



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETA' INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101997900609403
Data Deposito	08/07/1997
Data Pubblicazione	08/01/1999

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		
Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	N		

Titolo

MUTANTI DI PROTEINE GEF E PLASMIDI IDONEI PER LA LORO SINTESI

5219 M Descrizione dell'invenzione industriale avente per titolo:

PB/ac "MUTANTI DI PROTEINE GEF E PLASMIDI IDONEI PER LA LORO SINTESI"

a nome : DOMPE' S.p.A.

con sede in: L'Aquila

58 LUG. 1997,

* * * MI 97 A 1627

La presente invenzione ha per oggetto una sequenza amminoacidica di un fattore di scambio dei nucleotidi guanilici (GEF) comprendente un tratto di dominio catalitico in cui il triptofano (W), corrispondente alla posizione 1054 della proteina di classe GEF denominata CDC25^{Mm}, è mutato in un amminoacido acido.

Un altro oggetto dell'invenzione riguarda la sequenza genica codificante per detta sequenza amminoacidica, in cui il codone corrispondente a detto triptofano è mutato in un codone per un amminoacido acido.

I polipeptidi/proteine dell'invenzione sono utili in quanto intervengono nel ciclo di attivazione delle proteine della famiglia ras provocandone un'attenuazione per "sequestro" delle stesse in forma di complesso GEF-mutante/ras privo di nucleotide, bloccando così la via di trasduzione del segnale a cui dette proteine ras prendono parte; questa azione di inibizione del ciclo di ras può avere applicazioni sia nella ricerca che nel trattamento delle patologie correlate alle alterazioni funzionali delle proteine ras.

Sfondo dell'invenzione

E' noto il ruolo fondamentale giocato dalle proteine ras nel

controllo del differenziamento e della proliferazione cellulare.

Nello svolgimento delle loro funzioni, esse agiscono come interruttori molecolari ciclando tra uno stato attivo legato al GTP ed uno stato inattivo legato al GDP, in conseguenza del passaggio tra una serie di stati conformazionali diversi. La proteina inattiva (legata al GDP), in seguito ad eventuali stimoli, rilascia il GDP raggiungendo uno stato "vuoto" transiente, che lega poi il GTP raggiungendo così lo stato attivo. L'attività GTPasica intrinseca idrolizza il GTP riportando Ras allo stato inattivo. Questo ciclo è unidirezionale a causa dell'irreversibilità della reazione GTPasica e del fatto che la concentrazione intracellulare di GTP è circa 10 volte superiore a quella del GDP, ed è quindi il GTP che lega preferenzialmente lo stato "vuoto".

Il ciclo di Ras sopra descritto, e quindi i livelli di proteina Ras attiva dipendono dalle attività relative di due classi di proteine che sono i "targets" di segnali extracellulari. Le GAP, "GTPase Activating Proteins" stimolano l'attività GTPasica intrinseca delle proteine Ras mentre le GEF, "Guanine nucleotide Exchange Factors", catalizzano lo scambio GDP/GTP favorendo quindi la formazione del complesso attivo Ras-GTP (si veda la Figura 1).

Una serie di esperimenti effettuati sia con tecniche di mutagenesi sito-specifica che con delezioni hanno evidenziato l'esistenza di più regioni di interazione tra le proteine Ras e il dominio "catalitico" dei fattori di scambio, in particolare sembrano importanti le regioni comprese nella regione Loop L4/switch2 (aa 64-77). L'esistenza di un intermedio GEF/Ras è stata dimostrata sia in vitro che in vivo ed è alla

base dell'effetto dominante negativo esercitato dai mutanti di ras nelle posizioni 15, 16 e 17, i quali hanno una ridotta affinità per i nucleotidi e sequestrano GEF come complessi Ras/GEF inattivi.

Il primo fattore di scambio specifico per le proteine Ras ad essere stato clonato e sequenziato è stato il prodotto del gene CDC25 di *Saccharomyces cerevisiae* (Camonis et al. (1986); Martegani E. et al. (1986) EMBO J. 5, 2363).

Due classi di Ras-GEF sono state fino ad ora identificate in mammiferi: la p140 codificata da CDC25^{Mm} (denominata anche Ras-GRF) (Martegani E. et al. (1992) EMBO J. 11 :2151-2157; Shou C., et al. (1992) Nature 358, 351-354) e le Sos di mammifero (Botwell D. et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 6511-6515; Chardin P. et al. (1993) Science 260, 1338-1343). CDC25^{Mm} è stato il primo fattore di scambio di mammifero clonato sfruttando la complementazione funzionale di mutazioni cdc25 di lievito (Martegani E. et al. (1992) supra). Il cDNA completo codifica per una proteina di 140 kDa espressa solamente nel sistema nervoso centrale. Proteine altamente omologhe sono state successivamente identificate in cervello di ratto (Ras-GRF) (Shou C. et al. (1992) supra) e in cervello umano (human-CDC25) (Park W. et al. (1994) Mol. Cell. Biol. 14, 8117-8122). Tale proteina contiene nella regione C-terminale un dominio di 240 aa omologo strutturalmente e funzionalmente alla regione catalitica di CDC25 di lievito (Fig. 2). Sia l'intera proteina di 140 kDa che forme troncate contenenti regioni C-terminali sono attive in lievito dove suppliscono alla mancanza di CDC25 endogeno, inoltre sono efficienti fattori di scambio in vitro sia per la

p21-H-Ras che per la RAS2 di lievito, mentre sono inattive sulle altre proteine Ras-like (Ral, Rap, Rac, ecc.). Sia la p140 intera che le forme troncate sono efficaci attivatori della p21^{Ras} in vivo e potenzialmente trasformanti.

I domini catalitici dei GEF CDL25^{mn}-like e 505-like sono estremamente conservati tra loro e con CDC25 di *S. Cerevisiae* sia dal punto di vista strutturale (si vedano gli allineamenti riportati in Figura 3) che funzionale, come dimostrato dalla capacità dei suddetti domini catalitici da GEF mammiferi di complementare la mutazione *cdc25* di *S. Cerevisiae*.

Le proteine ras, una volta passate allo stato attivo in forma legata al GTP possono interagire attraverso la regione L2, con il target o effettore. Questo porta alla conseguente attivazione a cascata della via delle "Mitogen Activated Protein Kinases" (MAPKs) o "Extracellular signal-Regulated Kinases" (ERKs) (Marshall C.J. (1995) Cell 80:179-185; Burgering B.M.T. e Bos J.L. (1995) TIBS 20:18-22). La MAPK attivata dalla doppia fosforilazione in treonina e tirosina migra poi nel nucleo dove può fosforilare fattori di trascrizione inducendo la trascrizione di nuovi geni, tra cui fos.

Sommario dell'invenzione

Si è ora trovato che la mutazione dell'amminoacido triptofano altamente conservato nel dominio catalitico delle proteine GEF, nella posizione corrispondente all'amminoacido 1054 di CDC25^{Mm}, con un amminoacido acido, preferibilmente con acido glutammico, è in grado di "attenuare" la via di trasduzione mediata da ras, legandosi alle

proteine ras in maniera stabile, e dunque "sequestrandole" come complesso ras-GEF inattivo.

Tale mutazione è risultata dominante negativa, proprio per il fatto che la proteina GEF con mutazione corrispondente a W1054E (di CDC25^{Mm}, può associarsi in modo irreversibile a ras. La scoperta di detto effetto da parte di molecole di tipo GEF mutate, comprendendo nel termine "molecole" le proteine intere o loro frammenti peptidici, consente di effettuare interventi farmacologici mirati in alterazioni patologiche in cui sia attivata la via di ras, quali crescita neoplastica o formazione di neointima in seguito a trattamento angioplastico.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

Con il fine di individuare possibili amminoacidi coinvolti nell'interazione tra la regione catalitica di CDC25^{Mm} e le proteine Ras, responsabili nel conferire alla molecola la capacità di funzionare da scambiatore dei nucleotidi guanilici, è stato effettuato un allineamento multiplo tra le sequenze delle regioni catalitiche di 12 GEF provenienti da organismi evolutivamente distanti come *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila*, *Mus musculus* e *Homo sapiens*.

Sulla base di tale allineamento è stato scelto il triptofano equivalente alla posizione 1054 di CDC25^{Mm}, unico Trp conservato in tutti i domini catalitici degli scambiatori con attività specifica su ras. Questo residuo è stato sostituito nel dominio catalitico di CDC25^{Mm} con amminoacidi aventi differenti caratteristiche chimico-fisiche: alanina (A), acido glutammico (E), fenilalanina (F), leucina (L) e lisina (K).

Nella valutazione degli effetti della mutazione nelle diverse prove sia in vitro che in vivo, sono stati utilizzati proteine GEF intere e i loro frammenti corrispondenti ai domini catalitici che nella maggior parte dei casi sono situati nella regione C-terminale, mentre in altri (es. nelle proteine sos) in quella centrale (Fig. 2).

I mutanti sono stati ottenuti con i metodi convenzionali, operando una mutagenesi sito-diretta seguita da costruzione di plasmidi per l'espressione di GEF mutanti in E. coli, nel lievito *Saccharomyces cerevisiae* e in cellule di mammifero.

L'attività biologica dei differenti mutanti di $CDC25^{Mm}$ è stata saggiata utilizzando i costrutti ottenuti in esperimenti di complementazione del fenotipo di crescita termosensibile del ceppo TC7 di *S. cerevisiae* (fenotipo rilevante $cdc25-1^{ts}$), il quale è in grado di crescere alla temperatura permissiva di 24°C ma non alla temperatura restrittiva di 37°C. Le trasformazioni del ceppo di *S. cerevisiae* TC7, genotipo MATa ade lys trp ura3 $cdc25-1^{ts}$ (Martegani et al. (1986) supra) sono state condotte utilizzando il metodo di Ito (Ito et al. (1983) J. Bacteriol. 153, 163-168).

