazione - Gli anticorpi si attaccano direttamente alla superficie del batterio, collegando numerosi batteri tra loro e formando degli aggregati batterici relativamente grandi e non invasivi.
4. La batteriolisi - Gli anticorpi, insieme con il complemento, distruggono la parete cellulare batterica, eliminandola.
5. L'opsonizzazione - Gli anticorpi e il complemento aumentano la suscettibilità batterica alla fagocitosi.

**Figura 2. L'ANTICORPO: DEFINIZIONE E FUNZIONI**

---

**ANTICORPO**

Una proteina sierica prodotta dalla serie linfoide che appartiene alla famiglia delle immunoglobuline. Esso ha la capacità di reagire con la configurazione antigenica responsabile della sua produzione.

**LE PIU' IMPORTANTI FUNZIONI DELL'ANTICORPO SONO:**

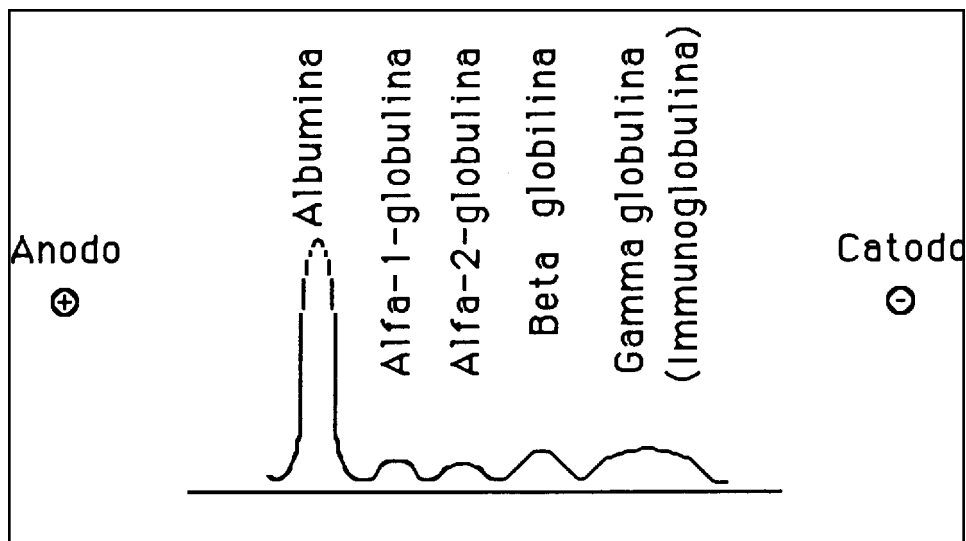
- Neutralizzazione
  - Formazione di complessi antigene-anticorpo
  - Agglutinazione
  - Batteriolisi
  - Opsonizzazione
-



**Figura 3. LE IMMUNOGLOBULINE: LA REGIONE DELLE GAMMA GLOBULINE**

La concentrazione delle proteine sieriche totali nell'adulto sano è da circa 6.0 a 8.3 grammi per decilitro. Circa il 60 per cento delle proteine totali è rappresentato da albumina, il resto da una miscela eterogenea di una classe conosciuta collettivamente come globuline. Le immunoglobuline sono la classe delle proteine che migrano nella regione gamma durante l'elettroforesi, e costituiscono circa il 10-20 per cento delle proteine totali.

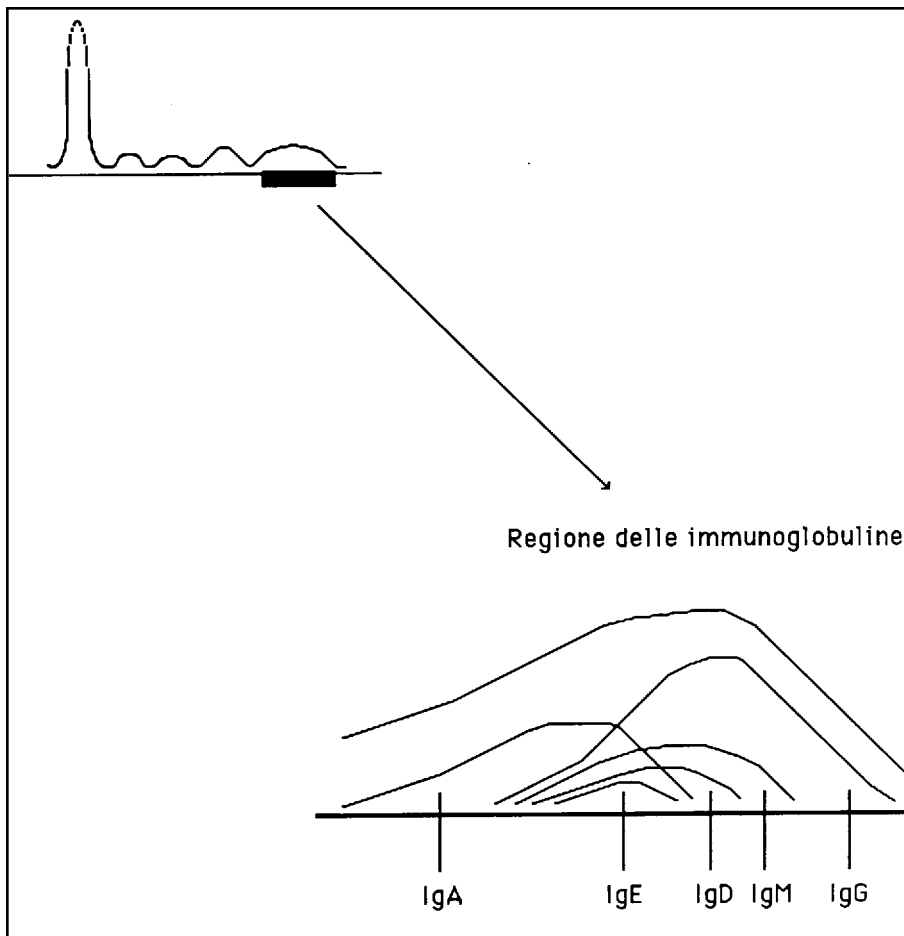
Figura 3. LE IMMUNOGLOBULINE: LA REGIONE DELLE GAMMA GLOBULINE



**Figura 4. LE IMMUNOGLOBULINE: LE CINQUE CLASSI PIU IMPORTANTI**

Esistono cinque classi più importanti di immunoglobuline nell'ampia regione gamma. In ordine di concentrazione decrescente, queste immunoglobuline (Ig) sono le IgG, IgA, IgM, IgD, e le IgE.

Figura 4. LE IMMUNOGLOBULINE: LE CINQUE CLASSI PIU IMPOR-  
TANTI



**Figura 5. LA STRUTTURA DELLE IMMUNOGLOBULINE**

Questa figura dimostra la struttura basilare a forma di Y della classe delle immunoglobuline G (IgG). Questa è composta da due tipi di catene polipeptidiche una catena pesante (più grande con un peso molecolare di 55.000-90.000) ed una catena leggera (più piccola con un peso molecolare di circa 25.000).

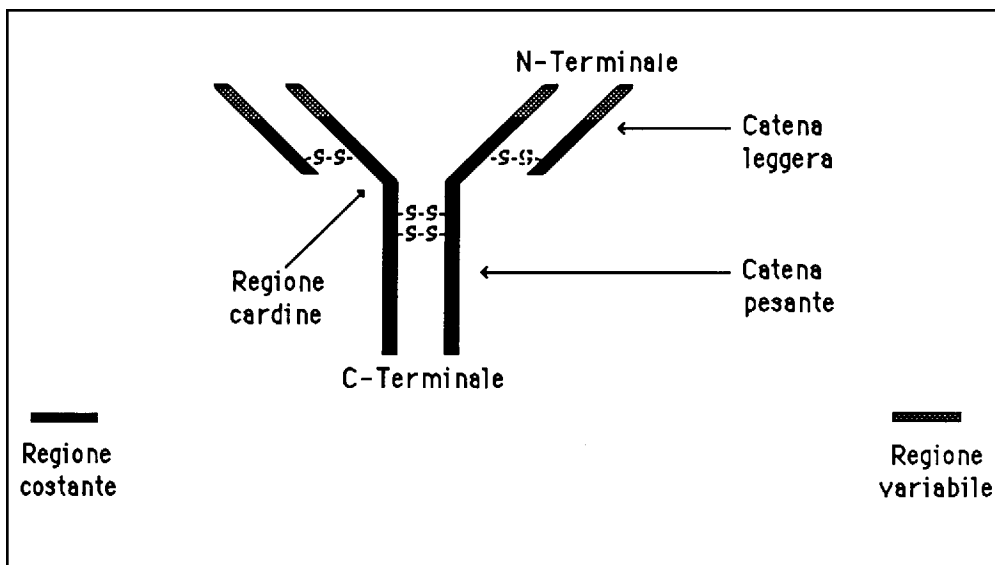
La molecola è formata da due catene pesanti identiche e da due identiche catene leggere legate insieme da ponti disolfuro. Il numero e l'esatta posizione dei ponti disolfuro differisce e caratterizzano ciascuna sottoclasse delle Ig.

Ciascuna catena leggera e pesante ha due differenti regioni funzionali. La porzione amino (N) terminale delle catene leggera e pesante viene definita regione variabile. La sequenza aminoacida differisce da anticorpo ad anticorpo, ed è responsabile della differenza dei siti combinanti che legano specificamente antigeni differenti.

La regione costante carbossi (C) terminale delle catene leggere e pesanti ha la stessa sequenza aminoacida per tutte le immunoglobuline di una sottoclasse ed è responsabile di altre e differenti funzioni.

Ciascuna delle IgG è capace di legare due molecole di antigene.

Figura 5. LA STRUTTURA DELLE IMMUNOGLOBULINE



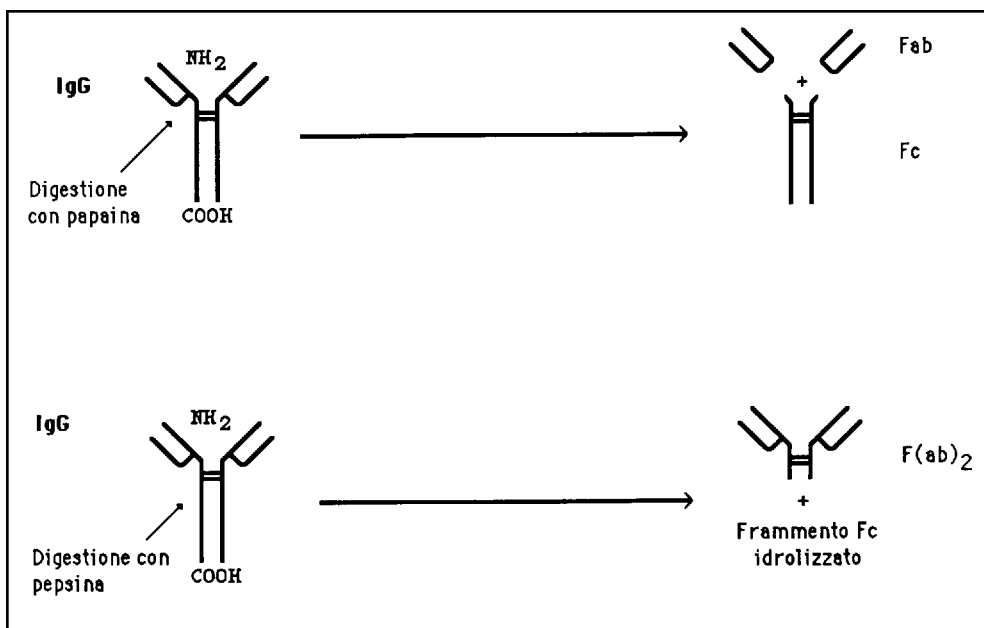
**Figura 6. LA FRAMMENTAZIONE DELLE IMMUNOGLOBULINE**

La conoscenza della struttura delle Ig è stata notevolmente aumentata dall'uso di enzimi proteolitici (papaina e pepsina) che degradano le molecole in subunità. Le molecole delle IgG possono essere digerite dalla papaina nella regione amino terminale dei ponti disulfidrilici tra le catene pesanti, con la formazione di due frammenti Fab ed un singolo frammento Fc. Ciascun frammento Fab possiede un sito combinante con l'antigene, e ciascuno si può combinare con l'antigene, ma non precipitarlo. Il frammento Fc manca della capacità di combinarsi con l'antigene, ma conserva ancora molte proprietà antigeniche e biologiche delle IgG.

La pepsina degrada la molecola di IgG nella regione carbossi terminale dei legami della catena disulfidrilica tra catene pesanti, lasciando un singolo frammento  $F(ab')_2$  che possiede due siti combinanti ancora capaci di precipitare gli antigeni. La porzione Fc viene idrolizzata.

Oltre al frammento Fab,  $F(ab')_2$ , ed Fc, viene usato il termine Fd per indicare la metà amino-terminale della catena pesante che partecipa nel sito legante l'antigene (la metà della catena pesante localizzata nel frammento Fab). Anche le altre classi di immunoglobuline possono essere frammentate con l'uso di enzimi proteolitici, ma i frammenti che ne risultano non sono sempre paragonabili a quelli ottenuti dalle IgG.

Figura 6. LA FRAMMENTAZIONE DELLE IMMUNOGLOBULINE



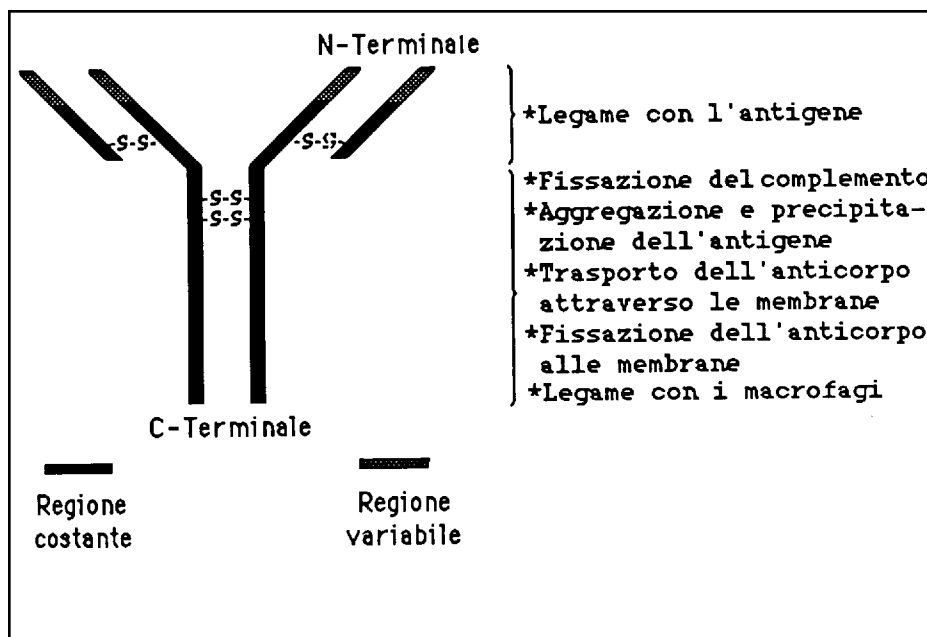


**Figura 7. RELAZIONI TRA STRUTTURA/FUNZIONE DELL'ANTI-CORPO**

Come mostrato nella figura 5 (Struttura delle immunoglobuline), la regione variabile della molecola delle immunoglobuline, contiene la sequenza aminoacida eterogenea, così come i residui che prendono contatto con l'antigene. L'eterogeneità aminoacidica della regione variabile rende possibile la produzione di un grosso numero di strutture tridimensionali complementari per forma all'enorme numero di antigeni estranei. E' stato calcolato che i vertebrati hanno la capacità, geneticamente determinata di produrre circa 100.000.000 differenti anticorpi (siti leganti l'antigene).

La regione costante delle immunoglobuline è responsabile della distruzione degli antigeni estranei attraverso la fissazione del complemento, il legame dei macrofagi, e l'aggregazione e precipitazione dell'antigene.

Figura 7. RELAZIONI TRA STRUTTURA/FUNZIONE DELL'ANTICORPO



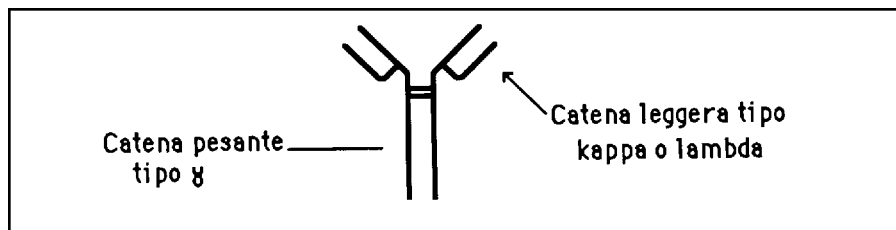
**Figura 8. LE CLASSI PIU IMPORTANTI DELLE IMMUNOGLOBULINE: IgG-FUNZIONE E STRUTTURA**

Le classi delle immunoglobuline vengono prodotte nel tessuto linfoide del corpo. Ciascuna delle principale classi di Ig ha un tipo diverso di catena pesante, benchè esse siano tutte molto simili nella struttura globale e nel peso molecolare. In ciascuna classe di Ig troviamo due tipi di catene leggere (kappa e lambda). In una data molecola, tutte le catene pesanti sono della stessa classe e tutte le catene leggere sono o kappa o lambda (ma mai miste). Le molecole vengono chiamate immunoglobuline Ig-kappa o Ig-lambda.

