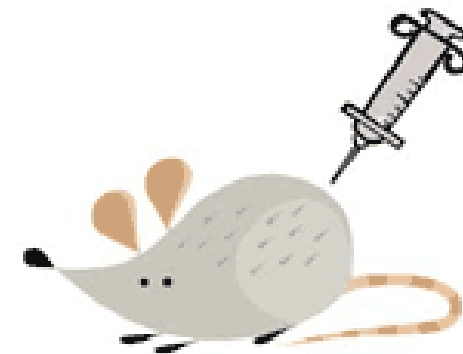
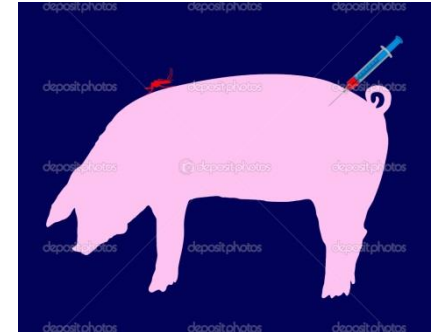
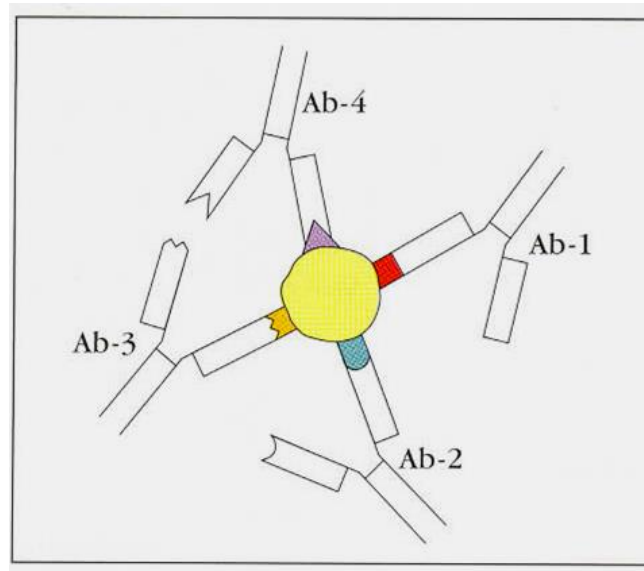
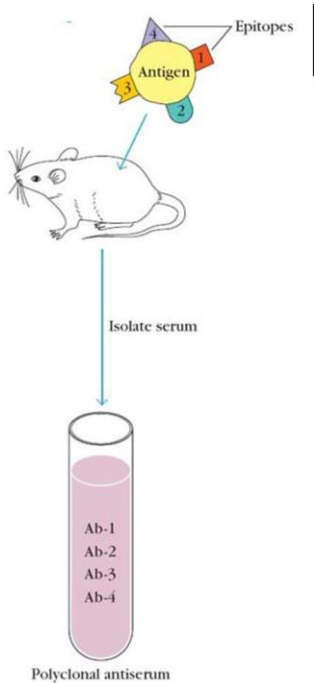


**Ab monoclonali**

# Anticorpi policlonali



**ANTISIERO** = 1 miscela di Ab con diverse avidità e affinità si diretti sia contro lo stesso epitopo che contro diversi epitopi dello stesso Ag