Dall'analisi di complementazione in lievito risulta che solo la sostituzione conservativa W1054F è capace di ripristinare, seppure in modo meno efficiente rispetto al "wild type", la funzionalità del ceppo $cdc25-1^{ts}$, mentre tutti gli altri mutanti, introducendo probabilmente modificazioni incompatibili con la funzionalità della molecola, non complementano.

Una ulteriore verifica della funzionalità dei mutanti è stata

condotta in cellule di mammifero mediante saggi di attività fos-luciferasica, in cui cellule di mammifero sono state cotransfettate con un plasmide esprimente il GEF mutante e un plasmide reporter fos-luciferasi la cui espressione è funzione della attività di ras, poichè è noto che l'attivazione di ras risulta nell'induzione della trascrizione del gene fos cellulare.

Lo stato di attivazione di ras, e di conseguenza l'attività dello scambiatore, viene pertanto determinato indirettamente dosando l'attività dell'enzima luciferasi che si accumula in seguito all'attività del gene della luciferasi posto sotto il controllo del promotore di fos. L'overespressione del dominio catalitico di CDC25^{Mm} risulta in un significativo innalzamento dell'attività fos-luciferasica in un sistema modello in cui fibroblasti di criceto (CHO) o topo (NIH3T3) sono cotransfettati con plasmidi esprimenti CDC25^{Mm}₉₇₄₋₁₂₆₀ e un plasmide "reporter" pfos-luciferasi in cui il gene della luciferasi sia sotto il controllo di un frammento del promotore umano di fos (da -711 a +42) (Zippel R. et al. (1994) International J. Oncology 4, 175-179).

Al contrario, in tutti i mutanti testati la via di trasduzione del segnale a valle di ras, inibendo l'attivazione del promotore di fos, è ridotta rispetto a quella provocata dalla proteina "wild type", (Fig. 5).

L'efficacia dei mutanti oggetto dell'invenzione nell'inibire l'attività di ras è dovuta al legame irreversibile GEF-ras, come dimostrato da prove di scambio in cui si è visto che le proteine mutate possono competere in vitro con lo scambiatore "wild-type" annullandone

l'effetto di induzione dello scambio dei nucleotidi guanilici in ras.

In altre parole, dette proteine mutate esercitano un'azione di "sequestro" delle ras in uno stato inattivo, potendole legare in maniera non funzionale, tale cioè da bloccare a valle la via di trasduzione del segnale. Sulla base degli esperimenti di competizione, si può ipotizzare che la mutazione a carico delle proteine GEF consente di stabilizzare la proteina p21^{ras} nella sua forma vuota, senza nucleotide, cioè le GEF mutate causano la dissociazione del complesso Ras-GDP senza promuovere lo scambio con GTP.

L'effetto di "sequestro" è stato dimostrato in vivo, in cellule NIH3T3, in cui si è visto che la stimolazione con PDGF (Fattore di crescita derivato da piastrine), che normalmente produce effetti attraverso una via CDC25^{Mm}-indipendente, viene inibita dalla trasfezione nelle stesse cellule del mutante CDC25^{Mm} W1054E che, appunto, rende ras non disponibile alla trasduzione, qualunque sia la via coinvolta.

Inoltre, in ulteriori esperimenti su colture cellulari, si è visto chiaramente che CDC25^{Mm}W1054E è in grado di inibire completamente la trasformazione di fibroblasti conseguente all'espressione di ras oncogenico (K-ras) (Fig. 10).

La possibilità di bloccare l'attività di ras trova diverse applicazioni nel trattamento di patologie dovute ad uno stato di iperattivazione di ras.

Infatti, tutte le versioni oncogeniche delle p21^{ras} presentano mutazioni puntiformi in amminoacidi importanti per il legame con il nucleotide guanilico che bloccano Ras nello stato attivato (Ras-GTP) o

ne facilitano la formazione (Lowry D.R. e Willumsen B.M. (1993 Ann. Rev. Biochem. 62:851-891).

In un particolare tipo di cellula una mutazione di ras può predisporre ad un particolare tipo di tumore: per esempio in una cellula dell'epitelio polmonare può predisporre ad un adenocarcinoma.

Dati di letteratura hanno recentemente indicato l'applicabilità di molecole antagoniste di Ras in situazioni patologiche distinte da quelle tumorali. In particolare, è stato dimostrato come la proliferazione di VSMC (cellule muscolari lisce) indotta da PDGF, FGF o trombina sia associata con l'induzione di ras e che VSMC transfettate con un mutante dominante negativo di ras abbiano una riduzione significativa della proliferazione indotta dagli stessi fattori di crescita (Irani et al. (1994) Biochem: Biophys. Res. Commun. 202:1252). Lo stesso mutante di ras è stato testato successivamente in vivo nel modello di angioplastica nel ratto e una inibizione significativa (60%) della formazione di neointima è stata ottenuta 14 giorni dopo l'intervento (Indolfi et al. Nature Medicine (1995) 1:541-545). In aggiunta, studi molto recenti hanno mostrato come citochine chemiotattiche inducano direttamente ras (Knall et al. (1996) J. Biol. Chem. 271:2832) e molecole legate all'attività intracellulare di ras (Bokoch (1995) Blood 86:1649) facendo estendere il raggio d'azione farmacologico di antagonisti specifici di ras anche verso effetti biologici non esclusivamente legati alla proliferazione, quali la motilità cellulare.

Pertanto, i mutanti GEF dominanti negativi dell'invenzione possono essere opportunamente impiegati, oltre che in campo oncologico, anche

nelle malattie cardiovascolari, quali la restenosi arteriosa in seguito a terapia angioplastica, o nel trattamento di stati infiammatori.

Sulla base di quanto detto sopra, un primo oggetto dell'invenzione si riferisce ad una sequenza amminoacidica di un fattore di scambio dei nucleotidi guanilici (GEF) comprendente un tratto di dominio catalitico in cui il triptofano (W), corrispondente alla posizione 1054 della proteina di classe GEF denominata CDC25^{Mm}, è mutato in un amminoacido acido.

Tra gli amminoacidi adatti per la mutazione, è preferito l'acido glutammico.

Detta sequenza potrà essere estesa alla proteina intera, al suo dominio catalitico o più in generale a qualsiasi parte della molecola, con la condizione che sia compreso un numero di amminoacidi a valle o a monte rispetto al Trp mutato, per un minimo di 3 a.a. prima e 3 dopo il sito mutato, e comunque tale che il peptide/proteina derivante sia in grado di legare proteine della famiglia ras in competizione con le proteine GEF native.

La sequenza amminoacidica appena descritta potrà essere incorporata in una proteina di fusione o combinata in modo da ottenere proteine chimeriche dotate delle caratteristiche farmacologiche desiderate. Inoltre i peptidi potranno essere modificati chimicamente allo scopo di aumentare la stabilità in vivo.

Un altro oggetto dell'invenzione si riferisce alla sequenza genica codificante per il peptide o la proteina definiti sopra, in cui il codone corrispondente al Trp del dominio catalitico equivalente alla

posizione 1054 di CDC25^{Mm} è sostituito da un codone per un aminoacido acido, preferibilmente per l'acido glutammico; sono inoltre compresi i plasmidi contenenti dette sequenze di acidi nucleici.

I mutanti dell'invenzione o loro derivati, possono essere utilizzati, come detto, nella terapia di forme tumorali, per lo più legate a mutazioni attivanti di ras, di malattie cardiovascolari, come la restenosi arteriosa, o di stati infiammatori.

Per questi scopi i peptidi, le proteine, gli acidi nucleici o i loro derivati saranno somministrati opportunamente formulati in composizioni farmaceutiche secondo quanto descritto ad esempio in "Remington's Pharmaceutical Sciences Handbook", Mack Publishing Company, New York, U.S.A.

In alternativa, potranno essere somministrati localmente i plasmidi oppure, laddove necessario, si potrà ricorrere ad una terapia genica, per esempio con vettori retrovirali opportunamente modificati, recanti le sequenze geniche descritte in precedenza.

Le composizioni secondo l'invenzione conterranno una quantità efficace di mutanti, variabili in funzione della via di somministrazione, della patologia da trattare, delle condizioni generali del paziente, e saranno somministrate preferibilmente per via parenterale, in particolare per via sottocutanea o intramuscolare.

Ovviamente, anche il dosaggio giornaliero dipenderà da più fattori, quali gravità della patologia, peso, sesso ed età del paziente.

Sono anche possibili altre vie di somministrazione, ad esempio quella orale, ricorrendo alla formulazione dei polipeptidi in liposomi o

altre tecniche note per la somministrazione di polipeptidi o proteine per via gastroenterica, quali quelle descritte in WO93/25583.

I mutanti dell'invenzione sono anche utili per applicazioni diagnostiche o di ricerca.

Breve descrizione delle figure:

La figura 1 mostra uno schema del ciclo di ras.

La figura 2 mostra uno schema dei fattori di scambio ras-specifici della famiglia Sos e CDC25-like.

La figura 3 mostra la sequenza di DNA e aminoacidica del dominio catalitico di CDC25^{Mm}.

La figura 4 mostra le omologie di sequenza tra vari GEF ras-specifici.

CDC25 = CDC25 di *S. Cerevisiae*; SDC25 = SDC25 di *S. Cerevisiae*;

CaCDC25 = CDC25 di *Candida*; ste6 = ste6 da *Schizosaccharomyces pombe*;

SkCDC25 = CDC25 da *S. kluyverii*; CDC25^{Mm} = CDC25^{Mm} da *Mus musculus*;

RatGRF, CDC25 da ratto; hgrf55 = CDC25 da *Homo sapiens*; DmeSos = Sos da

Drosophila melanogaster; hSos1 = Sos da *Homo sapiens*, isoforma 1;

mSos1 = Sos da *Mus musculus*, isoforma 1; mSos2 = Sos da *Mus musculus*,

isoforma 2.