La classe delle IgG è la più grande delle immunoglobuline, ha una lunga emivita ( $T_{1/2}$ ) nel siero, ed ha una elevata velocità di sintesi. Le più importanti funzioni biologiche delle IgG comprendono la fissazione del complemento, la neutralizzazione di tossine, il transfer placentale, e il legame ai macrofagi. Si ritiene che le IgG forniscano il più grosso contributo immunitario contro la maggior parte degli agenti infettanti che utilizzano la via ematica per la disseminazione (inclusi batteri, virus, parassiti, e funghi).

Nella figura 9 vengono discusse le sottoclassi delle IgG.

Figura 8. **LE CLASSI PIU IMPORTANTI DELLE IMMUNOGLOBULINE: IgG-FUNZIONE E STRUTTURA**



<b>Concentrazione sierica media (g/dl)</b>	<b>1.24</b>
<b>% delle Ig sieriche totali</b>	<b>73%</b>
<b>Peso molecolare</b>	<b>150.000</b>
<b>T 1/2 (giorni)</b>	<b>23</b>
<b>Velocità di sintesi (mg/Kg peso corporeo/giorno)</b>	<b>33</b>
<b>Principali funzioni biologiche</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Fissa il completamento</li> <li>*Neutralizza tossine</li> <li>*Transfert placentale</li> <li>*Legame sui macrofagi</li> </ul>

**Figura 9. SOTTOCLASSI DELLE IMMUNOGLOBULINE G**

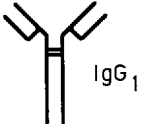
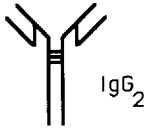
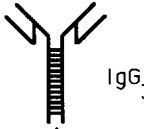
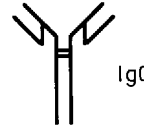
È al di là dello scopo di questo volume discutere adeguatamente tutte le sottoclassi identificate dei più importanti gruppi di immunoglobuline. Questa figura presenta un breve riassunto delle sottoclassi delle IgG per mettere al corrente il lettore di alcune informazioni basilari.

Le IgG costituiscono circa il 75% delle Ig totali presenti nel siero di un individuo normale. È possibile identificare quattro principali sottoclassi di IgG, basandosi su una sottile differenza sia nella struttura antigenica che sui ponti disolfuro tra le catene:

- IgG1 - circa il 66% delle totali
- IgG2 - circa il 23% delle totali
- IgG3 - circa il 7% delle totali
- IgG4 - circa il 4% delle totali

Nonostante una forte cross-reattività antigenica, ciascuna sottoclasse delle IgG ha almeno due particolari determinanti antigenici. Soltanto le IgG4 sono incapaci di fissare il complemento. Il legame ai monociti o ai macrofagi (capacità citofilica) è più marcato per le IgG1 e le IgG3. La struttura base delle sottoclassi delle IgG sono illustrate nella figura 9.

Figura 9. SOTTOCLASSI DELLE IMMUNOGLOBULINE G

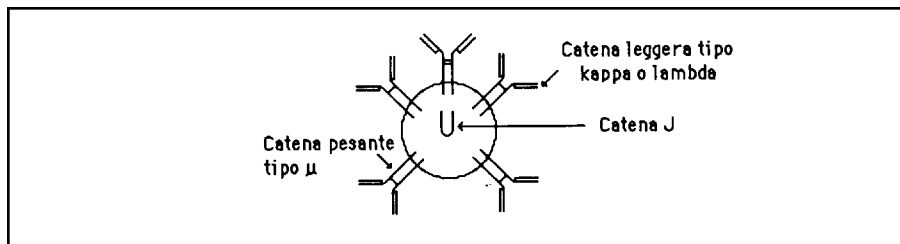
Struttura catena S-S	Denominazione catena pesante	Peso molecolare	Concentrazione sierica normale (gr/dl)	T 1/2 (giorni)
 IgG <sub>1</sub>	1	146.000	0.9	21
 IgG <sub>2</sub>	2	146.000	0.3	20
 IgG <sub>3</sub> ↑ Possono essere sino a 15	3	165.000	0.1	7
 IgG <sub>4</sub>	4	146.000	0.05	21

**Figura 10. LE CLASSI PIU IMPORTANTI DELLE IMMUNOGLOBULINE: IgM-FUNZIONE E STRUTTURA**

Le immunoglobuline IgM sono fisicamente le più voluminose delle Ig, e, a causa delle loro dimensioni, esse sono generalmente limitate nel movimento all'interno della stessa corrente ematica. Circa il 7% delle immunoglobuline sieriche sono IgM, hanno una emivita di circa cinque giorni.

Le IgM sono efficienti agglutinatrici di particolari antigeni (come batteri e globuli rossi), ed inoltre fissano il complemento. Le IgM sembra siano di particolare importanza negli stadi iniziali della risposta immune primaria. L'introduzione di un corpo estraneo in un'ospite stimola la sintesi di globuline del tipo IgM e IgG. I livelli sierici degli anticorpi tipo IgM raggiungono il picco più precocemente delle IgG, ma diminuiscono anche più rapidamente.

Figura 10. **LE CLASSI PIU IMPORTANTI DELLE IMMUNOGLOBULINE: IgM-FUNZIONE E STRUTTURA**



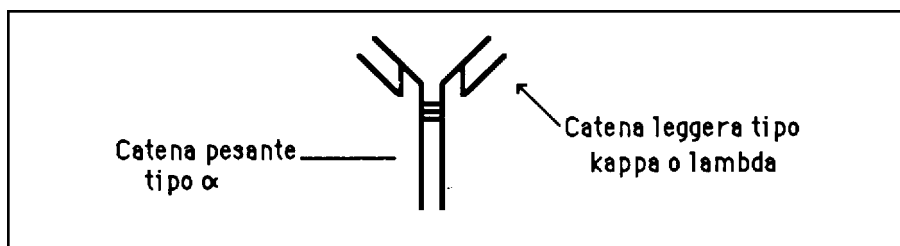
<b>Concentrazione sierica media (g/dl)</b>	<b>0.12</b>
<b>% delle Ig sieriche totali</b>	<b>7%</b>
<b>Peso molecolare</b>	<b>900.000</b>
<b>T 1/2 (giorni)</b>	<b>5</b>
<b>Velocità di sintesi (mg/Kg peso corporeo/giorno)</b>	<b>7</b>
<b>Principali funzioni biologiche</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Fissa il complemento</li> <li>*Elevate attività battericida</li> <li>*Agglutinazione efficiente</li> <li>*Non transfer placentale</li> </ul>



**Figura 11 LE CLASSI PIU IMPORTANTI DELLE IMMUNOGLOBULINE: IGA-FUNZIONE E STRUTTURA**

Le IgA sieriche costituiscono circa il 20 per cento della concentrazione delle immunoglobuline totali presenti in un campione di siero normale, ed hanno una emivita di circa 6 giorni. A differenza delle IgG, le IgA sieriche non sembra abbiano una ovvia proprietà speciale essenziale alla difesa dell'ospite. La loro funzione primaria viene vista nel sistema secretorio esterno (*vedi la figura 12*).

**Figura 11 LE CLASSI PIU IMPORTANTI DELLE IMMUNOGLOBULINE: IGA-FUNZIONE E STRUTTURA**



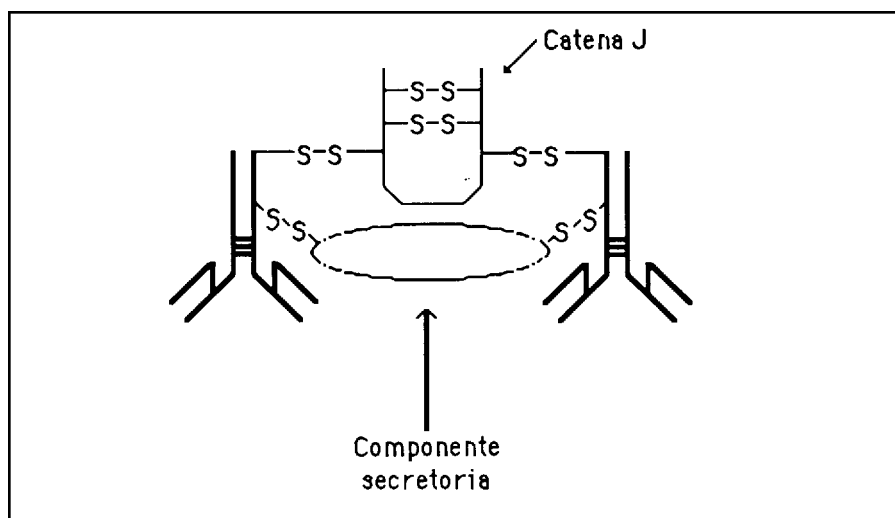
<b>Concentrazione sierica media (g/dl)</b>	<b>0.28</b>
<b>% delle Ig sieriche totali</b>	<b>19%</b>
<b>Peso molecolare</b>	<b>180.000</b>
<b>T 1/2 (giorni)</b>	<b>6</b>
<b>Velocità di sintesi (mg/Kg peso corporeo/giorno)</b>	<b>24</b>
<b>Principali funzioni biologiche</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Anticorpo secretorio</li> <li>*Non fissa il complemento</li> <li>*Non transfert placentale</li> </ul>

**Figura 12. IgA - SECRETORIA**

La IgA secretoria ha una molecola di dimensioni superiori alla IgA, e viene prodotta in concentrazioni elevate nel tessuto linfoide che riveste il tratto gastrointestinale, respiratorio, e genito-urinario. La IgA presente in queste secrezioni si combina con una proteina chiamata “componente secretoria” (SC), che sembra protegga la molecola dall’azione degli enzimi proteolitici normalmente presente in queste vie. Questa protezione fornita dalla SC è importante, poichè la IgA è importante nel difendere il tratto gastrointestinale (che contiene potenti enzimi proteolitici) contro gli entero-virus. La IgA secretoria è la prima linea di difesa presente sulla superficie esterna.

La catena J (o catena di “unione”) -peso molecolare circa 15,000- ha un ruolo nella polimerizzazione delle unità monomeriche di IgA attraverso i ponti sulfidrilici.

Figura 12. IgA - SECRETORIA



\* Peso molecolare di 370.000

\* Concentrazione sierica media (g/dl) = 0.003

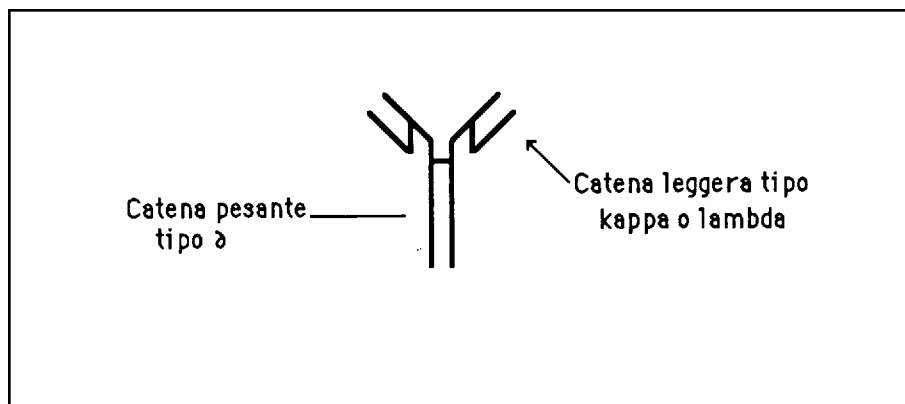
\* Prodotto in concentrazione elevate del tessuto linfoide che riveste i tratti gastrointestinale, respiratorio e genitourinario.

\* Prima linea di difesa presente sulle superfici esterne.

**Figura 13. LE CLASSI PIU IMPORTANTI DELLE IMMUNOGLOBULINE: IgD-FUNZIONE E STRUTTURA**

La classe delle immunoglobuline IgD comprende circa l'1 per cento del totale delle Ig presenti nel siero di un adulto normale. Non è stata ancora assegnata alcuna particolare funzione biologica alle IgD.

Figura 13. **LE CLASSI PIU IMPORTANTI DELLE IMMUNOGLOBULINE: IgD-FUNZIONE E STRUTTURA**

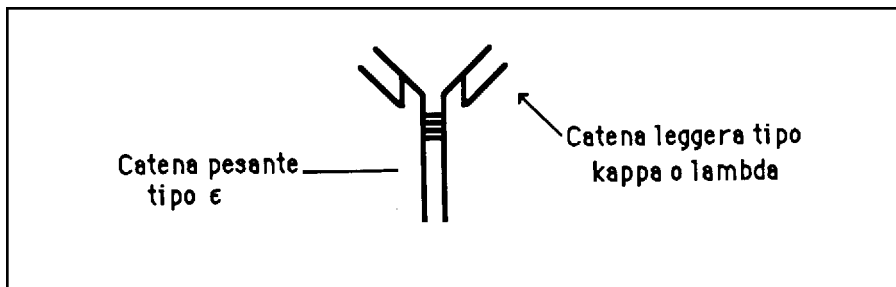


<b>Concentrazione sierica media (g/dl)</b>	<b>0.003</b>
<b>% delle Ig sieriche totali</b>	<b>1%</b>
<b>Peso molecolare</b>	<b>900.000</b>
<b>T 1/2 (giorni)</b>	<b>3</b>
<b>Velocità di sintesi (mg/Kg peso corporeo/giorno)</b>	<b>0.4</b>
<b>Principali funzioni biologiche</b>	<b>?</b>

**Figura 14. LE CLASSI PIU IMPORTANTI DELLE IMMUNOGLOBULINE: IGE-FUNZIONE E STRUTTURA**

Nel siero sono normalmente presenti soltanto piccole tracce di IgE, ed è necessario un immunodosaggio specifico (RIA o EIA) per la loro determinazione. La IgE ha una emivita di circa due giorni nella circolazione periferica, e viene prodotta principalmente lungo le vie respiratorie ed il tratto intestinale. Essa ha la capacità di attaccarsi alla cute umana ed iniziare parte della reazione allergica. Quando una allergene si lega all'anticorpo, vengono rilasciate amine (istamina, serotonina, bradichinina), che intervengono nella risposta anafilattica locale.

Figura 14. LE CLASSI PIU IMPORTANTI DELLE IMMUNOGLOBULINE: IGE-FUNZIONE E STRUTTURA



Concentrazione sierica media (g/dl)	0.00005
% delle Ig sieriche totali	---
Peso molecolare	200.000
T 1/2 (giorni)	2
Velocità di sintesi (mg/Kg peso corporeo/giorno)	0.02
Principali funzioni biologiche	* Anticorpi reaginici (inizia reazione allergica)



**Figura 15. IL SISTEMA IMMUNE E LA PRODUZIONE DI ANTICORPO**

La popolazione linfocitaria dà origine nell'uomo ai due principali sistemi immunitari: cellulare ed umorale. I linfociti originano da una cellula staminale nel midollo osseo.