## SVANTAGGI nell'utilizzo:

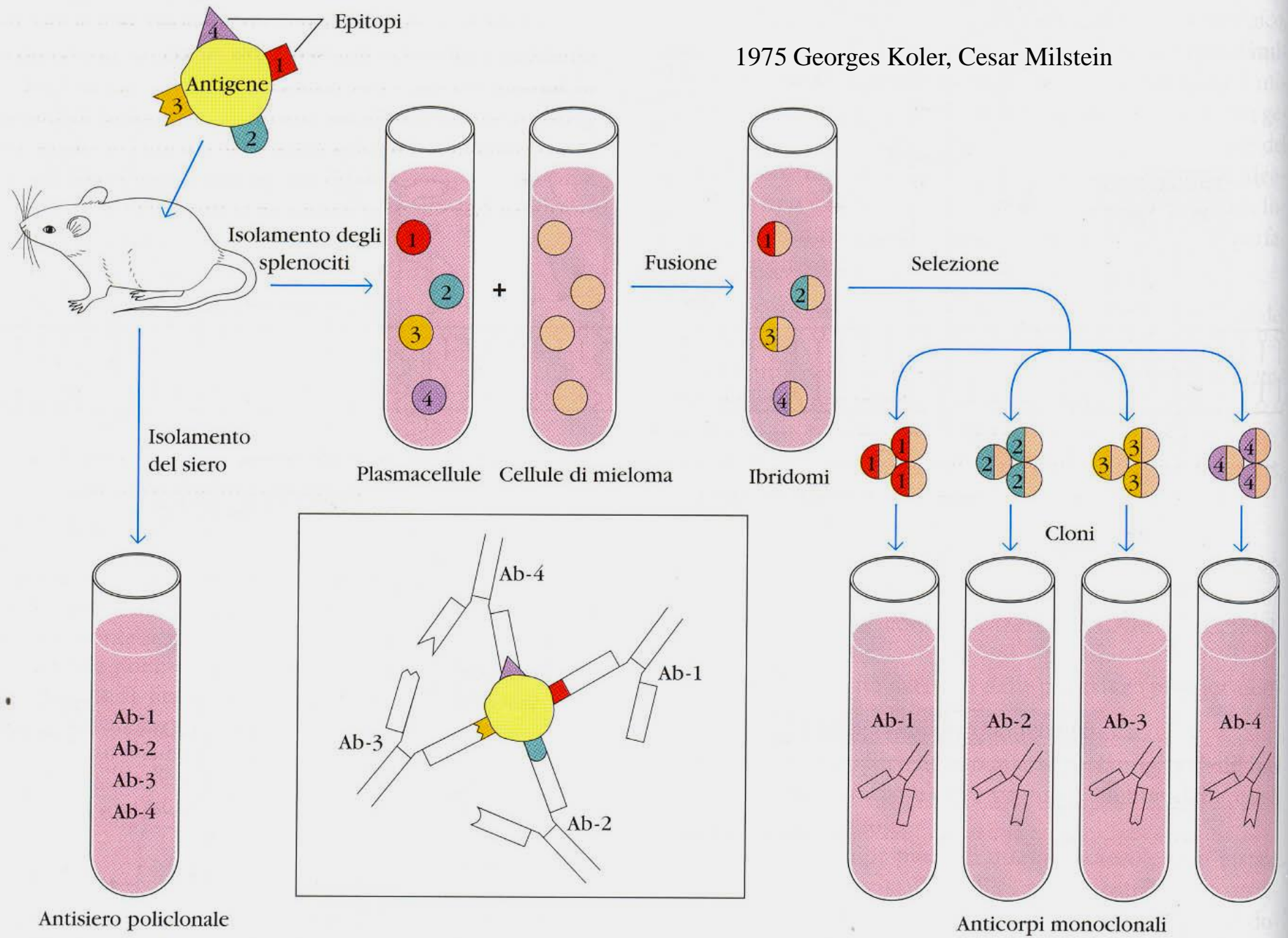
Ogni antisiero è diverso dall'altro

Se ne produce poco volume: pochi esperimenti possono essere condotti con lo stesso preparato

Per la purificazione si usa la cromatografia di affinità: si può ottenere una popolazione **MINORE** contaminante di Ab con reazioni crociate



1975 Georges Koler, Cesar Milstein



Antisiero policlonale

Anticorpi monoclonali

# Cellule di mieloma

- non producono Ig
- Gli enzimi Ipoxantina guanina fosforibosil transferasi (HGPRT) e Timidin Kinasi (TK) sono assenti

quindi muoiono se messe in terreno HAT



Via di biosintesi "De novo"