La figura 5 mostra un saggio di attivazione di un gene "reporter" ras dipendente in fibroblasti di mammifero.

La figura 6 mostra un esempio di purificazione del mutante GEF CDC25^{Mm}₉₇₄₋₁₂₆₀W1054.

La figura 7 mostra un saggio standard di scambio (a e c) e di dissociazione (b e d) condotto in vitro sulla proteina RAS2 di *S. Cerevisiae* (a e c) e p21 ras umana (b e d) come descritto nell'esempio

5. Solo il dominio catalitico di CDC25^{Mm} "wild type" è in grado di stimolare significativamente la dissociazione del nucleotide legato a ras e promuovere lo scambio con il nucleotide aggiunto dall'esterno. In tutti gli esperimenti riportati in Figura la concentrazione della proteina Ras (di lievito o umana) è 500 nM, mentre la concentrazione del dominio catalitico di CDC25^{Mm} è 40 nM. I simboli sono riportati nella figura.

La figura 8 mostra che CDC25^{Mm}_{WE} è in grado di dissociare il nucleotide legato a ras in modo non catalitico, cioè solo quando presente in concentrazione equimolecolare rispetto alla proteina p21 ras (pannello A) e RAS2 (pannello B). L'aggiunta di CDC25^{Mm}₁₋₁₂₆₀_{WE} a campioni in cui sta avendo luogo la reazione di scambio catalizzata da CDC25^{Mm}₁₋₁₂₆₀ "wild type", rimuove completamente il nucleotide (pannello D, cerchi chiusi). L'aggiunta di CDC25^{Mm}₁₋₁₂₆₀ "wild type" in eccesso compete efficacemente con CDC25^{Mm}₁₋₁₂₆₀_{WA} (pannello C, asterischi), ma non ha effetto su CDC25^{Mm}₁₋₁₂₆₀_{WE}, indicando che il legame di detto mutante a ras è sostanzialmente irreversibile.

La figura 9 mostra l'inibizione della attività di un gene reporter ras-dipendente (fos-luciferasi) da parte del mutante CDC25^{Mm}₁₋₁₂₆₀_{WE}. I dati sono la media + deviazione standard di tre esperimenti condotti su cellule stimulate con PDGF per 16 ore prima del dosaggio. La attività fos-luciferasica delle cellule trasfettate col mutante CDC25^{Mm}₁₋₁₂₆₀_{WE}, ma non col mutante CDC25^{Mm}₁₋₁₂₆₀_{WA}, è inferiore in modo statisticamente significativo a quelle delle cellule trasfettate col plasmide vuoto pCDNA3.

La figura 10 mostra la morfologia di cellule 226.4.1 (focus di trasformazione di cellule NIH3T3 trasfettate col gene k-ras). Il pannello A rappresenta cellule 226.4.1 cotrasfettate col plasmide di controllo pCDNA3; il pannello B rappresenta cellule trasfettate col mutante CDC25^{Mm}₁₋₁₂₆₀^{WE}; il pannello C rappresenta cellule 226.4.1; il pannello D rappresenta cellule NIH3T3 non trasfettate utilizzate come controllo.

I seguenti esempi servono a chiarire l'invenzione.

Esempio 1

Costruzione di GEF mutanti per mutagenesi sito-diretta

Per tutte le manipolazioni standard del DNA ricombinante, furono usate procedure convenzionali, a meno che non diversamente indicato. Una raccolta completa di tali procedure è riportata per esempio in Sambrook et al., (1989) Molecular Cloning.

La mutagenesi sito-diretta guidata da oligonucleotidi consiste nell'ibridare in vitro un DNA a singola elica con un oligonucleotide sintetico che è complementare al DNA a singola elica eccetto per una regione centrale di "mismatch". Per effettuare la mutagenesi del codone Trp1054, la regione 3' terminale di CDC25^{Mm} di 1238 bp, che presente una elevata omologia con le proteine della stessa famiglia, è stata clonata in un vettore d'espressione denominato pALTER^(R)-1 (PROMEGA), plasmide che possiede una origine per la replicazione del DNA di batteriofagi come M13 e R408 e due geni per l'antibiotico resistenza. Uno di questi geni, quello per la tetraciclina resistenza, è sempre funzionante. L'altro, per l'ampicillina resistenza, è invece inattivo. In seguito ad

infezione con R408 di una coltura di E. coli precedentemente trasformata con il costruito sopra citato, è possibile ottenere particelle fagiche contenente DNA plasmidico a singola elica (ssDNA). La mutagenesi si basa sull'utilizzo di due oligonucleotidi. Uno in grado di ripristinare la resistenza all'ampicillina, l'altro appositamente progettato con uno o più "mismatches" necessari per determinare la sostituzione amminoacidica desiderata nel prodotto genico d'interesse. Dopo sintesi in vitro della seconda elica di DNA, viene trasformata una coltura di un ceppo di E. coli mutata nel meccanismo di riparo del DNA (BMH 71-18 mutS) al fine di poter mantenere in vivo i "mismatches" introdotti con gli oligonucleotidi sintetici. Un secondo ciclo di trasformazione in JM109 assicura una corretta segregazione di plasmidi mutanti e "wild type" determinando una elevata proporzione di plasmidi con il costruito mutato.

Ulteriori dettagli possono essere trovati nel libretto di accompagnamento del kit. Ogni altro metodo convenzionale può essere scelto per effettuare la mutagenesi.

I geni mutagenizzati furono completamente sequenziati con il metodo dideossi di terminazione di catena così ottenendo i plasmidi pALTER-CDC25^{Mm}₉₇₄₋₁₂₆₀W1054E, pALTER-CDC25^{Mm}₉₇₄₋₁₂₆₀W1054A, pALTER-CDC25^{Mm}₉₇₄₋₁₂₆₀W1054L, pALTER-CDC25^{Mm}₉₇₄₋₁₂₆₀W1054F, pALTER-CDC25^{Mm}₉₇₄₋₁₂₆₀W1054K.

Esempio 2

Costruzione di plasmidi per l'espressione di GEF mutanti in E. coli, nel lievito *Saccharomyces cerevisiae* e in cellule di mammifero

Gli inserti codificanti per CDC25^{Mm}₉₇₄₋₁₂₆₀ da ognuno dei plasmidi

derivati da pALTER o un appropriato frammento vennero subclonati negli appropriati plasmidi di espressione come descritto sotto.

Per costruire plasmidi per l'espressione del dominio catalitico (residui 974-1260) di CDC25^{Mm} in lievito e in cellule di mammifero, il frammento XbaI-XbaI di 1,3 kbp da ogni plasmide della serie pALTER venne exciso da detti plasmidi, le estremità rese piatte mediante trattamento con il frammento di Klenow della DNA polimerasi di E. coli. Il plasmide pCYM-1 (Camonis H.J. et al. (1990) Gene 86, 263-268) è un vettore navetta in cui l'espressione del gene inserito viene controllata dal promotore di SV40, attivo tanto nel lievito *S. cerevisiae* che in cellule di eucarioti superiori. Il plasmide pCYM-1 venne linearizzato con l'enzima di restrizione BamHI; le estremità originate vennero rese piatte mediante trattamento con il frammento di Klenow della DNA polimerasi I di E. coli e successivamente defosforilate con fosfatasi alcalina. I frammenti CDC25^{Mm} wild type e mutanti ed il plasmide pCYM-1 linearizzato e defosforilato vennero ligati secondo procedure standard. L'inserzione di ogni frammento nell'orientamento corretto venne controllata mediante analisi di restrizione e sequenziamento. Vennero in tal modo ottenuti i plasmidi: pCYM-CDC25^{Mm}₉₇₄₋₁₂₆₀; pCYM-CDC25^{Mm}₉₇₄₋₁₂₆₀^{W1054E}; pCYM-CDC25^{Mm}₉₇₄₋₁₂₆₀^{W1054A}; pCYM-CDC25^{Mm}₉₇₄₋₁₂₆₀^{W1054L}; pCYM-CDC25^{Mm}₉₇₄₋₁₂₆₀^{W1054F}; pCYM-CDC25^{Mm}₉₇₄₋₁₂₆₀^{W1054K}.

Punto di partenza per la costruzione di plasmidi esprimenti in E. coli proteine ibride tra la glutatione-S-trasferasi (GST) e CDC25^{Mm}₉₇₄₋₁₂₆₀ fu il plasmide pGEX2T-CDC25^{Mm}₉₇₄₋₁₂₆₀ (Martegani E. et al. (1992) supra). Tale plasmide esprime sotto il controllo di un promotore IPTG-

inducibile, proteine di fusione tra la GST ed il dominio catalitico di CDC25^{Mm} (residui 974-1260). Il plasmide pGEX2T-CDC25^{Mm}₉₇₄₋₁₂₆₀ venne tagliato con SphI ed HindIII, digestione che rilascia un frammento di circa 440 bp che comprende il codone Trp1054. Il plasmide venne defosforilato con fosfatasi alcalina e purificato mediante agarosio gel elettroforesi preparativa. Il frammento SphI-HindIII contenente il codone 1054 mutato venne exciso da ogni plasmide basato su pALTER descritto nel paragrafo precedente e subclonato in detto plasmide pGEX2T-CDC25^{Mm}₉₇₄₋₁₂₆₀ tagliato con SphI ed HindIII, defosforilato e purificato mediante gel elettroforesi preparativa. L'inserzione di ogni frammento nell'orientamento corretto venne controllata mediante analisi di restrizione e sequenziamento. Vennero così ottenuti i plasmidi pGEX2T-CDC25^{Mm}₉₇₄₋₁₂₆₀^{W1054E}; pGEX2T-CDC25^{Mm}₉₇₄₋₁₂₆₀^{W1054A}; pGEX2T-CDC25^{Mm}₉₇₄₋₁₂₆₀^{W1054L}; pGEX2T-CDC25^{Mm}₉₇₄₋₁₂₆₀^{W1054F}; pGEX2T-CDC25^{Mm}₉₇₄₋₁₂₆₀^{W1054K}.