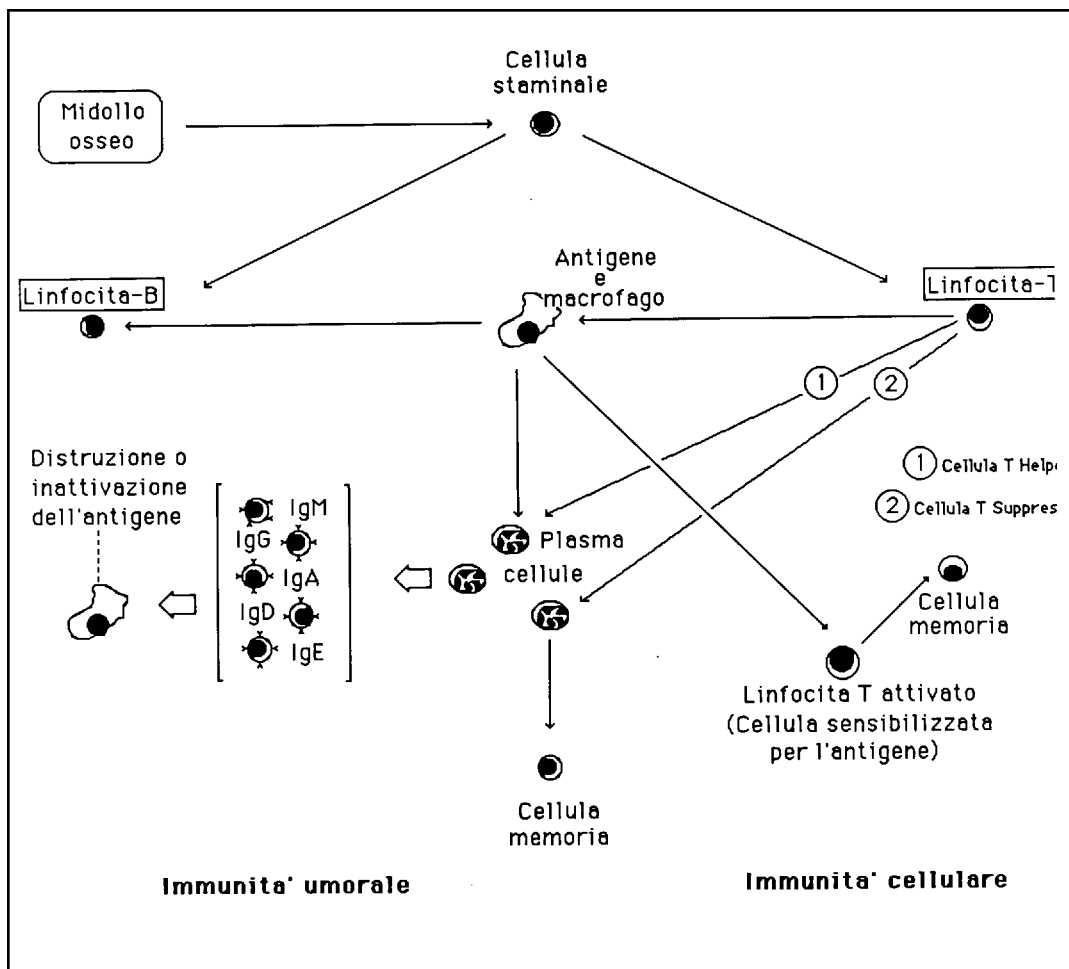
I linfociti possono essere morfologicamente e immunologicamente suddivisi in linfociti-B (cellule-B, indipendenti dal timo) o linfociti-T (cellule-T, timo dipendenti). Quando un antigene entra all'interno del corpo, incontra un macrofago, viene "processato", e quindi trasportato attraverso i vasi linfatici sino al linfonodo più vicino. Qui l'antigene "processato" dal macrofago interagisce con i:

**LINFOCITI-T.** I linfociti-T si differenziano in cellule memoria e cellule che controllano il susseguente riconoscimento dell'antigene e l'ipersensibilità ritardata. Essi sono responsabili della immunità cellulare. La produzione di anticorpi, benché funzione delle cellule-B, è sotto il controllo regolatorio delle cellule-T (helpers e soppressori). Le cellule-T a lunga vita formano l'area corticale di linfonodi e alcune aree periferiche del sistema linfoide. Alcune popolazioni delle cellule-T migrano nell'area di infiammazione, mentre altre costituiscono le cellule della memoria. Le cellule-T costituiscono circa il 65-75% della popolazione linfocitaria.

**LINFOCITI-B.** I linfociti-B si trovano principalmente in circolo nel sangue e nei linfonodi, e costituiscono circa il 35% dei linfociti trovati nel sangue periferico. In presenza di un antigene "processato" dai macrofagi, le cellule-B si differenziano e proliferano in cloni di plasmacellule che producono anticorpi diretti contro l'antigene specifico. Esso può contenere molti determinanti antigenici in relazione alla complessità molecolare dell'antigene. Questi determinanti antigenici stimolano quindi la replicazione delle cellule-B e la loro differenziazione in cloni di plasmacellule secernenti anticorpi. I singoli determinanti antigenici stimoleranno anticorpi che variano in specificità e affinità.

Una singola plasmacellula è capace di secernere una singola classe di immunoglobuline.

Figura 15. IL SISTEMA IMMUNE E LA PRODUZIONE DI ANTICORPO

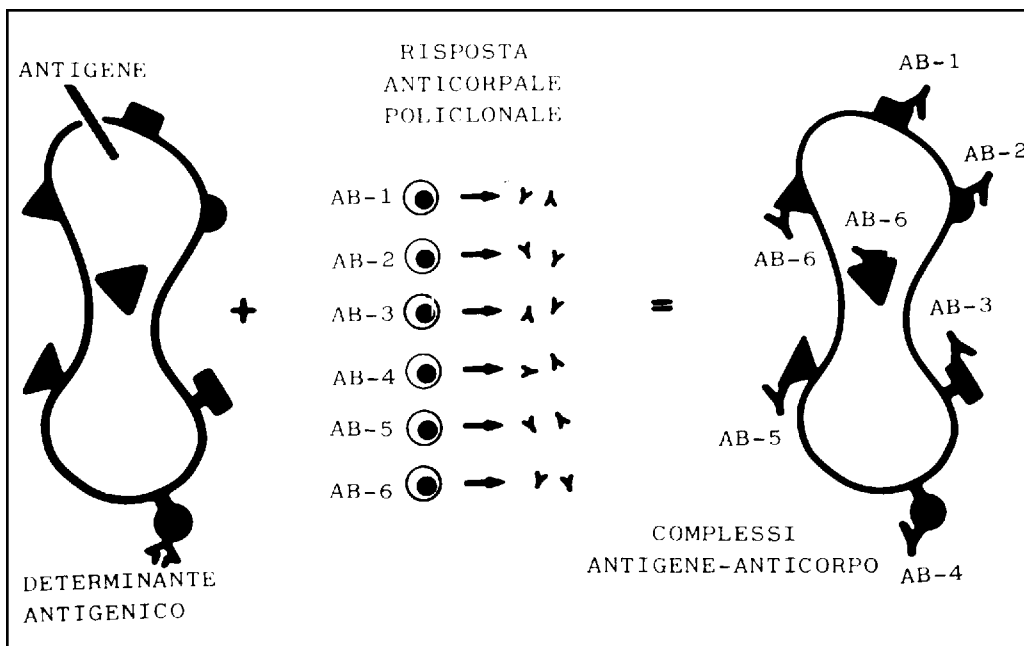


**Figura 16. LA RISPOSTA ANTICORPALE CONVENZIONALE POLI-  
CLONALE**

La frazione delle immunoglobuline di un convenzionale antisiero policlonale è eterogenea. Le plasmacellule producono varie classi di anticorpi che si legano a specifiche strutture (determinanti antigenici o epitopi) sulla superficie dell'antigene. Una singola molecola di anticorpo o un singolo clone plasmacellulare è specifico per un unico tipo di determinante antigenico. Ma possono esistere molti determinanti su un singolo voluminoso antigene, che stimolano la sintesi di molte e differenti popolazioni di anticorpi.

Questa eterogenea risposta policlonale è molto importante in vivo per proteggere l'individuo contro gli agenti patogeni. Tuttavia per alcune applicazioni in vitro, l'isolamento dell'antigene specifico desiderato da una miscela policlonale può dimostrarsi un difficile processo. L'isolamento è generalmente ottenuto con l'uso della cromatografia per affinità o di assorbimento.

Figura 16. LA RISPOSTA ANTICORPALE CONVENZIONALE POLICLONALE



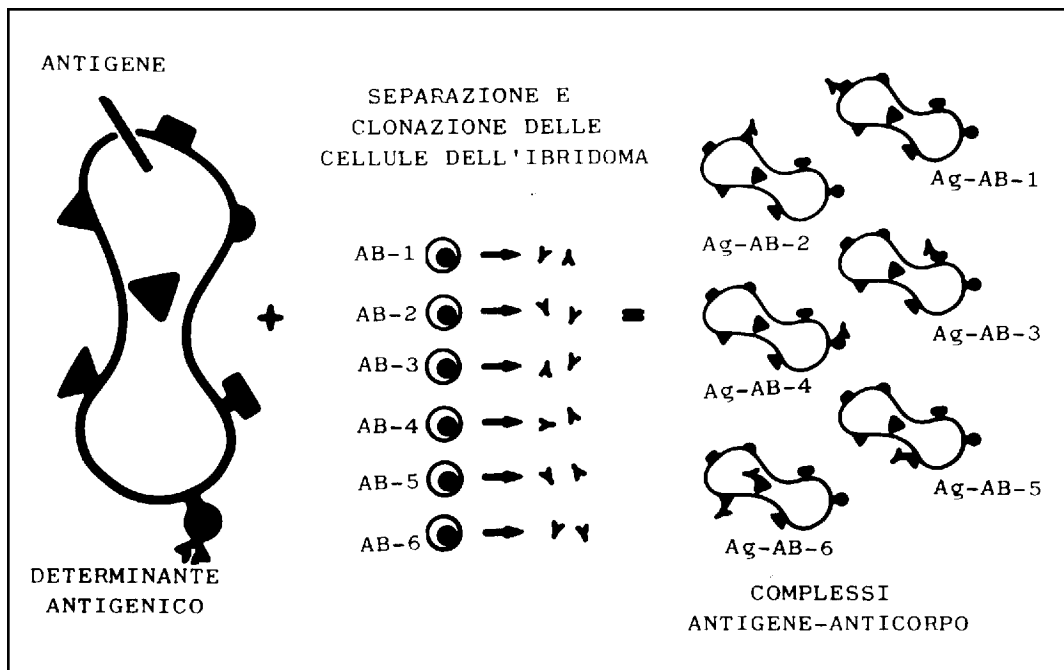
**Figura 17. LA RISPOSTA ANTICORPALE MONOCLONALE**

Gli anticorpi monoclonali sono anticorpi omogenei uniformi diretti contro un singolo determinante antigenico o epitopo presente sulla molecola antigenica. La produzione in vitro di anticorpi monoclonali consiste nella selezione di un anticorpo omogeneo con le caratteristiche desiderate tra i molti anticorpi prodotti in una risposta convenzionale policlonale.

La produzione in vitro di anticorpi monoclonali con l'uso di ibridomi viene discussa nelle figure 18-20.

Brevemente, ibridoma è il nome dato al prodotto della fusione di una cellula produttrice anticorpi (linfocita-B) e una forma tumorale di un particolare tipo di cellula del midollo osseo (mieloma). L'ibrido formato dalla fusione di queste due cellule ha la proprietà di entrambe le cellule. Il prodotto è un singolo anticorpo specifico la cui produzione è teoricamente infinita.

Figura 17. LA RISPOSTA ANTICORPALE MONOCLONALE



**Figura 18. L'IBRIDOMA E LA PRODUZIONE DI ANTICORPO MONOCLONALE: SCHEMA GENERALE**

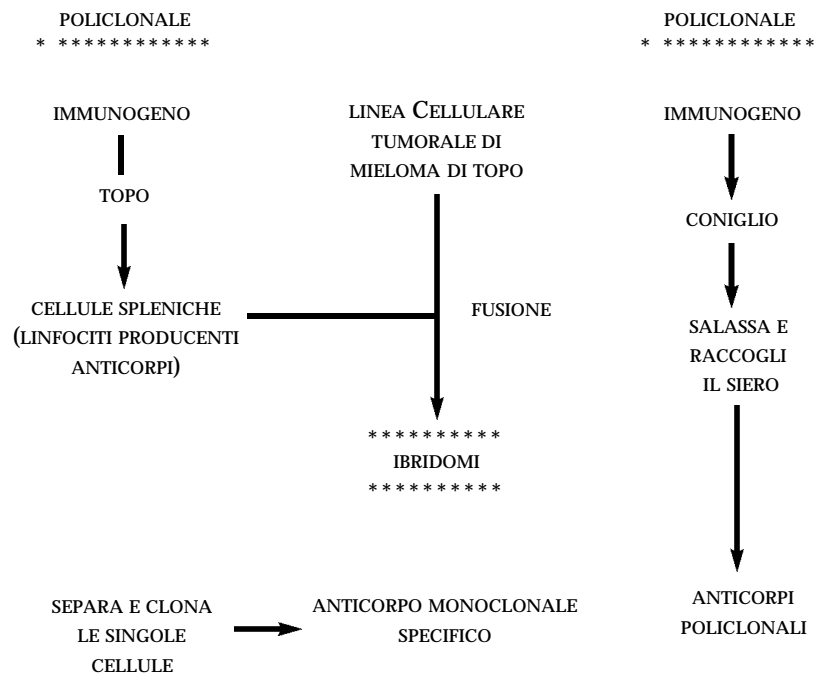
Gli anticorpi policlonali sono prodotti con l'immunizzazione di un animale ospite (in genere un coniglio), raccogliendo, dopo un periodo di tempo appropriato (da settimane a mesi), i sieri dell'animale. Gli anticorpi policlonali presenti nei sieri sono capaci di reagire con molti antigeni e/o determinanti antigenici sulla loro superficie. Come già accennato, può essere necessaria una prolungata fase di purificazione per poter utilizzare nella diagnostica alcuni di questi anticorpi.

La tecnica degli anticorpi monoclonali è stata sviluppata nel 1975 da Milstein e Kohler (Nature, 256, 495 (1975)). In breve, lo schema generale della produzione degli anticorpi monoclonali comprende dapprima l'immunizzazione di un topo con l'antigene contro il quale devono essere prodotti gli anticorpi. I linfociti del topo produttori anticorpi (le cellule della milza – sono la fonte più elementare di un grosso numero di cellule-B) vengono “fusi” con i linfociti maligni che originano da un ceppo di cellula mielomatosa di topo, cresciuta in cultura (cellula di mieloma). Il mieloma di topo è una linea cellulare mutata che ha perduto la capacità di produrre anticorpi fatti di varie combinazioni di immunoglobuline di entrambe le cellule di origine una risposta del tutto imprevedibile.

L'ibridoma che ne risulta contiene il patrimonio genetico di ciascuna cellula – i geni che controllano la produzione di anticorpi specifici dalle cellule della milza e i geni che permettono una indefinita proliferazione cellulare dalle cellule del mieloma.

Le cellule dell'ibridoma devono quindi essere separate e conservate in coltura. Ciascun ibridoma clonato (separato e messo in coltura individualmente) produce quindi uno specifico anticorpo (monoclonale), capace di reagire con il determinante antigenico specifico che ha causato la sua formazione.

Figura 18. L'IBRIDOMA E LA PRODUZIONE DI ANTICORPO MONOCLONALE: SCHEMA GENERALE



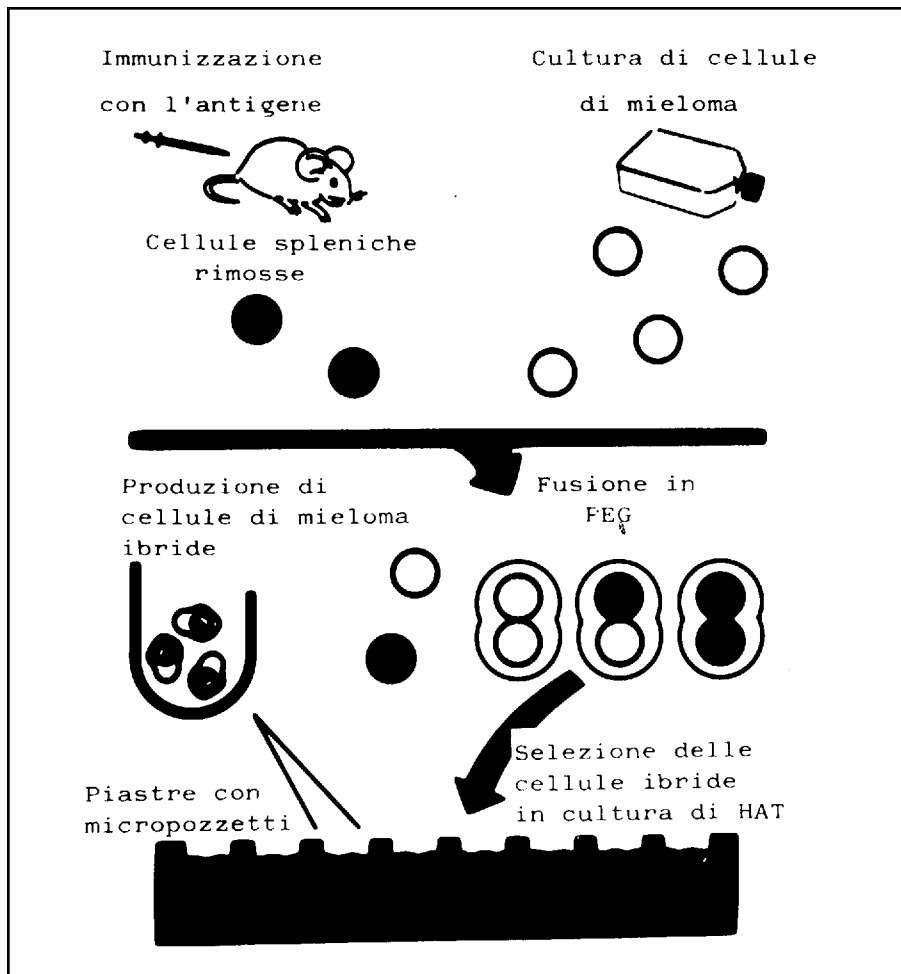


**Figura 19. LA PRODUZIONE DELL'IBRIDOMA (1)**

Al fine di produrre un ibridoma, si procede alla immunizzazione di un topo con un antigene specifico. I protocolli di immunizzazione variano, ma al topo viene solitamente somministrata una iniezione di richiamo da 3 a 5 giorni prima della fusione. Le milze di quegli animali che producono i più elevati titoli anticorpali vengono rimosse, e una sospensione di linfociti splenici (circa  $10^8$  cellule) viene mischiata con le cellule di topo ottenuta da un mieloma (circa  $10^7$  cellule). La miscela viene incubata con polietilenglicole (PEG) per circa 8 minuti per favorire la fusione delle membrane cellulari. Dopo la fusione, le cellule possono essere sospese in un tessuto di coltura di crescita HAT contenuto in piastre con micropozzetti. Poiché di circa 200.000 cellule spleniche soltanto una forma un ibrido vitale con una cellula di mieloma, si devono eliminare le cellule di mieloma non fuse e gli ibridi mieloma-mieloma. Questo è possibile usando la coltura selettiva HAT. Come cellule di genitore vengono utilizzate le cellule di mieloma di topo che non posseggono l'enzima ipoxantina fosforibosil transferasi, e il tessuto di crescita contiene ipoxantina (H), aminopteridina (A), e timidina (T) (HAT). Poiché le cellule mielomatose non hanno l'enzima transferasi, esse non possono utilizzare l'ipoxantina aggiunta per sintetizzare le purine. L'aminopteridina blocca la sintesi endogena di pureine e pirimidine. Le cellule di mieloma non fuse e gli ibridi mieloma-mieloma, a causa del blocco della sintesi delle purine e pirimidine muoiono. D'altra parte, un ibrido tra una cellula splenica e di mieloma contiene l'enzima transferasi fornito dalle cellule spleniche, utilizza l'ipoxantina e la timidina aggiunta per la sintesi della purina e della pirimidina, e sopravvive.