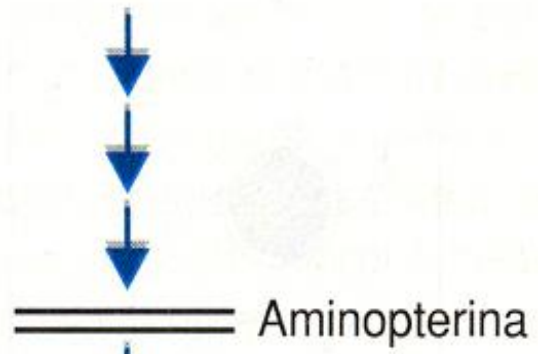
Vie alternative

FOSFORIBOSIL-PIROFOSFATO

TIMIDINA

IPOXANTINA

+ URIDILATO



↓ Timidin-chinasi (Tk)

↓ Ipoantina guanina fosforibosil-transferasi (HGPRT)

ENZIMI ASSENTI NELLE LINEE MUTANTI DI MIELOMA USATE PER LA FUSIONE

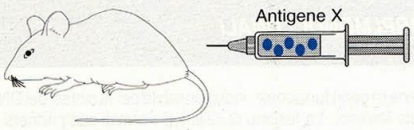


NUCLEOTIDI

A: blocca l'enzima necessario per la sintesi endogena delle basi azotate

**HAT:**  
 Ipoantina  
 Aminopterina  
 Timidina

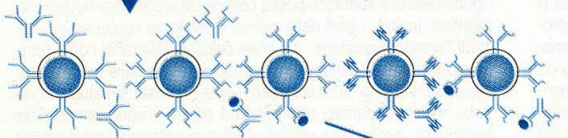
Via di sintesi delle PURINE



# Georges Kohler e Cesar Milstein

## Linfociti di topo muoiono per senescenza

Isolamento delle cellule spleniche da un topo immunizzato con l'antigene X



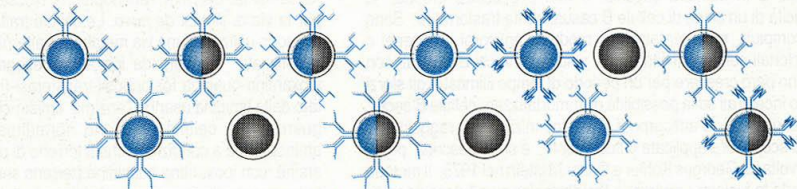
Mistura di cellule spleniche, tra cui alcune produttrici anticorpi anti-X



Linea mutante di mieloma; incapace di crescere in terreno selettivo HAT, non produce anticorpi

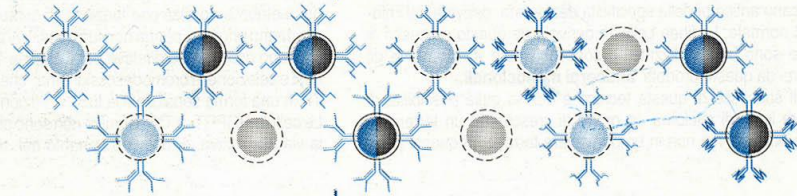
FUSIONE

Mistura di cellule fuse e non

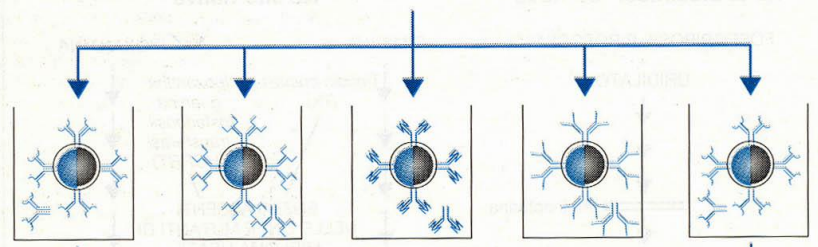


Selezione in vitro in terreno HAT

Solo le cellule fuse (ibridomi) crescono



Clonaggio delle cellule (così che ciascun pozzetto contenga la progenie di una sola cellula)



Test dei sovranatanti per la presenza di anticorpi anti-X, ed espansione dei cloni positivi



## Clonazione per diluizione limite

B. Produzione di ibridomi

IBRIDOMI PRODUCENTI ANTICORPI MONOCLONALI ANTI-X

# Principali applicazioni degli Ab monoclonali

1. **Identificazione di marcatori fenotipici** specifici per particolari tipi cellulari.