Il frammento NsiI-DraIII contenente il codone 1054 mutato ottenuto digerendo l'opportuno plasmide pALTERCDC25^{Mm} venne purificato mediante agarosio gel elettroforesi preparativa e subclonato nel plasmide pGEM3ESCDC25^{Mm} (contenente i codoni 812-1260 di CDC25^{Mm}) digerito con gli stessi enzimi di restrizione, sostituendo così il frammento wild type con quello mutato. Il gene CDC25^{Mm} completo wild type o mutante venne ricostruito subclonando nell'opportuno plasmide pGEM3ESCDC25^{Mm} tagliato con BamHI e SacI il frammento BamHI-SacI contenente i codoni 1-811 di CDC25^{Mm} purificato per agarosio gel elettroforesi. Nei costrutti così ottenuti il gene CDC25^{Mm} wild type o mutato, è fiancheggiato da

siti XbaI. Il frammento XbaI contenente l'intero gene CDC25^{Mm} mutato venne purificato mediante agarosio gel elettroforesi preparativa e clonato nel sito XbaI presente sul polylinker del plasmide pCDNA3 (Invitrogen). Vennero così ottenuti i plasmidi pCDNA-3-CDC25^{Mm}₁₋₁₂₆₀; pCDNA-3-CDC25^{Mm}₁₋₁₂₆₀^{W1054E}; pCDNA-3-CDC25^{Mm}₁₋₁₂₆₀^{W1054A}. In tali plasmidi l'espressione di CDC25^{Mm} è controllata dal promotore CMV (Citomegalovirus).

Esempio 3

GEF mutanti: saggio di complementazione in mutanti cdc25 di S. cerevisiae

Le cellule trasformate sono state piastrate su terreno minimo selettivo, con glucosio come fonte di carbonio. Le piastre dei trasformanti, dopo un'incubazione di 36 ore a 24°C (temperatura permissiva) sono state trasferite alla temperatura restrittiva (37°C). In tali condizioni il ceppo mutante non cresce, mentre il mutante trasformato con CDC25^{Mm} wild type dà colonie visibili dopo 48-72 ore dal trasferimento alla temperatura non permissiva.

Le beute utilizzate per la crescita di lievito in terreno liquido vengono incubate in un bagno termostato Dubnoff e mantenute in agitazione. La crescita su piastra viene effettuata in appositi incubatori ad atmosfera umida. Per le metodiche riguardanti il lievito, ove i metodi non siano esplicitamente descritti, si rimanda a (Guthrie C. e Fink G.R. Methods in Enzymology 194).

Si è quindi osservato la capacità di ciascun mutante di complementare, alla temperatura restrittiva di 37°C, la mutazione cdc25-

1^{ts}. I risultati riportati in Tabella 1 corrispondono al rapporto tra il numero di colonie cresciute a 37°C e quello delle colonie cresciute a 24°C. Sono riportate la media \pm standard deviazione standard ottenute da almeno tre esperimenti indipendenti.

Tabella 1: Saggio di complementazione funzionale della mutazione cdc25 di *S. cerevisiae* da parte dei GEF mutanti

Proteina	Rapporto colonie (37°C/24°C)
pCYM-1	0.00 \pm 0.00
CDC25 ^{Mm} ₉₇₄₋₁₂₆₀ Wild type	0.87 \pm 0.20
CDC25 ^{Mm} ₉₇₄₋₁₂₆₀ W1054A	0.00 \pm 0.00
CDC25 ^{Mm} ₉₇₄₋₁₂₆₀ W1054E	0.00 \pm 0.00
CDC25 ^{Mm} ₉₇₄₋₁₂₆₀ W1054F	0.76 \pm 0.13
CDC25 ^{Mm} ₉₇₄₋₁₂₆₀ W1054L	0.00 \pm 0.00
CDC25 ^{Mm} ₉₇₄₋₁₂₆₀ W1054K	0.02 \pm 0.00

Esempio 4

GEF mutanti: saggio di attività fos-luciferasica in fibroblasti di criceto CHO

L'attività della luciferasi venne dosata utilizzando il kit "Luciferase Assay System^(R)" della PROMEGA misurando con un luminometro l'emissione di luce, in condizioni in cui la luce emessa in un dato intervallo di tempo sia una funzione lineare della quantità di estratto aggiunto.

Il DNA utilizzato per le trasfezioni è stato purificato mediante "Plasmid Maxi Kit^(R)" della QIAGEN. Le cellule CHO sono state transfettate, mediante la tecnica del calcio fosfato, con quantità costanti di DNA (3 μ g di pCYM-1 contenente la regione catalitica di CDC25^{Mm} wild type o mutata) e lasciate per 40 ore in assenza di siero e

in presenza di transferrina e selenio. Questi fattori sono indispensabili, in assenza di siero, per garantire una buona adesione cellulare. L'attività luciferasica di aliquote (10 µl) degli estratti cellulari è stata misurata al luminometro e i valori di Relative Light Units (RLU) così ottenuti sono stati normalizzati per il contenuto proteico di ciascun campione. I dati sono poi stati espressi come attività luciferasica relativa al valore raggiunto dal wild type e considerato unitario, come rappresentato nel grafico in Fig. 5.

Procedura tecnica calcio fosfato

Inoculare le cellule in piastre da 55 o 21 cm² ad una densità di 17000 cell/cm² in D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium più glutammina 4 mM, penicillina e streptomina 100 U/ml) e 10% siero (FCS: Fetal Calf Serum per CHO o NBS: Newborn Calf Serum per NIH3T3) o comunque a una densità tale per cui il giorno successivo abbiano raggiunto il 70-90% di confluenza. Il giorno seguente è anche necessario cambiare il terreno almeno un'ora prima della trasfezione.

1. Preparare la miscela di trasfezione aggiungendo nell'ordine:

H ₂ O sterile	480 ml
HBS 2x pH 6,95	500 ml
DNA plasmidico	fino a 10 mg

CaCl₂ 0,122 M, Hepes 0,61 mM (da soluzione CaCl₂2M Hepes 10 mM)

Per le piastre da 21 cm² tutte le quantità dei vari componenti vengono dimezzate.

2. Incubare la miscela di trasfezione 30 min a temperatura ambiente.

3. Aggiungere 1 ml/piastra della miscela dopo averla agitata su vortex

e incubare per 6 ore a 37°C.

4. Aspirare il terreno e aggiungere TBS 1x più 15% glicerolo per 90 secondi in modo da aumentare l'efficienza di trasfezione.

5. Lavare 2 volte con TBS 1x e aggiungere terreno senza siero (starvation) costituito da D-MEM Na-selenite 4 mg/ml e transferrina 10^{-8} M.

6. Stimolare eventualmente con PDGF 100 ng/ml per 16 ore.

7. Estrazione cellule come da protocollo PROMEGA utilizzando un tampone di lisi la cui composizione è sotto riportata.

Tamponi utilizzati

A. Tampone HBS: stock 20x

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	21 mM
Destrosio	120 mM
NaCl	2,7 M
KCl	100 mM
Hepes	400 mM

NBS 2x (pH 6,95) viene preparato diluendo lo stock 20x.

B. CaCl_2 -Hepes:

CaCl_2	2 mM	
Hepes	10 mM	pH 5,5

C. Tampone TBS: stock 20x:

TRIS	500 Mm	
NaCl	2,74 M	
KCl	10 mM	
CaCl	14 mM	
$\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10 mM	pH 7,4

Autoclavare e conservare a 4°C.

D. Tampone TBS 1x 500 ml:

H ₂ O sterile	475 ml
TBS 20x	25 ml
Na ₂ HPO ₄ 0,6 mM	(da soluzione Na ₂ HPO ₄ 0,5 M)

E. Tampone di lisi (PROMEGA):

TRIS-H ₃ PO ₄	24 mM
CDTA	2 mM
DTT	2 mM
Glicerolo	10%
Triton X100	1%

Esempio 5**Espressione in E. coli e purificazione di GEF mutanti**

La purificazione venne effettuata a 4°C. La purificazione delle proteine fuse GST-CDC25^{Mm}₉₇₄₋₁₂₆₀ è una cromatografia per affinità che prevede l'utilizzo della resina Glutathione-sefariosio (SIGMA).

Il protocollo utilizzato è molto simile sia per la purificazione di CDC25^{Mm} wild type e mutanti, che per la purificazione di p21^{ras} e RAS2, tutte in fusione con la GST. In quest'ultimo caso si aggiungono a tutti i tamponi 1 mM MgCl₂ e 10 µM GDP. I passaggi principali sono schematizzabili come segue:

1. Inoculare in LB più ampicillina (100 µg/ml) il ceppo batterico trasformato con il plasmide d'interesse. Lasciare in incubazione a 37°C per tutta la notte.
2. Il giorno seguente 8 ml di preinoculo vengono incubati in agitazione a 37°C in 500 ml di LB più ampicillina fino a quando la densità della coltura batterica a 600 nm è 0,4-0,6 O.D.
3. Indurre la produzione della proteina con IPTG 0,2 mM (Isopropyl B-D

Thiogalactopyranoside) per 16 ore a 24°C (4 ore 28°C per le proteine Ras) fino a quando la densità della coltura è 1,5-1,9 O.D.