Le cellule spleniche non fuse, e gli ibridi milza-milza muoiono spontaneamente dopo alcune replicazioni.

Figura 19. LA PRODUZIONE DELL'IBRIDOMA (1)



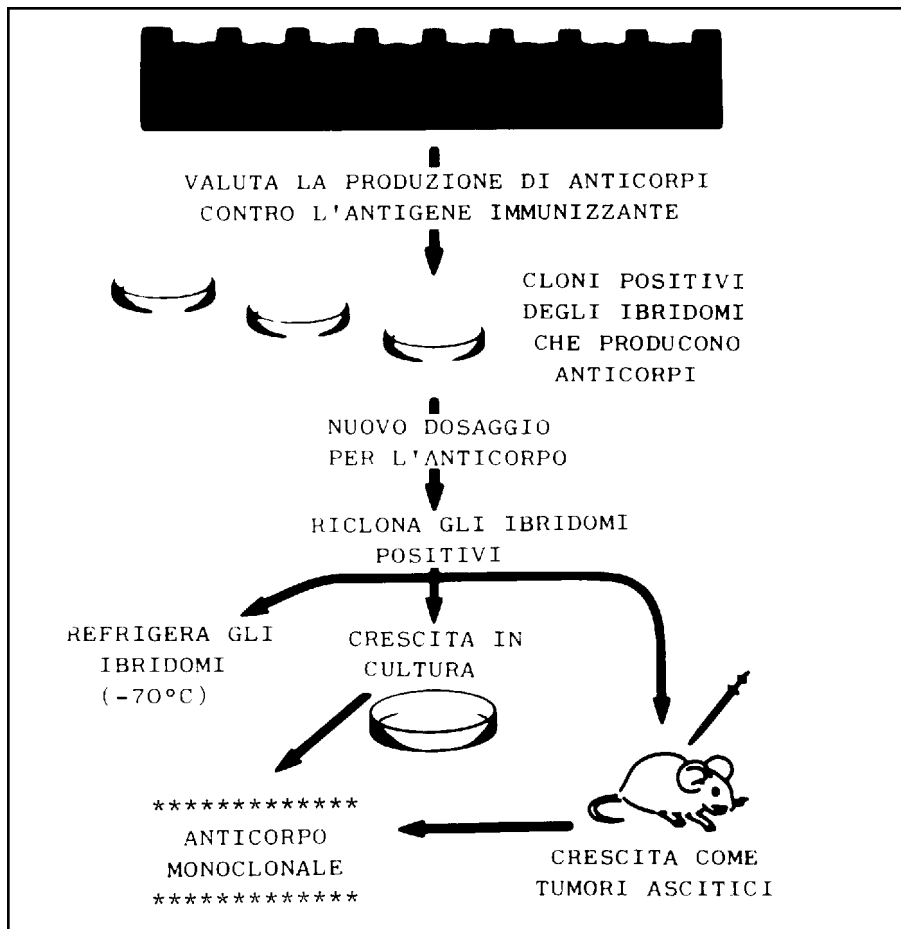
**Figura 20. LA PRODUZIONE DELL'IBRIDOMA (2)**

I cloni ibridi diventano visibili in circa il 30% dei pozzetti, da due a quattro settimane dopo la fusione. Gli ibridi hanno la stessa morfologia delle cellule di mieloma di origine. Il surnatante dei pozzetti contenenti questi cloni in moltiplicazione viene analizzato e si procede alla titolazione degli anticorpi diretti contro l'antigene immunizzante. Gli ibridi positivi per gli anticorpi vengono fatti crescere e clonati, quanto prima possibile, su un appropriato terreno di crescita. Dopo un adeguato periodo di tempo si procede ad una rivalutazione della produzione di anticorpi, e gli ibridi vengono riclonati. La tecnica per diluizione al limite (di meno di una cellula per coltura) o l'uso di terreni di coltura semisolidi come l'agar, permette agli ibridi di crescere con una densità talmente bassa che ogni crescita si può considerare derivante da un singolo clone.

La procedura della riclonazione permette l'eliminazione della contaminazione di varianti, dei cloni che non producono anticorpi, e le cellule che hanno perduto la capacità di produrre anticorpi a causa della perdita di cromosomi. Se si permette che la crescita continui, le varianti degli ibridi possono sovracrescere gli ibridomi desiderati.

A questo punto le scorte di ibridomi possono essere congelate e immagazzinate, fatte crescere in coltura, o iniettate in topolini immuno-soppressi. I topi producono una ascite da tumore con grosse quantità di anticorpi monoclonali. Gli ibridomi congelati possono essere accumulati per un periodo illimitato (sinora). Quando vengono sgelati e iniettati nei topolini o vengono fatti crescere in terreno di coltura, gli ibridomi produrranno anticorpi identici a quelli prodotti per la prima volta. La cromatografia per affinità si è dimostrata un utile mezzo di purificazione degli anticorpi monoclonali ottenuti.

Figura 20. LA PRODUZIONE DELL'IBRIDOMA (2)



**Figura 21 e 22. IL TERRENO DI CRESCITA HAT**

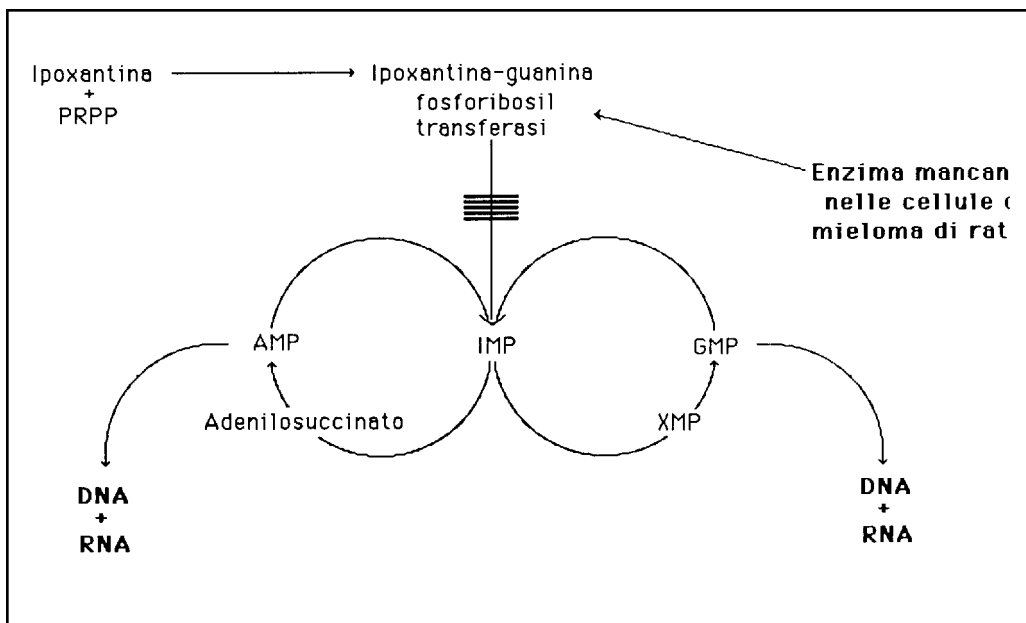
Il protocollo di fusione produce una miscela di cellule parenti, ibridi ciascuna di ciascun genitore, e -fatto di estrema importanza- ibridi tra un genitore (cellula splenica) e l'altro (cellula di mieloma). È necessario far crescere queste cellule in condizioni che permettano la sopravvivenza solo delle cellule ibride milza-mieloma. A questo scopo viene utilizzato il sistema di selezione HAT (ipoxantina-aminopterin-timidina).

Inizialmente, la cellula di mieloma deve essere geneticamente costruita con un difetto dell'enzima ipoxantina-guanina-fosforibosil transferasi (HPRT). Questo viene ottenuto facendo crescere le cellule di mieloma in presenza di 6-tioguanina, nella quale le cellule HPRT-positive non possono sopravvivere. Soltanto le cellule di mieloma HPRT-negative possono rimanere.

**Figura 21. FORMAZIONE DI IPOXANTINA E PURINA**

L'inosina 5-fosfato (IMP), formato dall'ipoxantina e dal 5-fosforibosil-1-pirofosfato (PRPP), è il precursore per il nucleotide purinico adenosina 5-fosfato (AMP). L'adenilosuccinato e la xantosina 5'-fosfato sono i prodotti intermedi. Le cellule di mieloma HPRT-negative non fuso e le cellule ibride di mieloma-mieloma sono incapaci di utilizzare l'ipoxantina esogena per sintetizzare le purine, e muoiono in presenza di aminopterin, che blocca la sintesi de novo di purine e pirimidine. Tuttavia, la cellula della milza origine dell'ibridoma può utilizzare l'ipoxantina esogena per la sintesi di purine poiché contiene l'enzima HPRT.

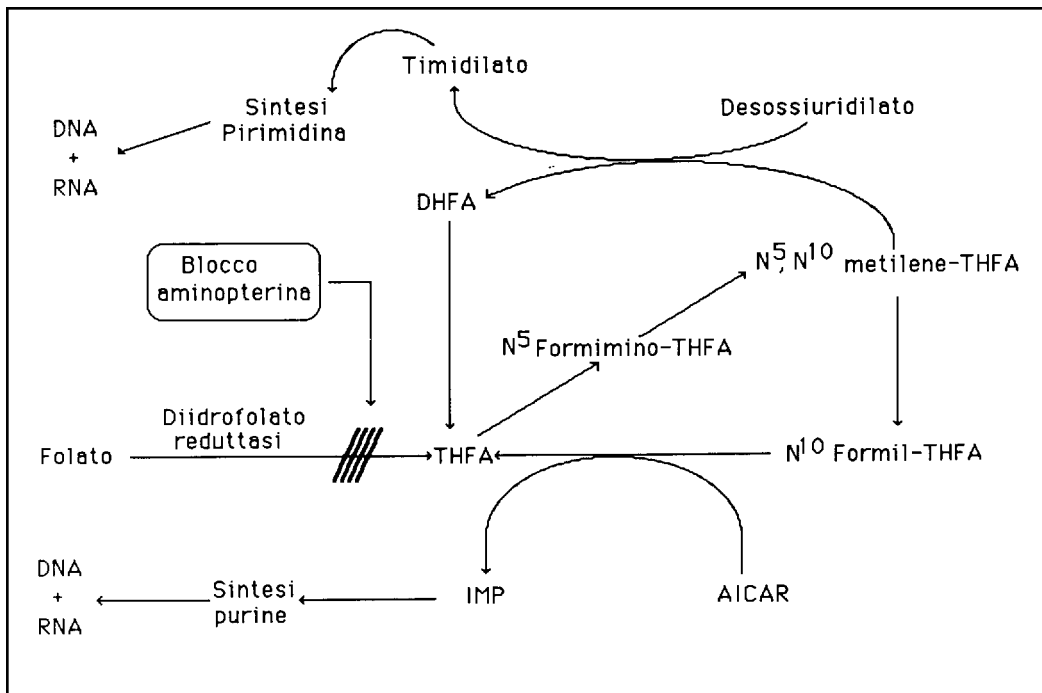
Figura 21. FORMAZIONE DI IPOXANTINA E PURINA



**Figura 22. AMINOPTERINA**

L'aminopterina blocca la riduzione di folato a tetraidrofolato (THFA) ad opera della diidrofolato riduttasi. Questo a sua volta blocca la formazione di IMP (necessaria per la sintesi di purine) a partire dal 5-amino-4-imidazolo carboxiamide riboside (AICAR). Viene anche bloccata la formazione di timidilato per la sintesi di pirimidine. Tuttavia, la cellula di milza origine dell'ibridoma può utilizzare la timidina esogena aggiunta per la sintesi di pirimidine.

Figura 22. AMINOPTERINA





**Figura 23. IL TERRENO DI CRESCITA HAT**

Come discusso nella figura 22, la principale via biosintetica per la sintesi di RNA e DNA (attraverso la formazione dei nucleotidi purinici e pirimidinici) può essere bloccata dalla aminopterina. L'aminopterina blocca inoltre la via dell'acido folico. Tuttavia, esiste una via alternativa (di salvataggio) attraverso la quale l'RNA ed il DNA possono essere sintetizzati utilizzando nucleotidi preformati. La via di salvataggio richiede l'enzima ipoxantina-guanina fosforibosil transferasi, e può funzionare soltanto se l'ipoxantina viene aggiunta nel medium. Perciò, le cellule di mieloma non fuse e gli ibridi fusi mieloma-mieloma sono incapaci di replicarsi perchè:

1. l'aminopterina blocca la produzione di DNA ed RNA, e
2. l'enzima HPRT è perduto, bloccando così la via di salvataggio per la produzione di RNA e DNA.

Le cellule dell'ibridoma fuse possono utilizzare l'HPRT delle cellule spleniche d'origine e la timidina aggiunta nel medium per la produzione di DNA ed RNA.

Le cellule spleniche normali muoiono di morte spontanea *in vitro*.