2. **Immunodiagnosi.**

(La diagnosi di numerose infezioni e malattie sistemiche si basa sulla dimostrazione di specifici Ag e/o Ab in circolo o nei tessuti, usando mAb in test immunologici).

3. **Diagnosi dei tumori.**

(mAb tumore specifici vengono utilizzati per evidenziare tumori).

4. **Analisi e blocco funzionale delle molecole** cellulari di superficie e di secrezione.

(mAb che si legano a molecole cellulari di superficie stimolando o inibendo una particolare funzione cellulare. Es. recettori per Ag. mAb anti citochine neutralizzanti usati per capire il loro ruolo funzionale).



mAb murini iniettati in uomo



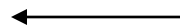
Riconosciuti come estranei



Ab



1. Ridotta efficacia
2. eliminazione



immunocomplessi



Vasculiti,  
glomerulonefriti

mAb solitamente sono prodotti in **topo**,  
raramente in ratto

## Ab umani estremamente rari!

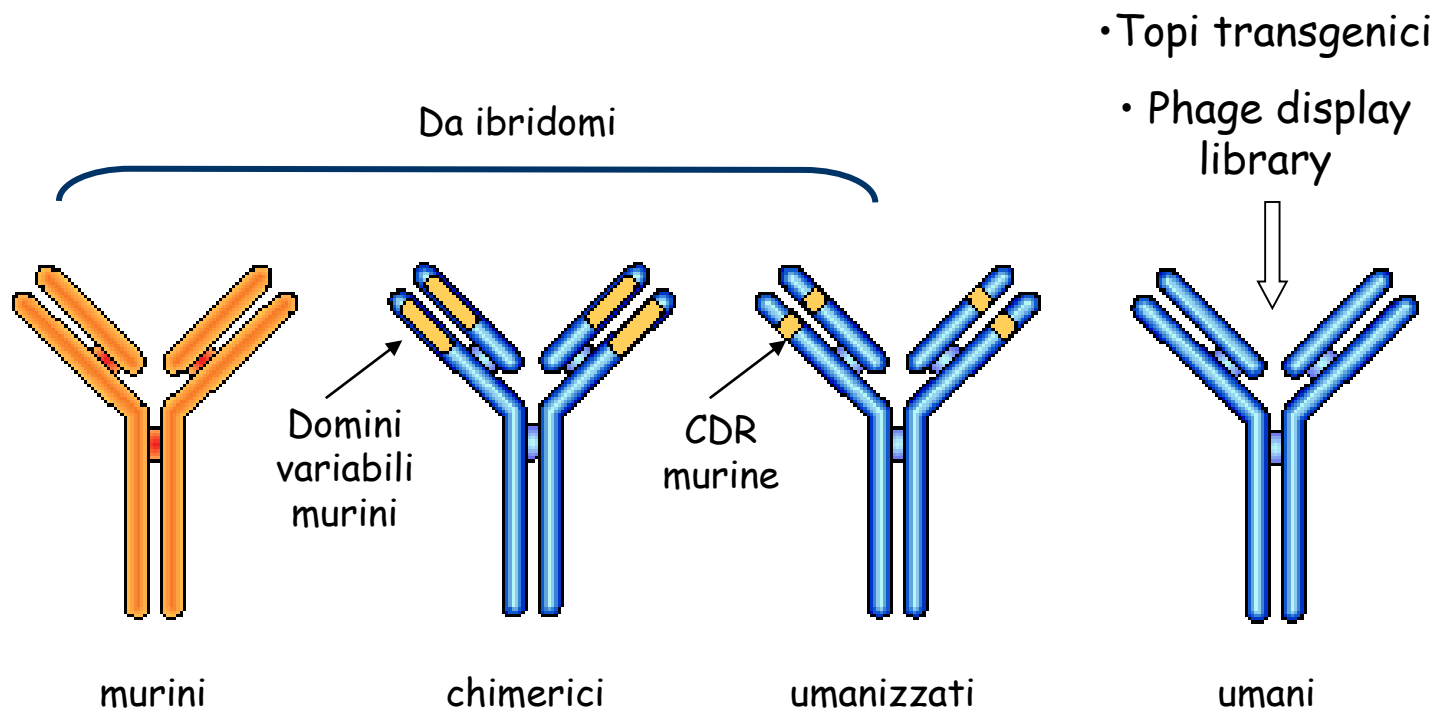
- IBRIDI (Mieloma+Linf B umani) sono difficili da coltivare
- Si potrebbe immortalizzare B con il virus di Epstein Barr (EBV) => non sono buoni Ab