4. Raccogliere le cellule per centrifugazione a 8000 rpm per 5 minuti a 4°C.
5. Risospendere il pellet cellulare in 8 ml di tampone di lisi costituito da: PBS 1X (150 mM NaCl, 16 mM Na₂HPO₄, 4 mM NaH₂PO₄ pH 7,3), 14 mM β-mercaptoetanololo (7 mM per le proteine Ras), 1 mM EDTA 0,5 mM PMSF, 0,5% Triton.
6. Rompere le cellule a 4°C mediante French Press. Si ha in questo modo una rottura totale delle cellule.
7. Aggiungere 0,5% PMSF, 1% Triton e 50 U di DNasi.
8. Centrifugare per 20 minuti a 15000 rpm a 4°C.
9. Recuperare il surnatante ed incubarlo con la resina al 50% (precedentemente idratata con acqua distillata per almeno 1 ora e lavata tre volte con PBS 1X) per 50 minuti a 4°C in leggera agitazione.
10. Centrifugare a 4°C per 2 minuti a 1500 rpm ed eliminare il surnatante.
11. Lavare la resina due volte con 10 ml PBS, 14 mM β-mercaptoetanololo (7 mM per le proteine Ras), 1 mM EDTA 0,5% Triton (Tampone A pH 8,5) e due volte con 50 mM Tris-HCl pH 8,5, 50 mM NaCl, 14 mM B-Me (oppure 7 mM), 1 mM EDTA, 0,5% Triton.
12. Incubare tre volte la resina con 4 ml di Tampone A pH 8,5 per 15 minuti a 4°C in presenza di 3 mg/ml di glutatione ridotto.
13. Dializzare in 500 ml di tampone 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM NaCl,

14 mM B-Me, 50% glicerolo per concentrare di circa tre volte la proteina.

14. Controllare su gel di poliacrilammide al 10% i diversi passaggi della purificazione.

Le proteine ras e, quando richiesto, CDC25^{Mm}₉₇₄₋₁₂₆₀ wild type e mutanti vennero tagliati dalla GST mediante taglio con trombina come segue.

Dopo l'ultimo lavaggio prima dell'eluizione si risospende la resina con il tampone Trombina (Tris-Cl 50 mM pH 7,5, NaCl 50 mM, CaCl₂ 5 mM), si centrifuga la resina e si risospende in un ugual volume di tampone Trombina addizionato di circa 10 U per mg di proteina fusa legata. Si lascia a 4°C per circa 2 ore in leggera agitazione. Si centrifuga la resina e si raccoglie la frazione liquida, contenente la proteina che interessa. Si eseguono altri due lavaggi della resina con PBS e si uniscono le 3 frazioni solubili raccolte, si controlla su gel di poliacrilammide. Si effettua a questo punto un ulteriore passaggio di purificazione con una colonna cromatografica a scambio anionico per eliminare i residui di trombina ed eventuali proteine contaminanti. Si utilizza una colonna Pharmacia MonoQ ed un gradiente 0-1 M di NaCl; la proteina viene eluita a circa 140 mM NaCl. Si controllano con SDS-PAGE le frazioni contenenti la proteina e si riuniscono, se necessario si concentrano con Centriprep 10 (Centricon) e si dializza tutta la notte contro 1 litro di Tris-Cl 50 mM pH 7,5, NaCl 50 mM, glicerolo 50%, GME 7 mM.

La Figura 6 mostra un gel di poliacrilammide in SDS della

purificazione di CDC25^{Mm}974-1260W1054E.

Esempio 6

Saggi in vitro di scambio e di dissociazione dei nucleotidi guanilici di p21^{ras} e RAS2 con i mutanti di GEF

L'utilizzo di nucleotidi marcati consente di determinare la velocità di dissociazione dei complessi Ras•GDP, così come la reazione di scambio GDP/GTP mediante filtrazione su membrane di nitrocellulosa (Millipore, 0,45 µm). Solamente i nucleotidi legati alle proteine Ras vengono ritenuti sulla membrana e la misura della radioattività permette di valutare la quantità di complesso ritenuto sulle membrane. La membrana di nitrocellulosa, imbibite nello stesso tampone utilizzato per le reazioni, sono deposte sopra un apparato di filtrazione HOFFER collegato ad una pompa che permette l'aspirazione mediante una pressione di 0,9 bars. Dopo un periodo di incubazione a 30°C delle aliquote della reazione vengono prelevate e filtrate sulle membrane.

I filtri di nitrocellulosa vengono successivamente asciugati all'aria e quindi introdotti in vials contenenti 5 ml di liquido scintillante (Ultima Gold PACKARD) e contati mediante un contatore Prias (PACKARD).

Reazione di dissociazione

Le cinetiche di dissociazione dei complessi proteine ras-nucleotidi guanilici sono studiate caricando la proteina p21 (o RAS2) con [³H]GDP; la dissociazione dei complessi ottenuti è seguita nel tempo in seguito ad aggiunta di un eccesso di nucleotide non marcato.

La proteina P21^{ras}, o RAS2 (2,5 µM) viene incubata in presenza di

tampone A (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM MgCl₂, 10 mM NH₄Cl, 0,5 mg/ml BSA), di 3 mM EDTA e di 15 μM [³H]GDP.

Dopo 5 minuti la reazione viene bloccata aggiungendo 4 mM MgCl₂ e ponendo la provetta in ghiaccio.

La velocità di dissociazione del complesso marcato viene misurata in seguito ad aggiunta di un eccesso di circa 500 volte di nucleotide freddo.

25 μl della miscela della Reazione 1 vengono incubati a 30°C in tampone A contenente GTP (o GDP) freddo 1,6 mM in presenza o in assenza di concentrazioni diverse di CDC25^{Mm} wild type o mutato. Il volume finale della Reazione 2 è di 120 μl, a tempi stabiliti aliquote di 25 ml vengono prelevate e la diminuzione della radioattività associata alle proteine Ras è seguita, per filtrazione su nitrocellulosa, nel corso del tempo.

Reazione di scambio

La reazione di scambio è effettuata incubando il complesso p21-GDP, o RAS2-GDP (500 nM), in tampone A in presenza di [³H]GTP (6 μM), in presenza, quando richiesto, di differenti concentrazioni di CDC25^{Mm}. Il volume finale è di 120 μl. L'aumento della radioattività associata alle proteine Ras è seguita nel tempo per filtrazione su nitrocellulosa.

La reazione viene incubata a 30°C, prelevando aliquote di 25 μl a tempi diversi e filtrando su nitrocellulosa; l'aumento della radioattività legata alle proteine Ras (ritenuta su filtro) corrisponde allo scambio del GDP freddo con GTP radioattivo.

L'EDTA, ad una concentrazione finale 2 mM, viene utilizzato come

controllo positivo della reazione di scambio, poiché chelando il magnesio, accelera fortemente la reazione di scambio GDP/GTP dando così il valore massimale della radioattività legata alle proteine Ras all'equilibrio. I risultati riportati in figura 7, mostrano che nelle condizioni del saggio nessuno dei mutanti è in grado di stimolare in maniera significativa lo scambio e la dissociazione di nucleotidi guanilici su entrambe $p21^{ras}$ e RAS2.

Esempio 7

Saggi di competizione tra $CDC25^{Mm}_{974-1260}^{WE}$ e $CDC25^{Mm}$ "wild type"

Allo scopo di indagare se i mutanti inattivi sono ancora in grado di legare la $p21^{ras}$, è stato valutato se le proteine mutate potessero competere in vitro con lo scambiatore "wild type" in una tipica reazione di scambio. $CDC25^{Mm}$ "wild type" venne quindi incubato, in presenza di un eccesso molare di 10 volte di scambiatore mutato e di GDP radioattivo, con il complesso $p21^{ras}$ -GDP. Venne poi seguito nel tempo, come per gli esperimenti precedenti, l'aumento di radioattività associato al substrato.

L'aggiunta di un eccesso molare di 10 volte di proteina mutante, $CDC25^{Mm}_{974-1260}^{W1054F}$, $CDC25^{Mm}_{974-1260}^{W1054A}$ e $CDC25^{Mm}_{974-1260}^{W1054L}$, risultò in una reazione di scambio molto simile al controllo privo di scambiatore. Dopo 30 minuti la reazione risultò inibita tra il 30 e il 50%, valore ottenuto considerando 100% la differenza tra la radioattività relativa raggiunta dalla $p21$ incubata con lo scambiatore "wild type" e quella raggiunta in seguito all'attività intrinseca della $p21^{ras}$ (Tabella 2). Questo dato indica che tali proteine mantengono

ancora la capacità di interagire con p21^{ras} e che quindi i motivi del loro mancato funzionamento in vitro e/o in vivo siano da ricercarsi in stadi della reazione di scambio successivi al legame ras/scambiatore.

Particolarmente interessante è il dato ottenuto da CDC25^{Mm}₉₇₄₋₁₂₆₀W1054E. Dopo 30 minuti di reazione la radioattività associata alla p21 risulta essere sensibilmente inferiore a quella determinata dall'attività intrinseca del substrato.

Tabella 2: Valori di inibizione della reazione di scambio su p21^{ras} da parte di GEF mutanti

Mutazione	Inibizione dopo 30'
CDC25 ^{Mm} ₉₇₄₋₁₂₆₀ E1048A	37.3 %
CDC25 ^{Mm} ₉₇₄₋₁₂₆₀ E1048K	45.6 %
CDC25 ^{Mm} ₉₇₄₋₁₂₆₀ S1122V	52.0 %
CDC25 ^{Mm} ₉₇₄₋₁₂₆₀ W1054A	47.2 %
CDC25 ^{Mm} ₉₇₄₋₁₂₆₀ W1054E	124.0 %
CDC25 ^{Mm} ₉₇₄₋₁₂₆₀ W1054F	49.1 %
CDC25 ^{Mm} ₉₇₄₋₁₂₆₀ W1054L	34.1 %

Esempio 8

Induzione della dissociazione non catalitica dei nucleotidi legati a ras, da parte dei mutanti GEF, senza induzione dello scambio nucleotidico.

Sulla base di detti esperimenti di competizione venne ipotizzato che il mutante CDC25^{Mm}₉₇₄₋₁₂₆₀W1054E, stabilizzi la proteina p21^{ras} nella sua forma vuota, senza nucleotide. Tale ipotesi prevede che, quando presente in quantità equimolecolare con Ras-GDP, CDC25^{Mm}₉₇₄₋₁₂₆₀W1054E ha una forte azione di dissociazione sul complesso Ras-GDP ma

è incapace di promuovere lo scambio. Tale ipotesi venne confermata dai dati presentati in Fig. 8.