Figura 23. IL TERRENO DI CRESCITA HAT

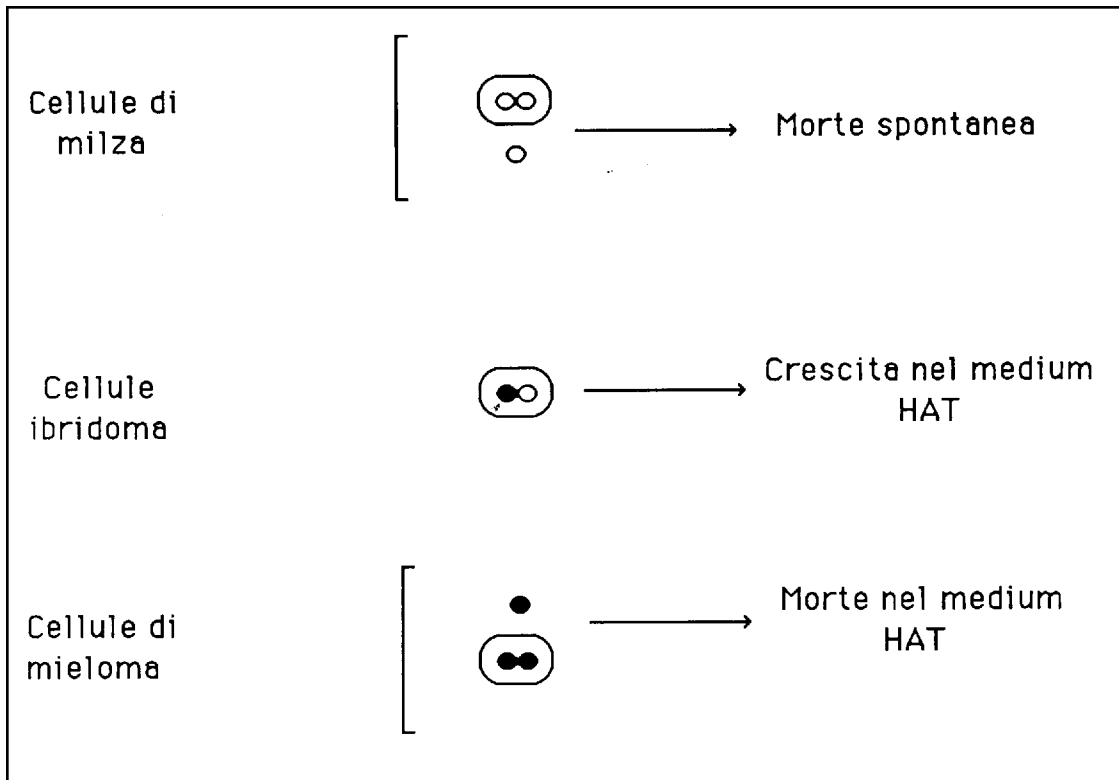


Figure 24 e 25. **I DOSAGGI DI SCREENING PER INDIVIDUARE GLI IBRIDOMI CHE SECERNONO SPECIFICI ANTICORPI: ELISA**

Sono disponibili numerose procedure per lo screening del medium di ciascun pozzetto (contenente l'ibrido) per l'individuazione dell'anticorpo che reagisce con l'immunogeno. Lo screening di centinaia di ibridi per la ricerca dell'anticorpo è la fase più faticosa e lunga nella tecnica dell'ibridoma. Le tecniche convenzionali, attualmente semiautomatizzate, sono il dosaggio radioimmunologico (RIA) ed enzimologico tipo ELISA. Questi dosaggi utilizzano il medium impiegato della coltura di crescita nelle piastre con micropozzetti per individuare l'anticorpo.

Con il metodo ELISA eterogeneo utilizzato per individuare gli ibridomi secernenti l'anticorpo specifico per l'antigene descritto in queste figure, l'antigene (immunogeno) viene dapprima attaccato od adsorbito ad un supporto in fase solida (per esempio polistirene). La fase solida viene quindi lavata con tampone fosfato salino-Tween 20 per rimuovere l'antigene non adsorbito e ridurre al minimo il legame non specifico alla plastica.

Figura 24.

**Fase 1.** Il medium (che contiene l'anticorpo specifico che interessa) da differenti micropozzetti in piastre, viene mischiato con l'antigene in fase solida. Soltanto l'anticorpo specifico con reattività contro l'antigene viene legato. La fase solida viene lavata dopo l'incubazione per rimuovere l'anticorpo che non ha reagito.

**Figure 24 e 25. I DOSAGGI DI SCREENING PER INDIVIDUARE GLI IBRIDOMI CHE SECERNONO SPECIFICI ANTICORPI: ELISA**

Figura 24.

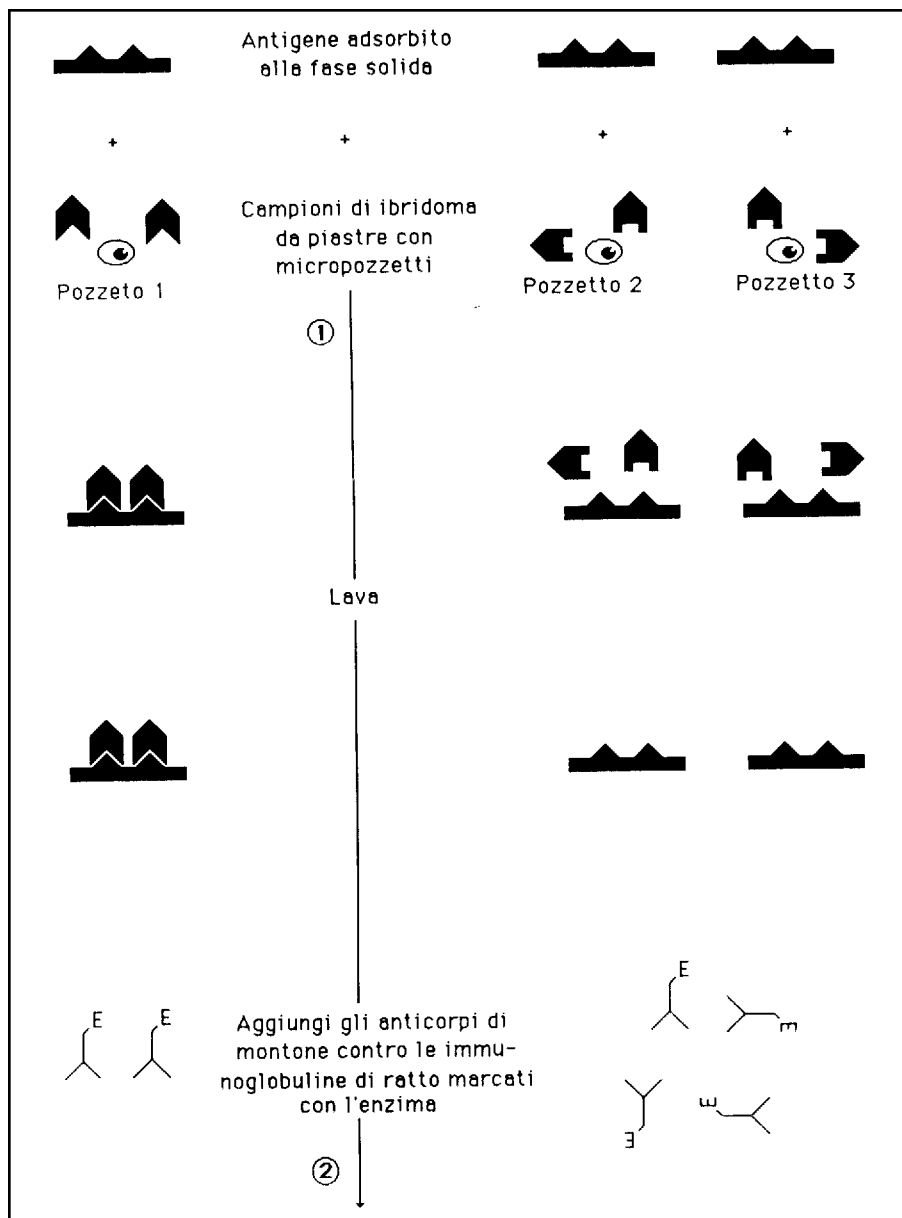


Figura 25.

**Fase 2.** Viene aggiunto un anticorpo di montone, diretto contro le immunoglobuline di ratto, marcato con l'enzima. L'anticorpo di montone reagirà con tutti gli anticorpi di ratto presenti. In questo caso, è presente soltanto l'anticorpo dell'ibridoma di ratto. Gli enzimi diffusamente impiegati includono la perossidasi da rafano (HRPO), la fosfatasi alcalina (AP), e la beta galattosidasi (B-G). La fase solida viene lavata dopo l'incubazione per rimuovere ogni anticorpo di montone diretto contro l'immunoglobulina di ratto, non legata, marcata con l'enzima.

**Fase 3.** Viene aggiunto il substrato per l'enzima. Tipici substrati includono: HRPO-2,2'-azino-di(3-etil-benziazolina) solfonato (ABTS) e o-fenilenediamina

AP-p-nitrofenil fosfato

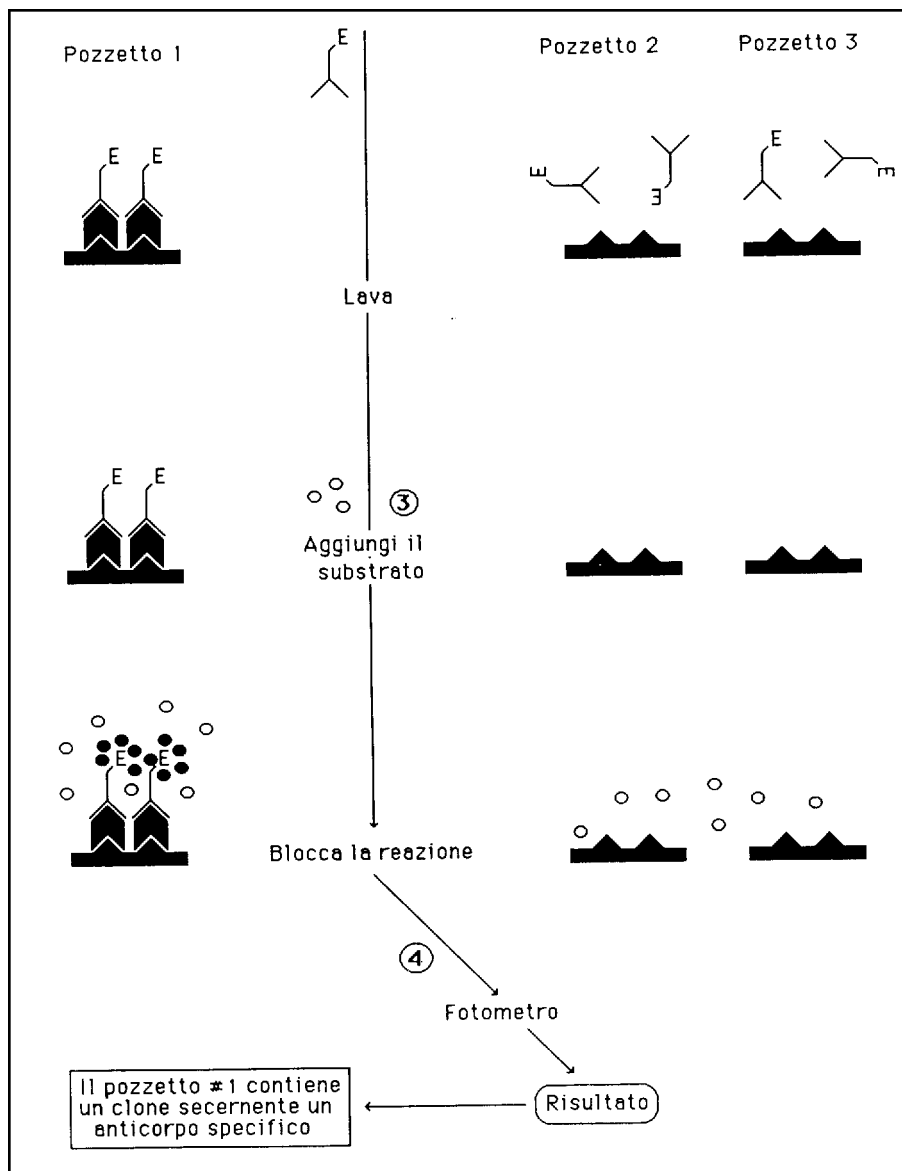
B-G-o-nitrofenil-beta-galactopiranoside (per una migliore sensibilità, il substrato cromogenico può essere sostituito dal substrato fluorogenico 4-metilumbelliferil-beta-D-galactosidasi.)

Dopo un tempo sufficiente necessario per lo sviluppo massimo del colore, la reazione enzimatica viene bloccata (per esempio aggiungendo un acido od una base), e viene determinata l'intensità del colore (adsorbanza) di ciascun campione. L'intensità del colore è una misura della quantità di enzima marcante attaccato, che è proporzionale all'anticorpo specifico dell'ibridoma nel medium del micropozzetto.

Nell'esempio presentato in queste figure, soltanto il pozzetto numero 1 contiene un clone secernente un anticorpo antigene-specifico.

\*Per una ulteriore descrizione delle tecniche ELISA, si prega di leggere il volume numero 24 di Caleidoscopio intitolato "Il dosaggio enzimologico e fluoroimmunologico".

Figura 25.



**Figura 26 e 27. I DOSAGGI DI SCREENING PER INDIVIDUARE GLI  
IBRIDOMI CHE SECERNONO SPECIFICI ANTICORPI:  
RIA**

Nel metodo RIA, utilizzato per individuare ibridomi secernenti anticorpi specifici per l'antigene, descritto in queste figure, l'antigene (immunogeno) viene dapprima attaccato o adsorbito ad un supporto in fase solida (per esempio polistirene). La fase solida viene quindi lavata con tampone fosfato salino-Tween 20 per rimuovere l'antigene non adsorbito e ridurre al minimo il legame non specifico alla plastica.

Figura 26.

**Fase 1.** Il medium di differenti pozzetti (contenente lo specifico anticorpo di interesse) viene miscelato con l'antigene in fase solida. Soltanto l'anticorpo specifico con reattività contro l'antigene viene legato. La fase solida viene lavata dopo l'incubazione per rimuovere l'anticorpo che non ha reagito.

Figura 26 e 27. I DOSAGGI DI SCREENING PER INDIVIDUARE GLI IBRIDOMI CHE SECERNONO SPECIFICI ANTICORPI: RIA

Figura 26.

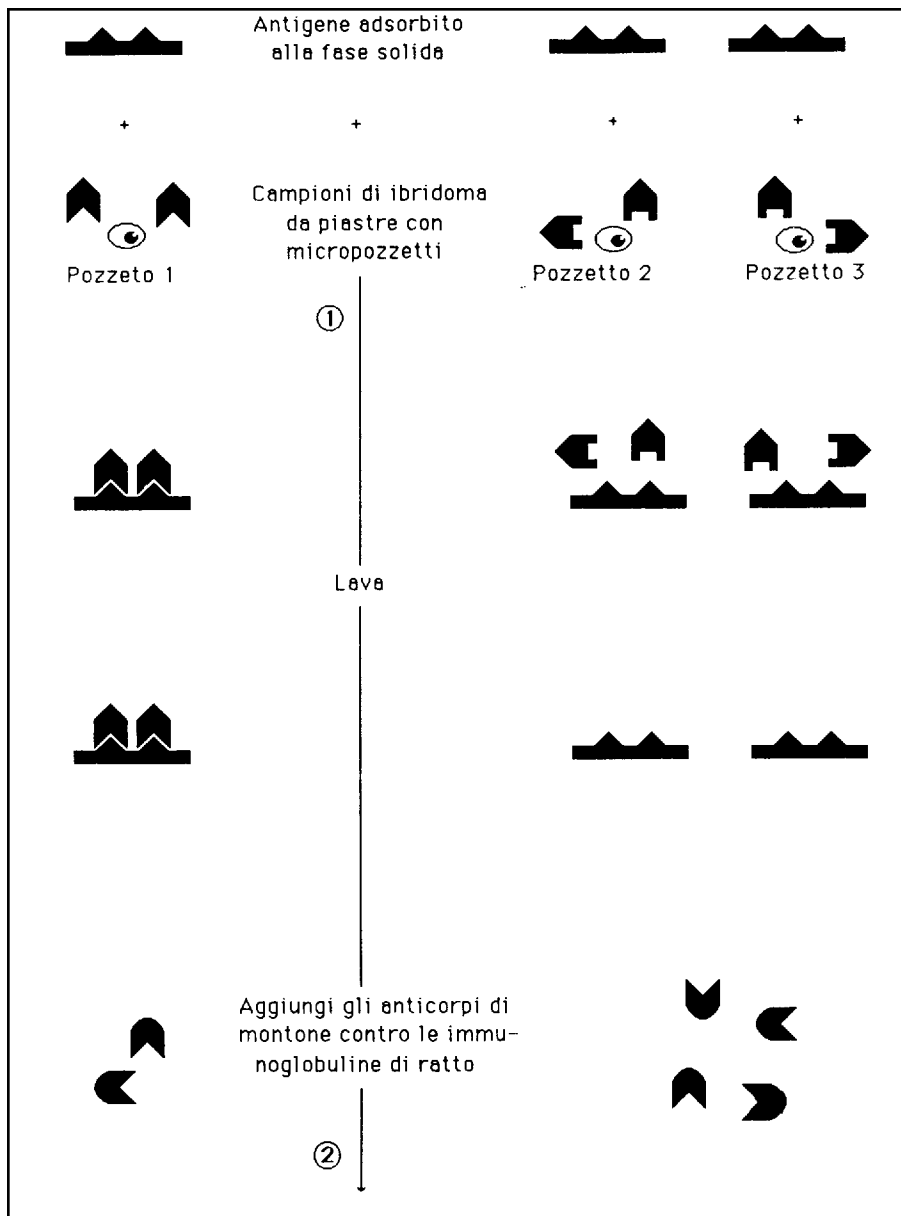




Figura 27.