# Ab ricombinanti

## Ingegneria anticorpale

- Diminuita immunogenicità
- Aumentata efficacia terapeutica

# Ingegnerizzazione degli anticorpi



• Topi transgenici

• Phage display library

Da ibridomi

Domini  
variabili  
murini

CDR  
murine

murini

chimerici

umanizzati

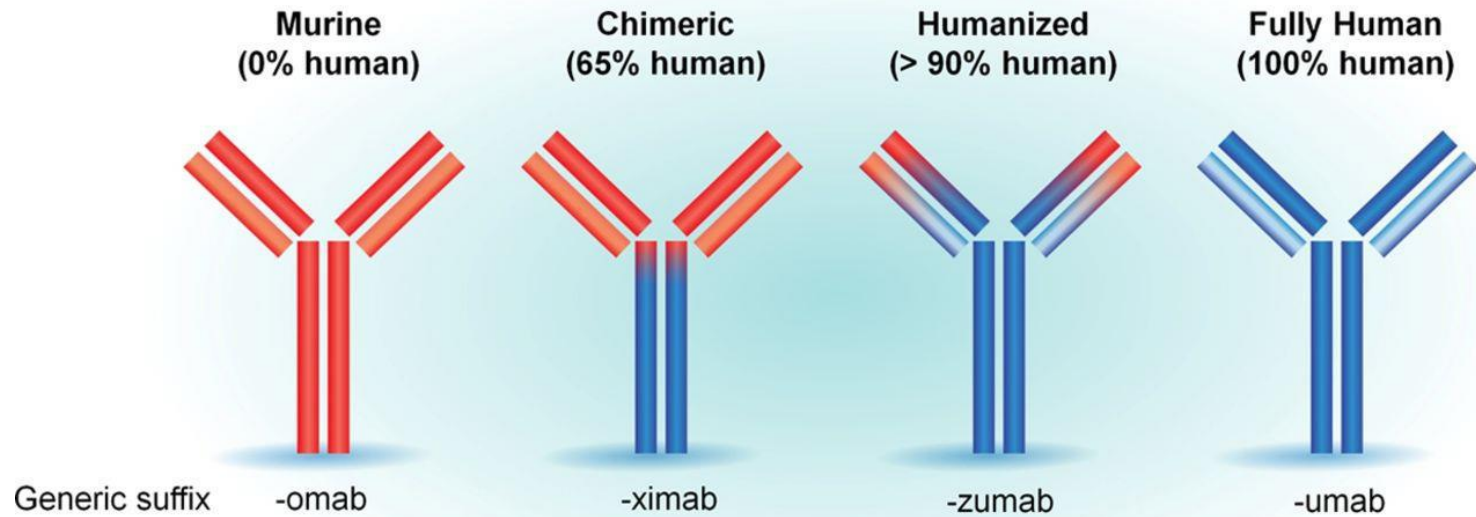
umani