Tali dati vennero confermati ed estesi dai dati riportati in Fig. 8C e 8D, i quali evidenziano che:

- CDC25^{Mm}₉₇₄₋₁₂₆₀ "wild type" (200 nM o 400 nM) è in grado di spiazzare lo scambiatore mutato CDC25^{Mm}₉₇₄₋₁₂₆₀W1054A (linee con croci e linee con asterischi nella Fig. 8C) ma non con il mutante CDC25^{Mm}₉₇₄₋₁₂₆₀W1054E (linee con croci e linee con asterischi nella Fig. 8D).
- L'aggiunta di CDC25^{Mm}₉₇₄₋₁₂₆₀W1054A al campione della reazione di scambio contenente CDC25^{Mm}₉₇₄₋₁₂₆₀ "wild type" (linea con cerchi chiusi, Fig. 8C), determina una modesta variazione nella reazione di scambio. Invece l'aggiunta dello scambiatore mutato W1054E (linea con cerchi chiusi, Fig. 8D) provoca l'abbattimento, stabile nel tempo, della radioattività incorporata dal substrato per azione di CDC25^{Mm} "wild type" a valori paragonabili a quelli raggiunti dallo scambiatore mutato da solo. Si è scelto di comparare gli effetti di W1054E e W1054A in quanto questi, pur mappando nella stessa posizione differiscono per la sostituzione amminoacidica introdotta ma soprattutto differiscono nella capacità di competere in vitro per il substrato.

Esempio 9

Inibizione dell'espressione di geni ras dipendenti da parte di mutanti

GEF in fibroblasti di mammiferi

Allo scopo di evidenziare in vivo se la proteina CDC25^{Mm}W1054E,

fosse in grado di esercitare un effetto inibitorio sull'attività di ras in vivo, cellule NIH3T3 sono state transfettate con plasmidi esprimenti la forma intera - più stabile - di CDC25^{Mm}W1054E e CDC25^{Mm}W1054A e stimulate con PDGF, 16 ore prima del dosaggio dell'attività luciferasica. La stimolazione con PDGF permette di attivare Ras in modo CDC25^{Mm}-indipendente e di ottenere quindi elevati valori di attività luciferasica, caratteristica indispensabile per poter dimostrare mediante trasfezioni transienti la presenza di un dominante negativo (Sakaue M. et al. (1995) Mol. Cell. Biol. 15, 379-388; Zippel et al. (1996) supra).

In tali condizioni nelle cellule transfettate con la proteina CDC25^{Mm}W1054E il promotore di fos è attivato a livelli significativamente inferiori rispetto a cellule transfettate col vettore vuoto, mentre i valori raggiunti dalle cellule transfettate con CDC25^{Mm}W1054A non sono statisticamente differenti da quelli del plasmide vuoto. Tali risultati indicano quindi che la proteina CDC25^{Mm}W1054E è in grado di attenuare la via di trasduzione del segnale che passa da p21ras.

Esempio 10

Saggio di attività biologica: il mutante GEF CDC25^{Mm}W1054E inibisce la trasformazione mediata da Ras di fibroblasti di mammifero.

Allo scopo di valutare gli effetti biologici dell'espressione del mutante CDC25^{Mm}W1054E in cellule di mammifero, il plasmide contenente il cDNA del mutante è stato stabilmente transfettato in fibroblasti murini NIH/3T3 trasformati con ras oncogenico ed è stata effettuata un'analisi

morfologica delle cellule trasfettate. Infatti, uno degli effetti più evidenti dell'attivazione dell'oncogene ras consiste proprio nella trasformazione cellulare caratterizzata da alterazioni morfologiche, pertanto una eventuale inibizione di Ras risulta evidenziabile come regressione del fenotipo trasformato.

Le cellule utilizzate per questo scopo erano state precedentemente trasformate mediante inserzione di DNA genomico umano contenente k-ras e selezionate in base alla capacità di formare foci. Uno di questi foci (chiamato 226.4.1) è stato isolato, espanso e coltivato indefinitamente. La morfologia di tale focus, mantenuta inalterata nel tempo, risultava pertanto quella tipica di cellule trasformate: infatti, rispetto ai fibroblasti NIH/3T3 parentali, le cellule 226.4.1 avevano un corpo cellulare più tondeggiante con prolungamenti ben visibili, erano meno adese al substrato e presentavano, in seguito alla perdita di inibizione da contatto, una crescita non organizzata e sovrapposta. Le 226.4.1 sono state quindi trasfettate con il metodo del calcio fosfato (illustrato nel dettaglio nell'esempio 5) impiegando i seguenti costrutti:

- 1) pCDNA3 vuoto di controllo,
- 2) pCDNA3 contenente l'inserito di CDC25^{Mm}W1054E nella sua forma intera.

In seguito alla trasfezione sono state selezionate le colonie resistenti alla geneticina (il plasmide pCDNA3 contiene il gene per la resistenza a tale antibiotico) e isolate dopo circa 15 giorni di selezione. Sono state ottenute 7 colonie di controllo e 8 colonie trasfettate con il mutante. Ogni singola colonia è stata espansa e analizzata al microscopio ottico e la tabella 3 riassume le

caratteristiche morfologiche relative alle colonie ottenute. Mentre tutte le colonie di controllo, 7 su 7, presentavano la tipica morfologia di cellule trasformate, 7 delle 8 colonie trasfettate con il mutante di GEF presentavano una reversione più o meno accentuata del fenotipo trasformato.

Questi risultati sono maggiormente evidenti nella Figura 10 dove sono riportate le fotografie al microscopio ottico di una colonia rappresentativa di quelle di controllo (A), la cui morfologia è riconducibile a quella delle cellule parentali 226.4.1 (C) e di una colonia rappresentativa di quelle trasfettate con il mutante di GEF (B) in cui le caratteristiche morfologiche tipiche delle cellule trasformate sono completamente annullate, tali da rendere queste cellule identiche alle NIH/3T3 non trasformate (D).

In conclusione questi risultati indicano che la trasfezione del mutante CDC25^{Mm}W1054E è in grado di inibire la trasformazione mediata dell'attivazione di Ras in fibroblasti di mammifero.

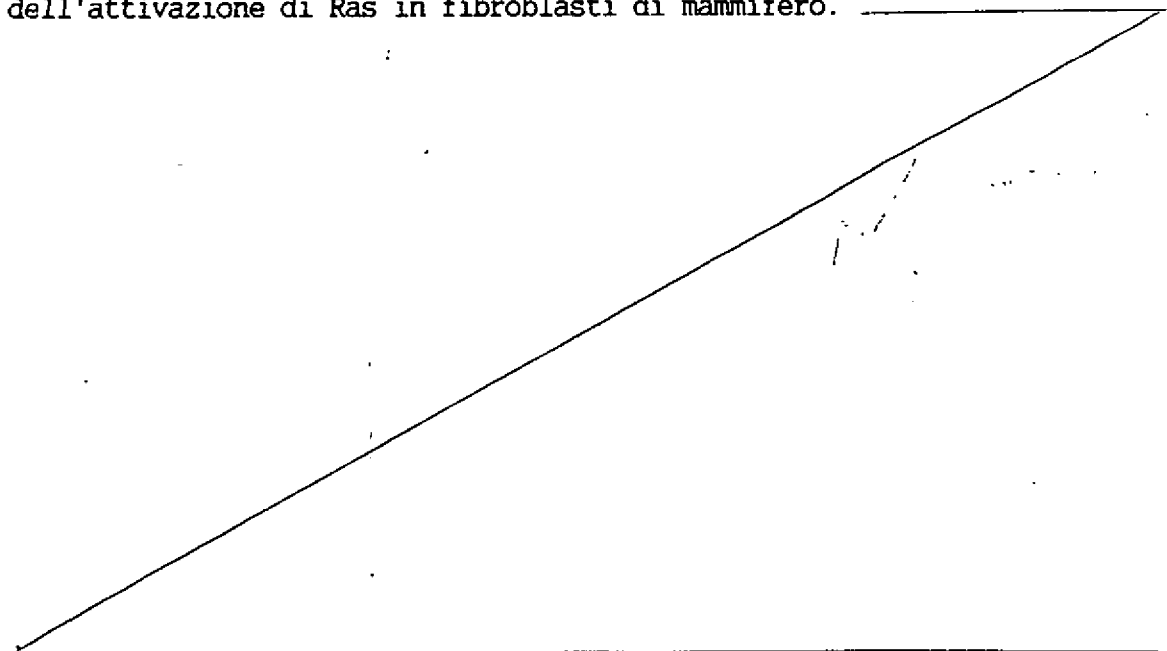


Tabella 3: Effetto di CDC25^{Mm}W1054E sulla morfologia di fibroblasti trasformati

LINEA CELLULARE DERIVATA DA 226.4.1	PLASMIDE TRASFETTATO	MORFOLOGIA TRASFORMATA
G2.1	pCDNA vuoto	+++
G2.2	pCDNA vuoto	+++
G2.3	pCDNA vuoto	+++
G2.4	pCDNA vuoto	+++
G2.5	pCDNA vuoto	+++
G2.6	pCDNA vuoto	++
G2.7	pCDNA vuoto	++
G2.DN.1	pCDNA /CDC25 ^{Mm} W1054E	-
G2.DN.2	pCDNA /CDC25 ^{Mm} W1054E	-
G2.DN.3	pCDNA /CDC25 ^{Mm} W1054E	-
G2.DN.4	pCDNA /CDC25 ^{Mm} W1054E	+/-
G2.DN.5	pCDNA /CDC25 ^{Mm} W1054E	+/-
G2.DN.6	pCDNA /CDC25 ^{Mm} W1054E	-
G2.DN.7	pCDNA /CDC25 ^{Mm} W1054E	++
G2.DN.8	pCDNA /CDC25 ^{Mm} W1054E	-

I parametri valutati per definire la morfologia trasformata sono: perdita di capacità di adesione, perdita dell'aspetto cellulare appiattito, perdita di inibizione da contatto.