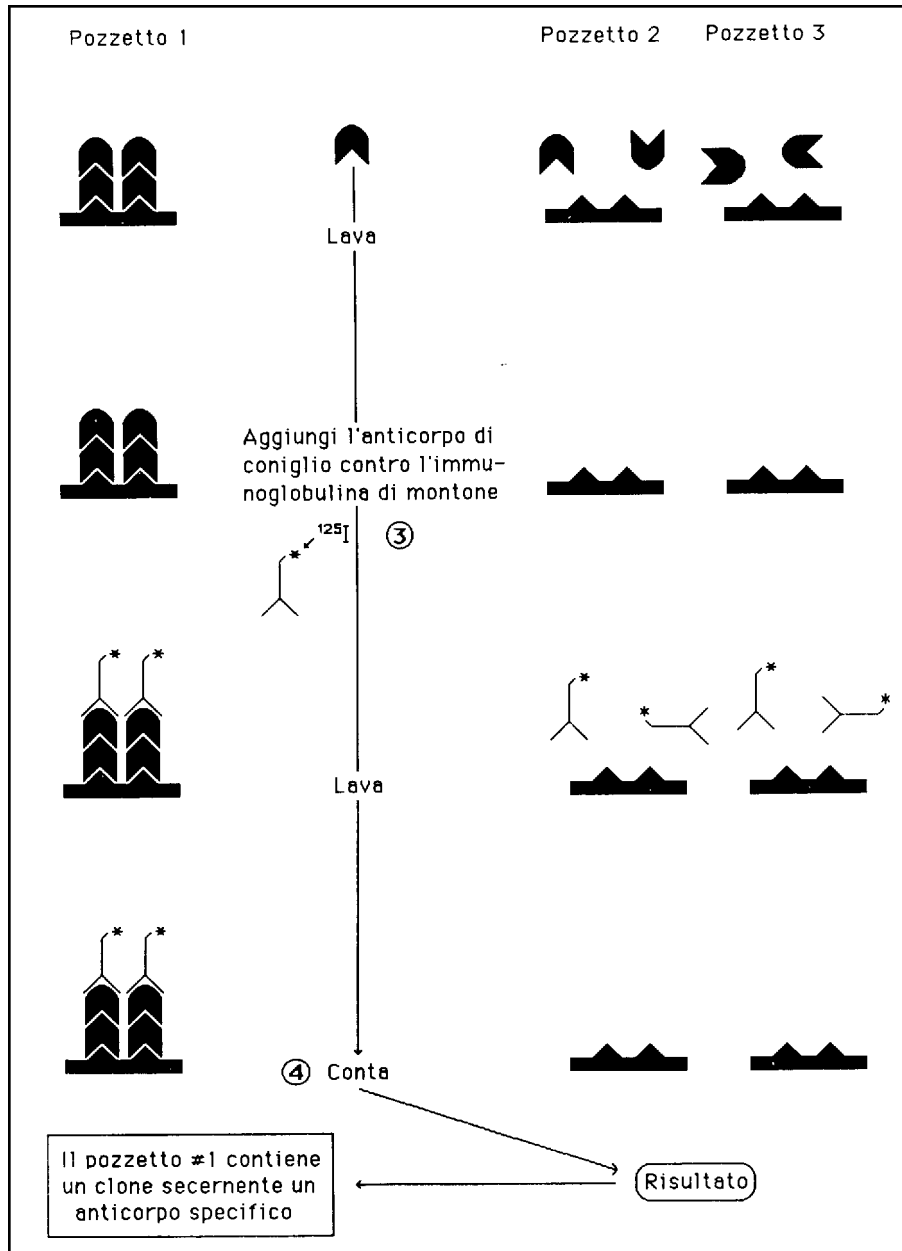
**Fase 2.** Viene aggiunta un anticorpo di montone contro l'immunoglobulina di ratto. L'anticorpo di montone anti ratto reagirà con l'anticorpo dell'ibridoma di ratto legato. La fase solida viene lavata dopo l'incubazione per rimuovere tutto l'anticorpo di montone non legato che non ha reagito contro l'immunoglobulina di ratto.

**Fase 3.** Viene quindi aggiunto un anticorpo contro le immunoglobuline di montone ottenuto nei conigli e marcato con iodio 125. L'anticorpo di coniglio reagirà con le immunoglobuline di montone legate. La fase solida viene lavata nuovamente dopo l'incubazione per rimuovere le immunoglobuline anti-montone marcate che non sono state legate.

**Fase 4.** La fase solida viene messa a contare per la presenza e la quantità di radioattività. (È stata utilizzata anche l'autoradiografia per valutare i cloni positivi.) La quantità di radiomarcato presente è proporzionale all'anticorpo specifico dell'ibridoma nel medium dei micropozzetti.

Nell'esempio presentato in queste figure, soltanto il pozzetto numero 1 contiene un clone secernente un anticorpo specifico per l'antigene.

Figura 27.



**Figura 28. LE TAPPE PIU IMPORTANTI NELLA PRODUZIONE DI ANTICORPO MONOCLONALE: RIASSUNTO**

Questa figura riassume le otto principali fasi discusse dalla figura 18 alla 27.

**Fase 1 - Immunizzazione.** Per ottenere i migliori risultati, è necessario selezionare un ratto che secerne anticorpo in titolo elevato. La frequenza degli ibridi positivi è direttamente proporzionale alla frequenza di linfociti splenici secernenti anticorpi.

**Fase 2. - Scelta del mieloma.** Il mieloma deve essere di una linea cellulare deficiente di HPRT (HAT sensibile), e dovrebbe essere incapace di produrre catene leggere o pesanti di immunoglobuline.

**Fase 3. - Fusione.** Il PEG è il reagente di prima scelta per la fusione cellulare.

**Fase 4. - Crescita selettiva dell'ibride.** Le cellule mieloma e gli ibridi mieloma-mieloma vengono eliminati con l'uso del medium HAT.

**Fase 5.- Screening per l'anticorpo.** Le comuni tecniche impiegate per lo screening di massa sono il RIA, EIA ed ELISA.

**Fase 6. - Clonazione.** La clonazione deve essere fatta quanto più precocemente possibile per eliminare varianti ed ibridi non produttori anticorpi. Un clone stabile viene mantenuto con la riclonazione.

**Fase 7. - Caratterizzazione dell'anticorpo.** L'anticorpo monoclonale finale può essere caratterizzato con studi di specificità, con l'identificazione della classe delle immunoglobuline (o sottoclasse), e valutando la purità con tecniche cromatografiche-elettroforetiche.

**Fase 8. - Produzione dell'anticorpo.** L'anticorpo monoclonale può essere congelato a  $-70^{\circ}\text{C}$  (criopreservazione), o si può iniziare la produzione con tecniche in vitro (coltura) o in vivo (tumori ascitici).

È al di là dello scopo di questo volume discutere a fondo tutti i dettagli tecnici pubblicati sinora sull'ibridoma e la produzione di anticorpi monoclonali. Per ulteriori informazioni si possono consultare le voci bibliografiche citate alla fine del testo.

**Figura 28. LE TAPPE PIU IMPORTANTI NELLA PRODUZIONE DI ANTICORPO MONOCLONALE: RIASSUNTO**

**1) Immunizzazione**

- \* Seleziona un topo che produce anticorpi in titolo elevato.
- \* La frequenza di ibridomi è correlata con la frequenza delle cellule di milza che producono anticorpi.

**2) Scelta del mieloma**

- \* Sensibile all'HAT.
- \* Eliminazione della produzione di immunoglobuline con catene leggere e pesanti.

**3) Fusione**

- \* PEG.

**4) Crescita selettiva dell'ibridoma**

- \* Medium HAT.

**5) Screening per l'anticorpo**

- \* RIA, EIA, ELISA.

**6) Clonazione**

- \* Clona precocemente per eliminare le varianti.
- \* Riclona per mantenere stabile il clone.

**7) Caratterizzazione dell'anticorpo**

- \* Studi di specificità.
- \* Identifica la classe delle immunoglobuline.
- \* Caratterizza con l'elettroforesi-cromatografia.

**8) Produzione di anticorpo**

- \* Criopreservazione.
- \* Crescita in coltura.
- \* Come tumori ascitici

**Figura 29. ANTICORPI MONOCLONALI: VANTAGGI**

In questa figura vengono illustrati alcuni dei principali vantaggi degli anticorpi monoclonali (paragonati agli anticorpi convenzionali policlonali). Due importanti aspetti degli anticorpi monoclonali sono la specificità e la capacità di essere prodotti in grande quantità da un clone isolato. Con l'uso del congelamento a  $-70^{\circ}\text{C}$  e la riclonazione, la produzione di anticorpi può essere virtualmente "immortale". Non è necessario un antigene puro per la produzione di anticorpo monoclonale. Questa tecnica separa una cellula secerne un anticorpo da tutte le altre nella milza immunizzata, e le cellule che reagiscono contro impurità possono venir eliminate durante lo screening iniziale. Non dovrebbe esistere alcuna variazione tra i lotti, e sono possibili titoli elevati. Il clone produttore l'anticorpo può essere congelato e riutilizzato più avanti. Possono essere sintetizzati anche anticorpi monoclonali marcati radioattivamente aggiungendo durante la produzione aminoacidi marcati con trizio ( $^3\text{H}$ ) o carbonio-14. Questi marcatori intrinseci si possono dimostrare utili nelle procedure di dosaggio.

**Figura 29. ANTICORPI MONOCLONALI: VANTAGGI**

- \* Omogenei nella struttura ed immunoreattività (specificità)
- \* Possono essere prodotti in enormi quantità
- \* Derivano da un clone isolato
- \* Virtualmente “immortali”
- \* Possono essere preparati da antigeni impuri
- \* E' possibile un titolo elevato
- \* Non esiste variazione tra lotti
- \* Le cellule possono essere refrigerate e riutilizzate
- \* Possono incorporare il tracciante durante la produzione.

**Figura 30. ANTICORPI MONOCLONALI: SVANTAGGI**

Il principale svantaggio degli anticorpi monoclonali è rappresentato dal livello attuale della tecnologia e della produzione. Gli svantaggi biochimici includono: eccessiva specificità (un anticorpo policlonale potrebbe essere più utile nei dosaggi di screening - per esempio, varianti della rabbia); l'anticorpo monoclonale potrebbe non fissare il complemento (dipende dalla classe e dalla sottoclasse); ed un singolo anticorpo monoclonale reagisce soltanto con due antigeni (la mancanza di un legame estensivo necessario per formare lattici preclude il loro uso nella immunodiffusione radiale, nella immunoelettroforesi, e nelle tecniche di diffusione su agar).

Gli svantaggi tecnologici dell'ibridoma includono: la possibilità di perdita di cromosoma con la cessazione della secrezione di anticorpo monoclonale; il tempo e il lavoro richiesto; la mancanza della disponibilità di ibridomi umani; la difficoltà nella estrazione, purificazione e concentrazione dell'anticorpo; gli elevati costi di produzione; la bassa produzione di ibridoma per fusione; e la bassa affinità anticorpale segnalata.

Va anticipato che questi problemi attuali saranno risolti con lo sviluppo di questa tecnologia giovane.

**Figura 30. ANTICORPI MONOCLONALI: SVANTAGGI**

- \* Può essere troppo specifico (eccessiva specificità)
- \* Può non fissare il complemento (dipende dalla classe o sottoclasse)
- \* Non può venir utilizzato nei dosaggi di immunoprecipitazione
- \* E' possibile la perdita di cromosomi
- \* La secrezione degli ibridomi può arrestarsi (quanto immortali?)
- \* La tecnologia è intensiva e richiede tempo
- \* Mancano anticorpi umani monoclonali utilizzabili
- \* Difficoltà tecniche nella estrazione, purificazione e concentrazione
- \* Elevato costo di produzione
- \* Bassa produzione di ibridoma per fusione
- \* Basse affinità riportate.



**Figura 31. APPLICAZIONI IN VITRO DEGLI ANTICORPI MONOCLONALI**

La lista delle potenziali applicazioni *in vitro* usando gli anticorpi monoclonali è vasta. In questa figura vengono discusse soltanto alcune delle potenziali applicazioni. Il primo "ritorno" per il laboratorio clinico è la utilizzazione degli anticorpi monoclonali come specifici, riproducibili, reagenti utilizzati nella routine immunodiagnostica per un numero elevato di analiti. Le figure 32 e 33 presentano due esempi. L'anticorpo monoclonale può migliorare l'immunodosaggio poichè è un reagente specifico quantificabile, e può essere usato continuamente e con disponibilità universale.

Gli anticorpi monoclonali sono già stati impiegati per la identificazione, sottotipizzazione, e l'epidemiologia di agenti infettivi come: virus, batteri, e parassiti, la caratterizzazione di proteine e della struttura genetica; l'identificazione e l'analisi della struttura biochimica di antigeni e marcatori tumorali; la tipizzazione tissutale e la cross-reattività per i trapianti d'organo; la identificazione di sottopopolazioni delle cellule linfoidi; e la immunopurificazione di vari composti (per esempio l'interferone). Questo programma illustrerà soltanto alcuni degli esempi sopra citati.

**Figura 31. APPLICAZIONI *IN VITRO* DEGLI ANTICORPI MONOCLONALI**

- \* Come reagenti immunodiagnostici di routine
- \* Identificazione, sottotipizzazione ed epidemiologia di agenti infettivi (virus, batteri, parassiti)
- \* Caratterizzazione genetica e della struttura di proteine
- \* Identificazione e struttura biochimica di antigeni e marcatori tumorali
- \* Tipizzazione crociata e tipizzazione tissutale per trapianti d'organo
- \* Identificazione di sottopopolazioni di cellule linfoidi
- \* Immunopurificazione di analiti.

**Figura 32. APPLICAZIONI IMMUNODIAGNOSTICHE DEGLI ANTICORPI MONOCLONALI: I DOSAGGI PER L'EPATITE B**

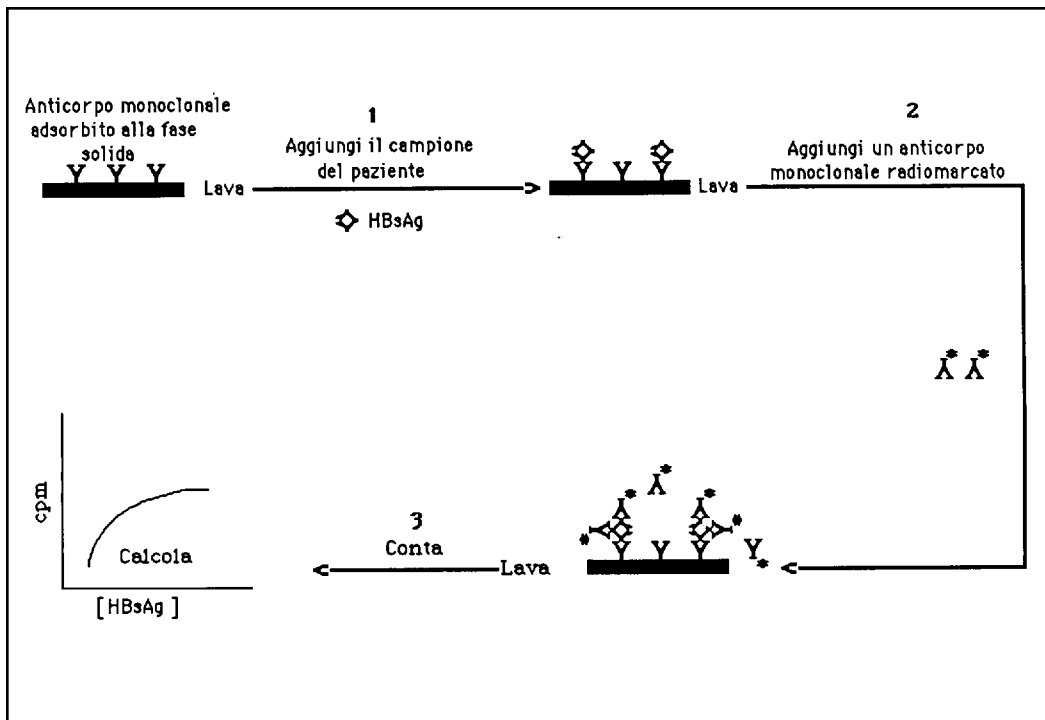
La presenza dell'antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg)-il mantello superficiale del virus dell'epatite B- nel siero del paziente è associato con la fase di incubazione e acuta dell'infezione da virus dell'epatite B. Nell'IRMA descritto in questa figura, i due anticorpi monoclonali impiegati (l'anticorpo attaccato alla fase solida e l'anticorpo radiomarcato) provengono dallo stesso ibride che secerne IgM. Essi competono, perciò, per lo stesso sito antigenico sull'HBsAg. Sembra che l'uso dell'anticorpo multivalente della classe delle IgM (che si lega a diversi antigeni), e il fatto che l'HBsAg abbia un epitopo che si ripete, aumenti la sensibilità del dosaggio. L'anticorpo monoclonale IgM viene passivamente adsorbito su un supporto in fase solida (per esempio polistirene). La fase solida viene quindi lavata per rimuovere l'anticorpo non adsorbito e ridurre al minimo l'adsorbimento non specifico alla plastica.