Da ingegneria genetica e tecnologia del  
DNA ricombinante

**Immunogeni; breve emivita;  
regione Fc murina è debole  
attivatore delle funzioni  
immunitarie umane**

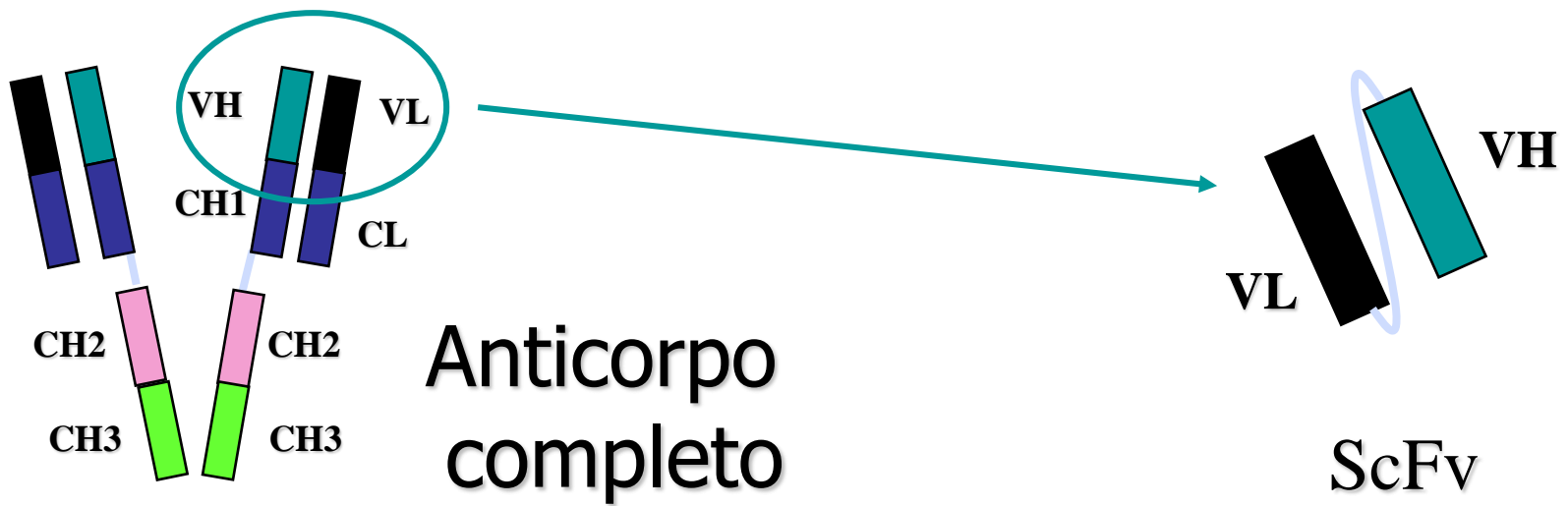
**Meno immunogeni;  
prolungata emivita sierica;  
permettono l'attivazione delle  
funzioni effettrici mediate dall'Fc**