Il grado di trasformazione è stato attribuito considerando come livello massimo di morfologia trasformata (+++) le cellule 226.4.1 parentali e come livello minimo (-) le cellule NIH/3T3 non trasformate.

RIVENDICAZIONI

1. Sequenza amminoacidica di un fattore di scambio dei nucleotidi guanilici (GEF) comprendente un tratto di dominio catalitico in cui il triptofano (W) corrispondente alla posizione 1054 della proteina di classe GEF denominata CDC25^{Mm}, è mutato in un amminoacido acido.
2. Sequenza amminoacidica secondo la rivendicazione 1 comprendente un numero di amminoacidi a monte o a valle rispetto al Trp mutato, tale che il peptide/proteina derivante sia in grado di legare proteine della famiglia ras in competizione con le proteine GEF native.
3. Sequenza amminoacidica secondo la rivendicazione 1 in cui l'amminoacido acido introdotto al posto del Trp è acido glutammico.
4. Sequenza amminoacidica secondo le rivendicazioni 1-3 in cui detta sequenza corrisponde alla proteina mutata CDC25^{Mm} W1054E.
5. Sequenza amminoacidica secondo le rivendicazioni 1-3 in cui detta sequenza corrisponde alla proteina mutata CDC25^{Mm} 974-1260 W1054E.
6. Sequenza amminoacidica di proteine chimeriche ottenibile combinando la sequenza amminoacidica della rivendicazione 1 con la sequenza amminoacidica di altre proteine.
7. Sequenza genica codificante per la sequenza amminoacidica delle rivendicazioni 1-6.
8. Plasmide contenente la sequenza genica della rivendicazione 7.
9. Composizioni farmaceutiche contenenti come principio attivo una sequenza amminoacidica delle rivendicazioni 1-6.
10. Uso delle sequenze amminoacidiche delle rivendicazioni 1-6 per la preparazione di medicinali da impiegare nella cura di patologie

connesse con l'attivazione di proteine ras.

11. Uso delle sequenze amminoacidiche secondo la rivendicazione 10 per la preparazione di medicinali da impiegare nella cura di tumori, di malattie cardiovascolari, della restenosi arteriosa, di stati infiammatori.

12. Uso delle sequenze geniche della rivendicazione 7 per la preparazione di medicinali da impiegare nella cura di patologie connesse con l'attivazione di proteine ras.

13. Uso delle sequenze geniche secondo la rivendicazione 12 per la preparazione di medicinali da impiegare nella cura di tumori, di malattie cardiovascolari, della restenosi arteriosa, di stati infiammatori.

Milano, 8 luglio 1997

Il Mandatario
(Minoja Fabrizio)
dello Studio Consulenza Brevettuale s.r.l.



MI 97 A 1627

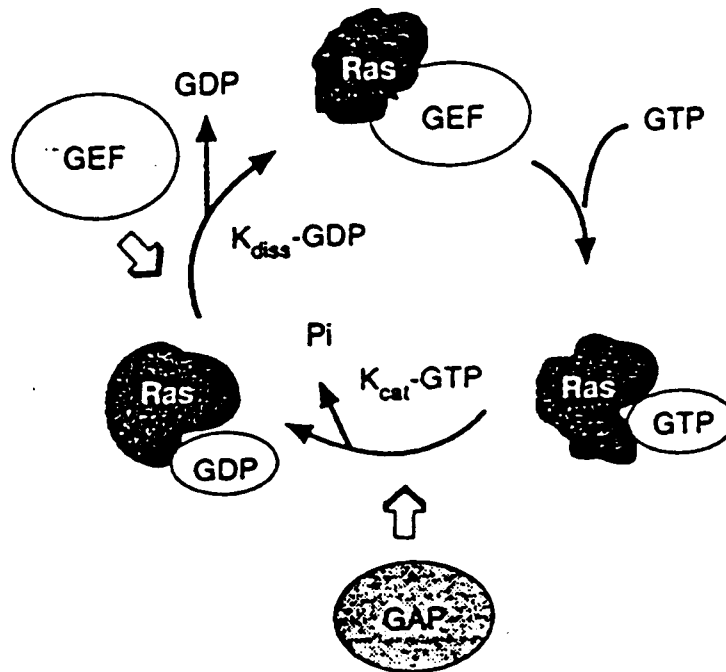
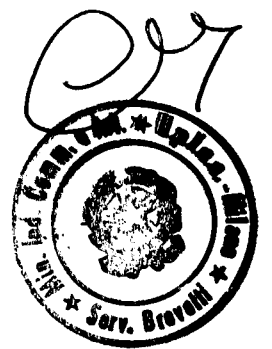


FIGURA 1



Il Mandatario
(Minoja Fabrizio)
dello Studio Consulenza Brevettuale s.r.l.

Minoja

MI 97 A 1627

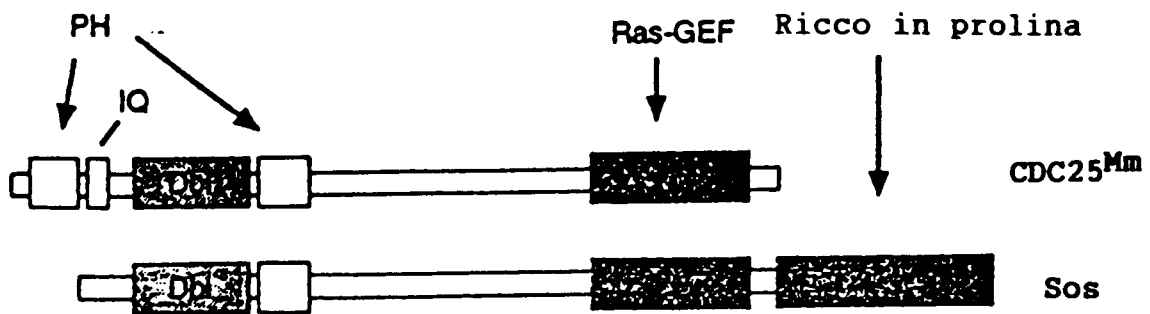
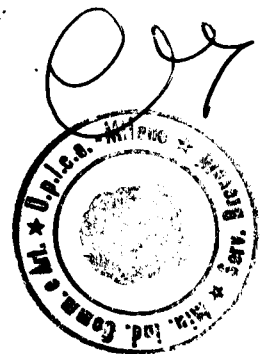


FIGURA 2

Il Mandatario
(Minoja Fabrizio)
dello Studio Consulenza Brevettuale s.r.l.

F. Minoja



MI 97A 1627

CDCSM 974-1260 Met His Asp Pro Asp Leu Leu Thr Gln Glu Arg Lys Ala Ala Ala Asn Ile Ile
ATG CAT GAC CCA GAC CTT CTG ACC CAA GAG CGA AAG GCA GCA GCC AAC ATC ATC

Arg Thr Leu Thr Leu Glu Glu Thr Thr Glu Gln His Ser Met Leu Glu Glu Val Ile Leu
AGG ACT CTG ACC CTA GAA GAA ACA ACT GAA CAA CAT AGC ATG CTG GAA GAA GTC ATA CTG

Met Thr Glu Gly Val Lys Thr Glu Pro Phe Glu Asn His Pro Ala Leu Glu Ile Ala Glu
ATG ACG GAG GGT GTG AAG ACT GAG CCC TTC GAA AAC CAC CCA GCC CTG GAG ATA GCA GAG

Gln Leu Thr Leu Leu Asp His Leu Val Phe Lys Ser Ile Pro Tyr Glu Glu Phe Phe Gly
CAG CTG ACC CTG CTG GAT CAC CTT GTC TTC AAG AGT ATT CCT TAT GAA GAG TTC TTT GGC

Gln Gly Trp Met Lys Ala Glu Lys Tyr Glu Arg Thr Pro Tyr Ile Met Lys Thr Thr Lys
CAG GGC TGG ATG AAG GCC GAG AAG TAT GAA AGG ACA CCT TAC ATT ATG AAA ACC ACC AAA

His Phe Asn His Val Ser Asn Phe Ile Ala Ser Glu Ile Ile Arg Asn Glu Asp Ile Ser
CAC TTC AAC CAT GTC AGT AAC TTC ATT GCT TCA GAA ATT ATC CGA AAC GAG GAC ATC AGC

Ala Arg Ala Ser Ala Ile Glu Lys Trp Val Ala Val Ala Asp Ile Cys Arg Cys Leu His
GCA AGG GCA AGC GCC ATC GAG AAG TGG GTG GCT GTG GCC GAC ATA TGT CGC TGC CTG CAC

Asn Tyr Asn Ala Val Leu Glu Ile Thr Ser Ser Ile Asn Arg Ser Ala Ile Phe Arg Leu
AAC TAC AAT GCT GTG CTG GAG ATC ACC TCC TCC ATC AAC CGC AGC GCC ATC TTC CGT CTC

Lys Lys Thr Trp Leu Lys Val Ser Lys Gln Thr Lys Ser Leu Leu Asp Lys Leu Gln Lys
AAA AAG ACA TGG CTC AAA GTT TCT AAG CAG ACG AAA TCT TTG CTT GAC AAG CTC CAA AAG

Leu Val Ser Ser Asp Gly Arg Phe Lys Asn Leu Arg Glu Ser Leu Arg Asn Cys Asp Pro
CTT GTG TCA TCA GAT GGC AGA TTT AAG AAC CTC AGA GAG TCT TTG AGA AAT TGT GAT CCA