**Fase 1.** L'HBsAg presente nel siero in esame si attacca all'anticorpo monoclonale della classe delle IgM. La fase solida viene lavata dopo un periodo di incubazione per rimuovere l'antigene non legato.

**Fase 2.** Viene aggiunto lo stesso anticorpo monoclonale della classe delle IgM (con attaccato un radiomarcante). Questo anticorpo si lega agli epitopi simili che si ripetono sull'HBsAg legato alla fase solida. Dopo un periodo di incubazione, si rimuove mediante lavaggio l'eccesso di anticorpo monoclonale radiomarcato.

**Fase 3.** La fase solida viene sottoposta a conteggio della radioattività dell'isotopo presente, e viene calcolata la concentrazione dell'HBsAg nel siero in esame. Benchè questa concentrazione possa essere quantizzata, generalmente viene richiesta una valutazione qualitativa (positivo e negativo). La radioattività presente nella fase solida è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'HBsAg nel siero in esame.

Figura 32. APPLICAZIONI IMMUNODIAGNOSTICHE DEGLI ANTICORPI MONOCLONALI: I DOSAGGI PER L'EPATITE B



**Figura 33. APPLICAZIONI IMMUNODIAGNOSTICHE DEGLI ANTICORPI MONOCLONALI: IRMA**

Il laboratorio clinico è una delle prime aree interessate all'uso degli anticorpi monoclonali. Attualmente esistono numerosi immunodosaggi che utilizzano gli anticorpi convenzionali policlonali che mostrano interferenza, cross-reattività, e problemi di legame non specifico. Queste procedure sono candidate all'uso degli anticorpi monoclonali. Un esempio di utilizzo immunodiagnostico degli anticorpi monoclonali è il dosaggio radioimmunometrico (IRMA) a due siti. Questo impiega due differenti anticorpi monoclonali che riconoscono due distinti epitopi nello stesso antigene. Un anticorpo non compete con l'altro. Per la loro formazione non è richiesto un antigene puro, e l'IRMA è sensibile e specifico. Un IRMA differisce da un RIA convenzionale nel fatto che l'anticorpo, non l'antigene, è il reagente marcato.

Nella tecnica IRMA col doppio anticorpo a due siti, un anticorpo specifico monoclonale contro l'antigene di interesse viene adsorbito passivamente sul supporto della fase solida (per esempio polistirene). La fase solida viene quindi lavata con tampone fosfato-salino-Tween 20 per rimuovere l'anticorpo non adsorbito e ridurre al minimo l'effetto del legame non specifico sulla superficie di plastica.

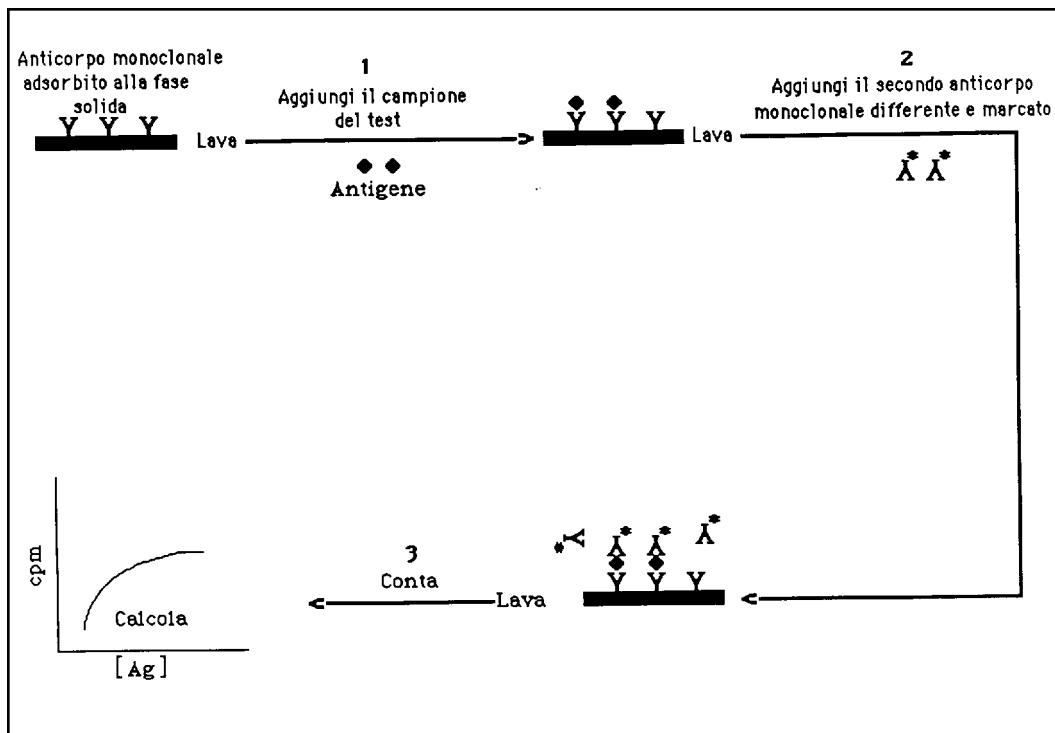
**Fase 1.** L'antigene presente nel siero in esame si attacca sul primo anticorpo monoclonale. La fase solida viene lavata dopo un periodo di incubazione per rimuovere l'antigene che non ha reagito.

**Fase 2.** Viene aggiunto il secondo (e differente) anticorpo monoclonale radiomarcato, questo si lega a differenti epitopi sull'antigene già legato. Dopo un periodo di incubazione, si rimuove per lavaggio l'eccesso di anticorpo monoclonale radiomarcato.

**Fase 3.** Viene messa a contare la fase solida per determinare la quantità di radiomarcato presente e viene calcolata la concentrazione dell'antigene nel siero in esame in base ad una serie di calibratori. La quantità di radiomarcato presente sulla fase solida è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'antigene nel siero in esame.

Quando si usano gli anticorpi monoclonali in questo IRMA a due siti, le necessità di una cromatografia per affinità per la purificazione dell'anticorpo della fase solida sono minime.

Figura 33. APPLICAZIONI IMMUNODIAGNOSTICHE DEGLI ANTICORPI MONOCLONALI: IRMA

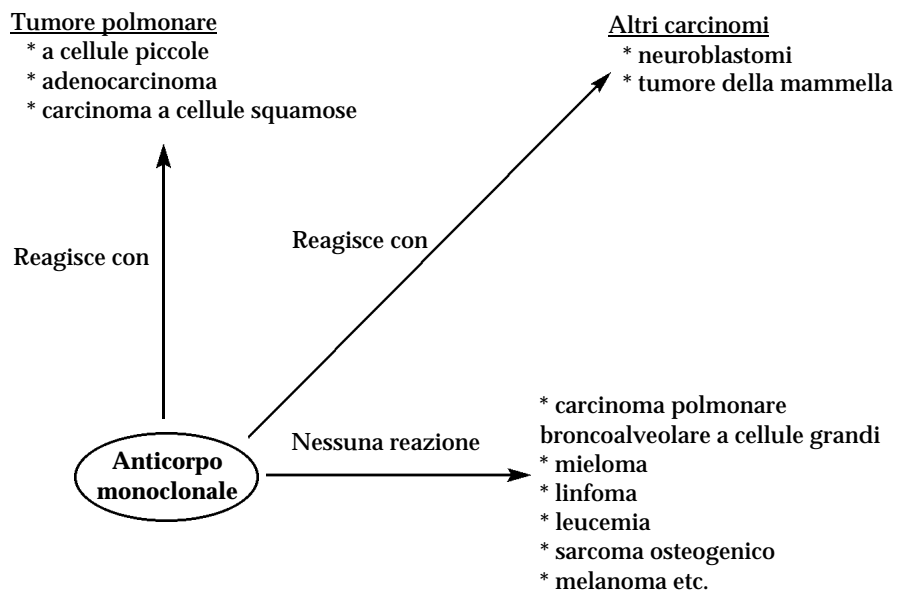


**Figura 34. ANTIGENI ASSOCIATI A TUMORE INDIVIDUATI DA ANTICORPI MONOCLONALI**

Nel campo dei marcatori tumorali, sono stati prodotti anticorpi monoclonali che individuano specifici determinanti antigenici sul melanoma, il carcinoma colo-rettale, i gliomi, i neuroblastomi, i sarcomi, i carcinomi della mammella, i carcinomi del polmone, i linfomi, ed altri carcinomi. Nell'esempio presentato, è stato prodotto un anticorpo monoclonale che reagisce con tre forme di carcinoma polmonare: il microcitoma, l'adenocarcinoma, e il carcinoma squamoso. Tuttavia, lo stesso anticorpo monoclonale reagisce anche con il neuroblastoma ed il carcinoma della mammella. Non reagisce invece con numerosi altri tumori: per esempio, il carcinoma del polmone a cellule grandi e broncoalveolare, il mieloma, il linfoma, la leucemia, il sarcoma osteogenico, ed il melanoma.

L'anticorpo monoclonale reagisce con più di una forma o un tipo di cancro - non perchè non sia specifico, ma perchè esistono determinanti antigenici comuni che riconosce in tutti i carcinomi. In alcuni casi, lo stesso determinante antigenico può essere anche presente nel tessuto normale. Questi anticorpi monoclonali possono essere utili nello studio dell'origine embrionica e le interrelazioni di vari carcinomi.

Figura 34. ANTIGENI ASSOCIATI A TUMORE INDIVIDUATI DA ANTICORPI MONOCLONALI



\* Esistono comuni determinanti antigenici sui tumori sopra citati.

\* Gli anticorpi monoclonali aiutano nello studio delle origini embrionali e nelle interrelazioni tra carcinomi.



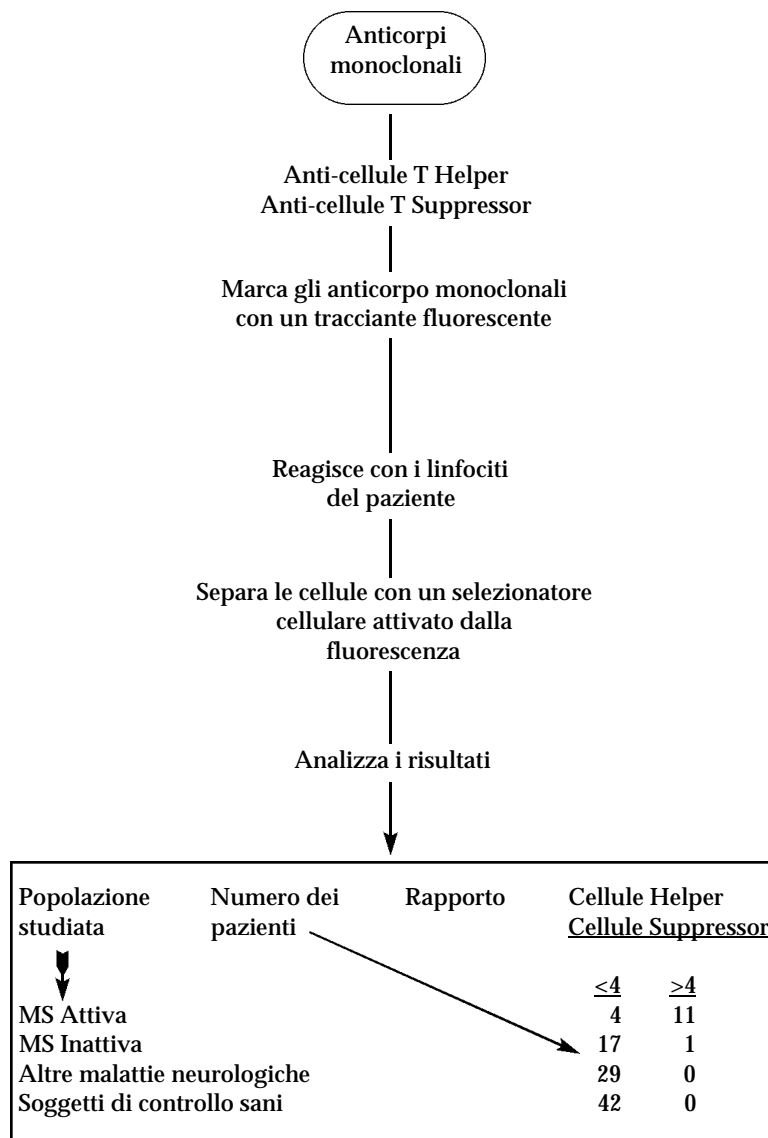
**Figura 35. ANTICORPI MONOCLONALI: IDENTIFICAZIONE DELLE SOTTO-POPOLAZIONI DELLE CELLULE T**

Un altro esempio della applicazione in vitro degli anticorpi monoclonali sta nella identificazione delle popolazioni cellulari-specificamente, l'identificazione delle sottopopolazioni delle cellule T come viene illustrato in questa figura.

Gli anticorpi monoclonali vengono prodotti contro le cellule T helper e suppressor. Questi anticorpi sono quindi marcati con un tracciante fluorescente e posti a reagire con i linfociti di pazienti affetti da sclerosi multipla (MS) in fase attiva e inattiva. I complessi anticorpo monoclonale-linfociti vengono quindi separati e posti contare utilizzando un FACS. Il FACS è uno strumento che rende possibile l'analisi di una popolazione di cellule separandole in base alla dispersione della luce ed alla fluorescenza. Il FACS può analizzare circa  $10^5$  cellule in un minuto, e individuare piccole sottopopolazioni cellulari.

Come si vede nell'esempio, il rapporto delle cellule T helper e T suppressor è elevato nella MS in fase attiva, e diminuito nei controlli sani. L'uso degli anticorpi monoclonali è utile nel dipanare il processo di immunoregolazione che contribuisce alla patogenesi della MS.

Figura 35. ANTICORPI MONOCLONALI: IDENTIFICAZIONE DELLE SOTTO-POPOLAZIONI DELLE CELLULE T



**Figura 36. GLI ANTICORPI MONOCLONALI UMANI**

Le tecniche dell'ibridoma che utilizzano ibridomi ottenuti con linfociti di topo e cellule di mieloma di topo portano alla produzione di anticorpi di topo. Questi non sono di prima scelta come mezzi diagnostici o agenti terapeutici *in vivo* nell'uomo a causa della reazione dell'individuo contro le proteine estranee. Gli anticorpi prodotti nell'animale possono immunizzare l'uomo che li riceve, ed una ulteriore iniezione può indurre reazioni allergiche acute o croniche. Benchè ci siano stati isolati successi nella produzione e nell'uso di ibridomi di linfociti umani-mieloma di topo, non si sono dimostrati ottimali. Il loro uso è stato precluso dalla progressiva perdita dei cromosomi umani e la cessazione della produzione degli anticorpi da parte dell'ibridoma. La scelta obbligata sarà l'ibridoma umano-umano per l'uso *in vivo* nell'uomo.

**Figura 36. GLI ANTICORPI MONOCLONALI UMANI**

\* Di prima scelta come diagnostico in vivo e/o agente terapeutico nell'uomo. L'anticorpo monoclonale umano evita le reazioni allergiche acute e croniche osservate con gli anticorpi monoclonali di topo.

\* Requisiti per la produzione di anticorpo monoclonale umano:

1. Una linea cellulare di mieloma che non produce anticorpi, priva di HPRT
2. Una adeguata fonte di linfociti umani immunizzati contro l'antigene desiderato.

**Figura 37. APPLICAZIONI IN VIVO DEGLI ANTICORPI MONOCLONALI**

Gli anticorpi monoclonali, a causa della loro estrema specificità, forniranno nuovi approcci alla diagnosi e al trattamento di molte malattie. Le applicazioni *in vivo* includono: l'immunizzazione contro agenti infettivi; una terapia specifica contro la tossicità da farmaci (per esempio la tossicità da digossina); un incremento della capacità di rigetto e/o della regressione del tumore; la manipolazione della risposta immune; la protezione del trapianto.

La utilizzazione di coniugati con anticorpi monoclonali per la localizzazione e l'individuazione di tumori, e per la somministrazione mirata di agenti citotossici alle cellule neoplastiche, viene discussa nella figura 38.

**Figura 37. APPLICAZIONI IN VIVO DEGLI ANTICORPI MONOCLONALI**

- \* Immunizzazione contro agenti infettivi
- \* Terapia per la tossicità da farmaci
- \* Protezione del trapianto
- \* Potenziamento del rigetto del tumore
- \* Manipolazione della risposta immune
- \* Spia per la individuazione e la localizzazione del tumore
- \* Distribuzione di agenti citotossici alle cellule tumorali.