# Nomenclatura



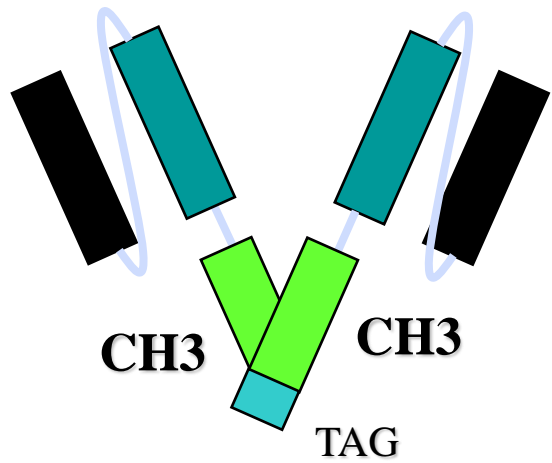
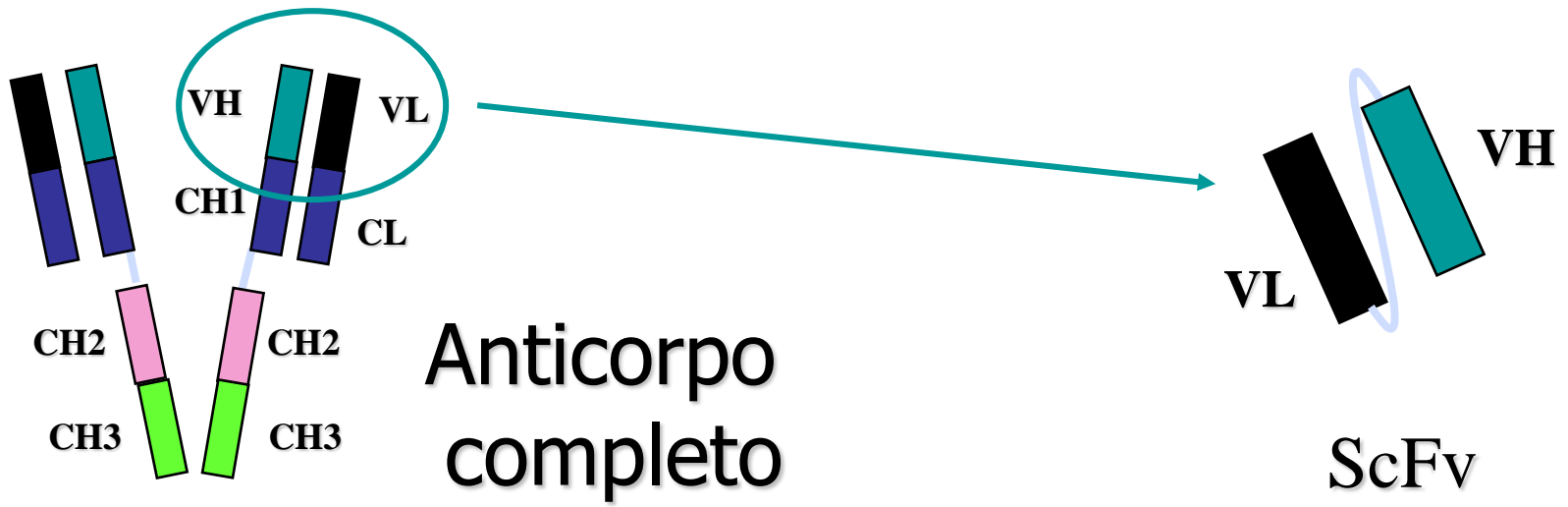
Infliximab and adalimumab are therapeutic monoclonal antibodies that target tumor necrosis factor-alpha (TNF-a)



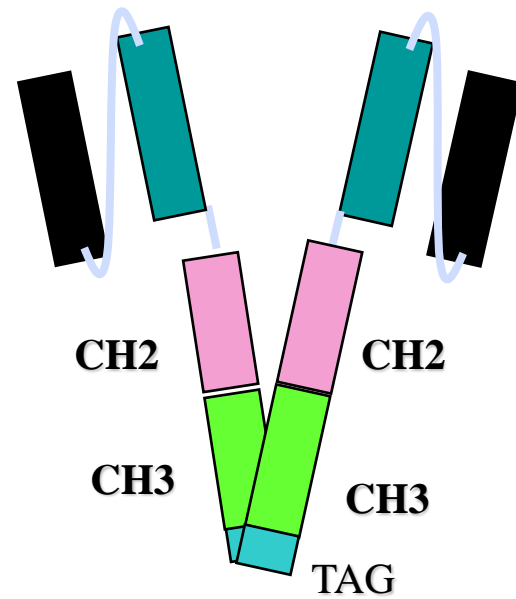


- È monomero
- Emivita breve
- Manca di funzioni effettrici:  
CDC, ADCC, opsonizzazione

**Single chain fragment variable**



**CH3-Minibody**



**CH2-3-Minibody**



*Gli immunoconiugati sono formati dal legame di un anticorpo (IgG) o di un frammento anticorpale (Fab' o scFv) a molecole terapeutiche come tossine (immunotossine), farmaci (farmaci immunoconiugati), radioisotopi (radioimmunoterapia) o enzimi (ADEPT).*