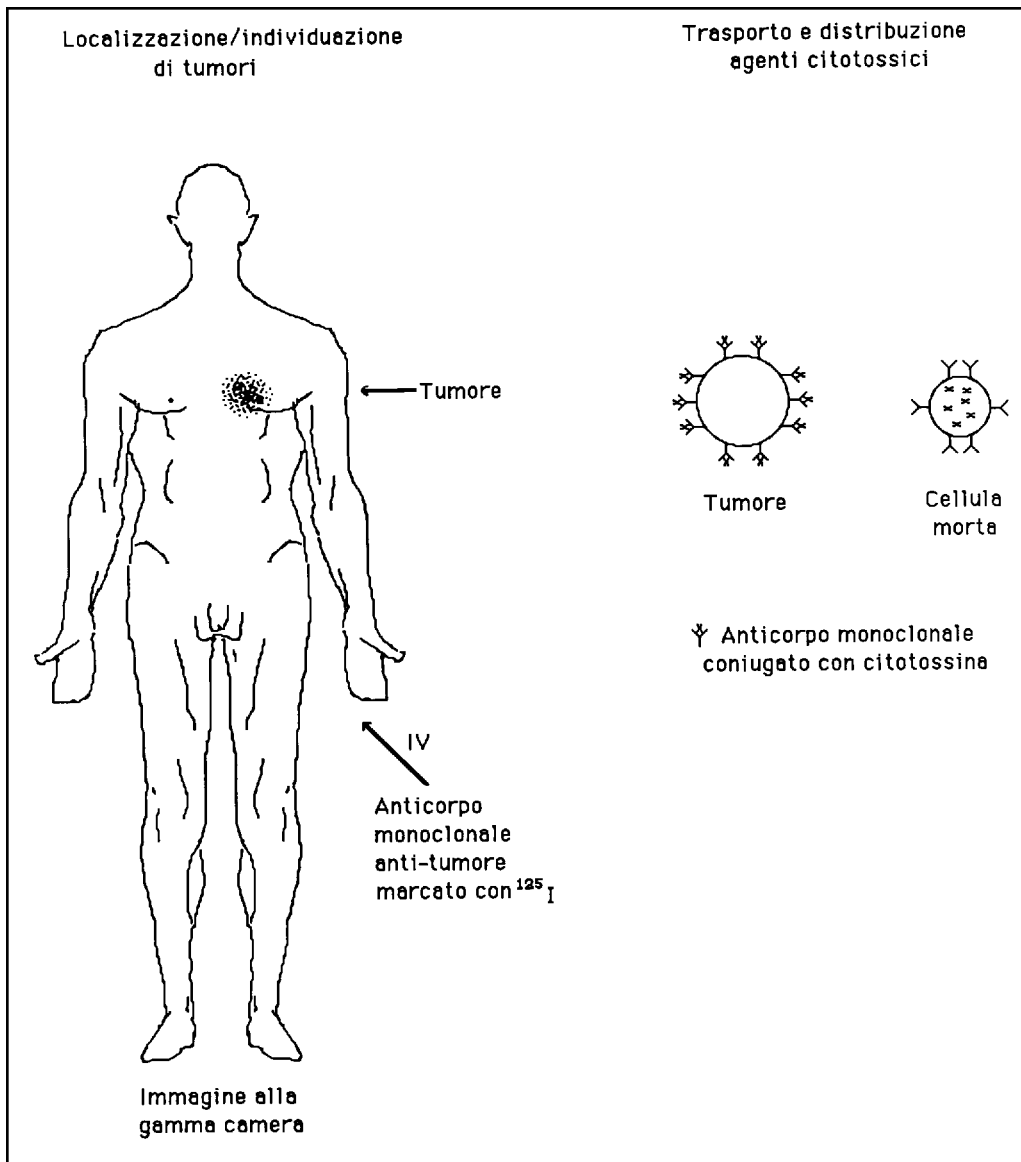
**Figura 38. APPLICAZIONI *IN VIVO* DEGLI ANTICORPI MONOCLONALI: LOCALIZZAZIONE/INDIVIDUAZIONE DI TUMORE E TRASPORTO DI AGENTI CITOTOSSICI.**

Due dei più eccitanti campi tra le applicazioni *in vivo* degli anticorpi monoclonali sono rappresentati dalla possibilità di localizzazione/individuazione del tumore ed il trasporto in questo di agenti citotossici nella diagnosi ed il trattamento del carcinoma.

I tumori possono essere localizzati *in vivo* con una scintigrafia a raggi gamma dopo l'iniezione di un anticorpo monoclonale radiomarcato specifico per il tumore. La specificità della procedura viene incrementata sottraendo le radiazioni prodotte da un anticorpo radiomarcato indifferente della stessa classe di immunoglobuline di quello utilizzato specifico per il tumore (un "bianco").

Il trasporto e la distribuzione di agenti citotossici all'interno del tumore può essere ottenuta coniugando l'agente tossico con anticorpi monoclonali specifici per il tumore. La tossina difterica, per esempio, è costituita da due catene polipeptidiche, una porzione legante specifica per il recettore sulla superficie cellulare, ed una porzione enzimaticamente attiva che la cellula internalizza e che inibisce la sintesi proteica. Se la porzione legante viene sostituita con un anticorpo monoclonale, l'attività citotossica generale della tossina viene eliminata e l'anticorpo monoclonale trasferisce la porzione enzimaticamente attiva specificamente alla cellula tumorale. Altre sostanze che possono essere trasportate al tumore tramite gli anticorpi monoclonali sono l'interferon e numerosi farmaci antitumorali.

Figura 38. **APPLICAZIONI IN VIVO DEGLI ANTICORPI MONOCLONALI: LOCALIZZAZIONE/INDIVIDUAZIONE DI TUMORE E TRASPORTO DI AGENTI CITOTOSSICI.**





## Bibliografia

1. Diamond B.A., Yelton D.E., Scharff M.D., "Monoclonal Antibodies", *The Engl. J. Med.*, **304**, 1344 (1981).
2. White A., Handler P., Smith E.C., Hill R.L., and Lehman I.R. (eds.), *Principles of Biochemistry*, McGraw-Hill, 1978.
3. Nisonoff A., Hopper J.E. and Spring S.B., *The Antibody Molecule*, New York: Academic Press, 1975.
4. Bellanti J.A., *Immunology*, Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1971.
5. Kabat E.A., "Basic Principles of Antigen-Antibody Reactions", *Methods in Enzymology*, **70**, 3, (1980).
6. Wands I.R., Carlson R.I., Schoemaker H. et al., "Immunodiagnosis of hepatitis B with High-Affinity IgM Monoclonal Antibodies", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **78**, 1214 (1981).
7. McGregor A.M., "Monoclonal Antibodies: Production and Use", *Brit. Med. J.*, **283**, 1143 (1981).
8. Sevier E.D., David G.S., Martinis J. et al., "Monoclonal Antibodies in Clinical Immunology", *Clin. Chem.*, **27**, 1797 (1981).
9. Zola H., "Monoclonal Antibodies Against Human Cell Membrane Antigens: A review", *Pathology*, **122**, 539 (1980).
10. Olsson L. and Kaplan H.S., "Human-Human Hybridomas Producing Monoclonal Antibodies of Predefined Antigenic Specificity", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **77**, 5429, (1980).
11. Croce C.M., Linnenbach A., Hall W. et al., "Production of Human Hybridomas Secreting Antibodies to Measles Virus", *Nature*, **288**, 488 (1980).
12. Nakamura R.M. and Maggio E.T., "Monoclonal Antibodies-Methods of Production and Applications", *Ligand Rev.* (1981).
13. Eisenbarth G.S., "Application of Monoclonal Antibody Techniques to Biochemical Research", *Anal. Biochem.*, **111**, 1 (1981).
14. Yelton D.E. and Sharff M.D., "Monoclonal Antibodies: A powerful New Tool in Biology and Medicine", *Ann. Rev. Biochem.*, **50**, 657 (1981)
15. Ballou B., Levine G., Hakala T.R. et al., "Tumor Location Detected with Radioactively Labeled Monoclonal Antibody and External Scintigraphy", *Science*, **206**, 844 (1979).
16. Blythman H.E., Casellas P., Gros O. et al., "Immunotoxins: Hybrid Molecules of Monoclonal Antibodies and a Toxic Subunit Specifically Kill Tumor Cells", *Nature*, **290**, 145 (1981).
18. Reinherz E.L., Weiner H.L., Hauser S.L. et al., "Loss of Suppressor T Cells in Active Multiple Sclerosis: Analysis with Monoclonal Antibodies", *New Engl. J. Med.*, **303**, 125 (1980).
19. Cuttita F., Rosen S., Gazdar A.F. et al., "Monoclonal Antibodies That demonstrate Specificity for Several Types of Human Lung Cancer", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **78**, 4591 (1981).

## Indice

Istruzioni per gli Autori .....	pag. 2
Editoriale.....	» 3
Figura 1. L'antigene .....	» 4
Figura 2. L'anticorpo: definizione e funzioni.....	» 6
Figura 3. Le immunoglobuline: la regione delle gamma globuline ..	» 8
Figura 4. Le immunoglobuline: le cinque classi più importanti ..	» 10
Figura 5. La struttura delle immunoglobuline.....	» 12
Figura 6. La frammentazione delle immunoglobuline.....	» 14
Figura 7. Relazioni tra struttura/funzione dell'anticorpo .....	» 16
Figura 8. Le classi più importanti delle immunoglobuline: IgG-funzione e struttura.....	» 18
Figura 9. Sottoclassi delle immunoglobuline G.....	» 20
Figura 10. Le classi più importanti delle immunoglobuline: IgM-funzione e struttura.....	» 22
Figura 11. Le classi più importanti delle immunoglobuline: IgA-funzione e struttura.....	» 24
Figura 12. IgA secretoria .....	» 26
Figura 13. Le classi più importanti delle immunoglobuline: IgD-funzione e struttura .....	» 28
Figura 14. Le classi più importanti delle immunoglobuline: IgE-funzione e struttura .....	» 30
Figura 15. Il sistema immune e la produzione di anticorpo.....	» 32
Figura 16. La risposta anticorpale convenzionale policlonale.....	» 34
Figura 17. La risposta anticorpale monoclonale .....	» 36
Figura 18. L'ibridoma e la produzione di anticorpo monoclonale: schema generale .....	» 38
Figura 19. La produzione dell'ibridoma (1) .....	» 40
Figura 20. La produzione dell'ibridoma (2) .....	» 42

Figura 21. Il terreno di crescita HAT: formazione di ipoxantina e purina .....	» 44
Figura 22. Il terreno di crescita HAT: l'aminopterina.....	» 46
Figura 23. Il terreno di crescita HAT .....	» 48
Figura 24. I dosaggi di screening per individuare gli ibridomi che secernono specifici anticorpi: ELISA (1) .....	» 50
Figura 25. I dosaggi di screening per individuare gli ibridomi che secernono specifici anticorpi: ELISA (2) .....	» 52
Figura 26. I dosaggi di screening per individuare gli ibridomi che secernono specifici anticorpi: RIA (1) .....	» 54
Figura 27. I dosaggi di screening per individuare gli ibridomi che secernono specifici anticorpi: RIA (2) .....	» 56
Figura 28. Le tappe più importanti nella produzione di anticorpo monoclonale: riassunto.....	» 58
Figura 29. Anticorpi monoclonali: vantaggi.....	» 60
Figura 30. Anticorpi monoclonali: svantaggi.....	» 62
Figura 31. Applicazioni in vitro degli anticorpi monoclonali .....	» 64
Figura 32. Applicazioni immunodiagnostiche degli anticorpi monoclonali: i dosaggi per l'epatite B .....	» 66
Figura 33. Applicazioni immunodiagnostiche degli anticorpi monoclonali: IRMA .....	» 68
Figura 34. Antigeni associati a tumore individuati da anticorpi monoclonali .....	» 70
Figura 35. Anticorpi monoclonali: identificazione delle sottopopolazioni delle cellule T .....	» 72
Figura 36. Gli anticorpi monoclonali umani.....	» 74
Figura 37. Applicazioni in vivo degli anticorpi monoclonali .....	» 76
Figura 38. Applicazioni in vivo degli anticorpi monoclonali: localizzazione/individuazione di tumore e trasporto di agenti citotossici .....	» 78
Bibliografia .....	» 80
Indice .....	» 81

# Caleidoscopio

*Italiano*

1. Rassu S.: *Principi generali di endocrinologia*. Gennaio '83
2. Rassu S.: *L'ipotalamo endocrino*. Giugno '83
3. Rassu S.: *L'ipofisi*. Dicembre '83
4. Alagna., Masala A.: *La prolattina*. Aprile '84
5. Rassu S.: *Il pancreas endocrino*. Giugno '84
6. Fiorini I., Nardini A.: *Citomegalovirus, Herpes virus, Rubella virus (in gravidanza)*. Luglio '84.
7. Rassu S.: *L'obesità*. Settembre '84
8. Franceschetti F., Ferraretti A.P, Bolelli G.F., Bulletti C.: *Aspetti morfofunzionali dell'ovaio*. Novembre '84.
9. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (1)*. Dicembre '84.
10. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (2) parte prima*. Gennaio '85.
11. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (2) parte seconda*. Febbraio '85.
12. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (3) parte prima*. Aprile '85.
13. Nacamulli D, Girelli M.E, Zanatta G.P, Busnardo B.: *Il TSH*. Giugno '85.
14. Facchinetti F. e Petraglia F.: *La -endorfina plasmatica e liquorale*. Agosto '85.
15. Baccini C.: *Le droghe d'abuso (1)*. Ottobre '85.
16. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (3) parte seconda*. Dicembre '85.
17. Nuti R.: *Fisiologia della vitamina D: Trattamento dell'osteoporosi post-menopausale*. Febbraio '86
18. Cavallaro E.: *Ipnosi: una introduzione psicofisiologica*. Marzo '86.
19. Fanetti G.: *AIDS: trasfusione di sangue emoderivati ed emocomponenti*. Maggio '86.
20. Fiorini I., Nardini A.: *Toxoplasmosi, immunologia e clinica*. Luglio '86.
21. Limone P.: *Il feocromocitoma*. Settembre '86.
22. Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Flamigni C.: *Il Testicolo. Aspetti morfo-funzionali e clinici*. Novembre '86.
23. Bolcato A.: *Allergia*. Gennaio '87.
24. Kubasik N.P.: *Il dosaggio enzimologico e fluoroimmunologico*. Febbraio '87.
25. Carani C.: *Patologie sessuali endocrino-metaboliche*. Marzo '87.
26. Sanna M., Carcassi R., Rassu S.: *Le banche dati in medicina*. Maggio '87.
27. Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Jasonni V.M., Flamigni C.:

- L'amenorrea.* Giugno '87.
28. Zilli A., Pagni E., Piazza M.: *Il paziente terminale.* Luglio '87.
  29. Pisani E., Montanari E., Patelli E., Trinchieri A., Mandressi A.: *Patologie prostatiche.* Settembre '87.
  30. Cingolani M.: *Manuale di ematologia e citologia ematologica.* Novembre '87.
  31. Kubasik N.P.: *Ibridomi ed anticorpi monoclonali.* Gennaio '88.

**Caleidoscopio**  
**Rivista mensile di Medicina**  
anno 6, numero 31

**Direttore Responsabile**

Sergio Rasso  
Via Pietro Nenni, 6  
07100 Sassari  
Tel.-Fax 079 270464  
Tel. mobile 0338 2202502  
E-mail: rasso@ssnet.it

**Responsabile Ufficio Acquisti**

Giusi Cunietti

**EDITORE**

**Consulenti di Redazione**

Giancarlo Mazzocchi ed  
Angelo Maggio

**Segretaria di Direzione**

Letizia Cuccuru

**Servizio Abbonamenti**

Maria Grazia Papalia  
Flavio Damarciasi

Via Rio Torbido, 40  
16165 Genova (Italy)

Tel. (010) 83401 Numero Verde 800 801005 (senza prefisso);  
Telefax (010) 803498- 809070.

Internet URL: <http://medicalsistemas.editoria.com> e <http://www.medicalsistemas.it>  
La Medical Systems pubblica anche le seguenti riviste: Journal of Clinical Ligand Assay,  
Guida Pratica Immulite<sup>®</sup>, Caleidoscopio, Kaleidoscope, Caleidoscopio letterario, Pandora,  
Journal of Preventive Medicine and Hygiene, Tribuna Biologica e Medica.

**Stampa**

Tipolitografia ATA  
16143 Genova - Via G. Torti, 32 c.r.  
Tel. (010) 513120 - Fax (010) 503320

Registrazione Tribunale di Genova n. 34 del 31/7/1996  
Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa n° 2661 del 2 Settembre 1989

Finito di stampare: Gennaio 1988  
Sped. in Abb. Post. 45%

Pubblicazione protetta a norma di legge dall'Ufficio proprietà letteraria, artistica e  
scientifica della Presidenza del Consiglio dei Ministri, dedicata all'aggiornamento  
professionale continuo e riservata ai medici.

Caleidoscopio viene anche letto e rilanciato da:  
"L'ECO DELLA STAMPA"  
Via Compagnoni, 28 - Milano