Pro Cys Val Pro Tyr Leu Gly Met Tyr Leu Thr Asp Leu Val Phe Ile Glu Glu Gly Thr
CCC TGT GTC CCT TAC CTG GGG ATG TAT CTC ACC GAC TTG GTG TTC ATC GAG GAG GGG ACA

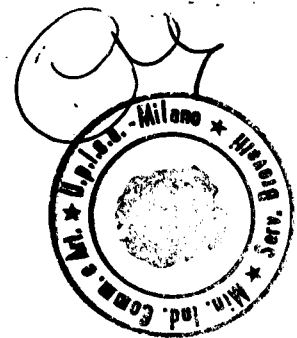
Pro Asn Tyr Thr Glu Asp Gly Leu Val Asn Phe Ser Lys Met Arg Met Ile Ser His Ile
CCC AAT TAC ACA GAG GAC GGC CTG GTC AAC TTC TCC AAG ATG AGA ATG ATC TCC CAT ATT

Ile Arg Glu Ile Arg Gln Phe Gln Gln Thr Thr Tyr Lys Ile Asp Pro Gln Pro Lys Val
ATC CGA GAG ATT CGC CAG TTT CAG CAG ACT ACC TAC AAA ATC GAC CCC CAG CCA AAG GTA

Ile Gln Tyr Leu Leu Asp Glu Ser Phe Met Leu Asp Glu Glu Ser Leu Tyr Glu Ser Ser
ATT CAG TAC TTA CTG GAT GAA TCT TTC ATG TTG GAC GAA GAA AGC CTG TAT GAG TCT TCG

Leu Leu Ile Glu Pro Lys Leu Pro Thr TER
CTC CTA ATC GAA CCA AAA CTC .GCC ACA TGA

FIGURA 3



Il Mandatario
(Minoja Fabrizio)
dello Studio Consulenza Brevettuale s.r.l.

F. Minoja

CDC25	-----LKKLKLDDIPYTYATQLTVLEHDLYLRLITMFECLDRAWGTKY	1338
SDC25	-----STTESILAVDPVLFATQLTILEHEIYCEITTFDCLQKIWOXK	983
CaCDC25	-----KKPRVMDIDYVELARQLTLREFKLYCKITKFLACLAKVWGKKS	1101
ste6	-----YKDELVLLLPPREIATQCLILEFQSFHSISRIQFLTQIWDNLN	696
SkCDC25	-----MRKLLKLLDIDSLDYAKQLTIKEHSLFYKISPFECLEDRTWGNKY	845
CDC25Mm	tteqhsmlleevilmtegvKTEPFENHPALEIAEQTLTLLDHLVFKSIPYEEFFGGQWMAE	1058
RatGRF	itenhsmldelllmttegvKTEPFENHSAMEIAEQTLTLLDHLVFKSIPYEEFFGGQWMAE	1042
hgrf55	pgdnqitleeitqmaegvKAEPFENHSALEIAEQTLTLLDHLVFKSIPYEEFFGGQWMAE	287
DmeSos	-----NDEITLLTLHPLELARQLTLLLEFEMYKQVVKPSELVGSVWTKED	861
hSos1	-----IETFDDLTLHPLELARQLTLLLESDLYRAVQPSSELVGSVWTKED	813
mSos1	-----IETFDDLTLHPLELARQLTLLLESDLYRAVQPSSELVGSVWTKED	830
mSos2	-----FETFDLMTLHPLELARQLTLLLESDLYRQVQPSSELVGSVWTKED	776
CDC25	CN-MGGSPNITKFIANANTLTNFVSHTIVKQADVTRSKLTQYFVTVAQHCKELNNFSSM	1397
SDC25	TKsYGASPLNEFISFANKLTNFISYVVKADKSKRAKLLSHFIFIAEYCRKFNNSM	1043
CaCDC25	GL-SEIDSITQFIKASNQLTNFVGYMILRKADPKKRVQIIRYFIQVADKCRQYNNFSSM	1160
ste6	RF---SPKEKSTFYLSNHLVNFVETETIVQEEPRRRRTNVLAYFIQVCDYLRELNNSASL	753
SkCDC25	CN-MGGSKNITEFISNSNHLTNVYSFMIKQTDIKKRIQLIQFFINVAACHCHELNNSL	904
CDC25Mm	KY--ERTPYIMKTTKHFNFHVSNFIASEIIRNEDI SARASAI EKWAVADICRCLHNYNAV	1116
RatGRF	KN--ERTPYIMKTTKHFNFHVSNFIASEIIRNEDI SARASAI EKWAVADICRCLHNYNAV	1100
hgrf55	KN--ERTPYIMKTTKHFNFHVSNFIASEIIRNEDI SARASAI EKWAVADICRCLHNYNAV	345
DmeSos	KE--VKSPNLLKIMKHTTNVTRWIEKITEAENYEERLAIMQRAI EVMVMLELNNGVI	919
hSos1	KE--INSPNLLKIMRHTTNLTLWFEKCI VETENLEERVAVVSRIEILQVFQELNNFNGV	871
mSos1	KE--INSPNLLKIMRHTTNLTLWFEKCI VETENLEERVAVVSRIEILQVFQELNNFNGV	888
mSos2	KE--INSPNLLKIMRHTTNLTLWFEKCI VEAENFEERVAVLSRIVEILQVFQELNNFNGV	834
CDC25	TAIVSALYSSPIYRLKKTWDLVSTESKDLLKLNLMDSKRNFKVYRELLRSVTDVACVP	1457
SDC25	TDII SALLYSSPIYRLEKTTQAVI PQTRDLLQSLNKLMDPKKNFINYRNLKSLHSAPCVP	1103
CaCDC25	TAII SALLYSSPIHRLKKTWEYMNADALSNLKMNKLMNSSRNFNERYDVLKFI GSEPCVP	1220
ste6	FSII SALSNSPIHRLKKTWANLNSKTLAS FELLNLT EARKNF SNYRDCLN-CVLP CVP	812
SkCDC25	TAII SALLYSSPIYRLKRTWAAPVEEYKLLLEELNLMDSAKNFIRYRQLLKSIGDFPCVP	964
CDC25Mm	LEITSSINRSALFRLLKKTWLVKSKQTKSLDLDKQLKLVSSDGRFKNLRETLRN-CDPPCVP	1175
RatGRF	LEITSSINRSALFRLLKKTWLVKSKQTKSLDLDKQLKLVSSDGRFKNLRETLRN-CDPPCVP	1159
hgrf55	LEITSSINRSALFRLLKKTWLVKSKQTKSLDLDKQLKLVSSDGRFKNLRETLRN-CDPPCVP	404
DmeSos	LSIVAAMGTASVYRLRWTFOGLPERYRKFLEECRELSDDHLKQYERLRSIN---PPCVP	976
hSos1	LEVVSAMNSSPVYRLDHTFEQIPSRQKKILEEAHELSEDHYKYLAKLRSIN---PPCVP	928
mSos1	LEVVSAMNSSPVYRLDHTFEQIPSRQKKILEEAHELSEDHYKYLAKLRSIN---PPCVP	945
mSos2	LEIVSAVNSVSVYRLDHTFEALQERKRRI LDDAVELSDQHFKKYLKLSIN---PPCVP	891
CDC25	FFGVYLSDLTFTFVGNPDF-----LHNSTNIINFSKRTKIANIVEEII SFKRFHYK	1508
SDC25	FFGVYLSDLTFTDSGNPDYLVlehglkgVHDEKKYINFKRSRLVDILQEI IYFKKTHYD	1163
CaCDC25	FFGVYLSDLTFVYHGNPDY-----LYNRTQVNF AKRAKTSEIVSGIDRFKTTGYN	1271
ste6	FLGVYFTDLTFLKTGN-----KDNFQNMINEFKRTKVTRILNEIKKQFQSVGYM	860
SkCDC25	FFGVYLSDLTFTANGNPDF-----LHRNTVLVNFGRVRI LEILKEISVYRSHYK	1015
CDC25Mm	YLGMYLTDLVFIEEGTP-----NYTEDGLVNF SKMRMISHI IREIRQFQQTYYK	1224
RatGRF	YLGMYLTDLAFIEEGTP-----NYTEDGLVNF SKMRMISHI IREIRQFQQTYYK	1208
hgrf55	YLGMYLTDLAFIEEGTP-----NYTEDGLVNF SKMRMISHI IREIRQFQQTAYK	453
DmeSos	FFGRYLTNHLHEEGNPD-----LLANTELINF SKRRKVAEII GEIQYQYQNPYC	1026
hSos1	FFGIYLTNHLKTEEGNPEVL-----KRHGKELINF SKRRKVAEITGEIQYQYQNPYC	980
mSos1	FFGIYLTNHLKTEEGNPEVL-----RRHGKELINF SKRRKVAEITGEIQYQYQNPYC	997
mSos2	FFGIYLTNHLKTEEGNSDFL-----KRHGKDLINF SKRRKVAEITGEIQYQYQNPYC	943
CDC25	LKRLDDIQTVEASLENvphiekqyqlslqveprsgntkgs thassa sgtktakflseft	1568
SDC25	FTKDRVTIECISNSLENiphiekqyqlsliepkprkkvvpnsnsnksqeks rddqtde	1223
CaCDC25	FQEVPEIQKFLDAWFEKcptideqyqlslnlepreqpagasnssttnattniks fkpfs	1331
ste6	FNPINEVQELLNEVISRerntnniyqrsltvepresedqalqrlldsgif-----	911
SkCDC25	LKRYEDIQAFIESSLENlpsiekqyaqlrneprtevstglnstnvnryntkngpenrn	1075
CDC25Mm	IDPQPKVIQYLLDESFMldeeslyesslliepklt-----	1260
RatGRF	IEPQPKVTQYLVDETFVlddeslyeasrliepklt-----	1244
hgrf55	IEHQAKVTQYLLDQSFVmdeslyesslliepklt-----	489
DmeSos	LNEESTIRQFFEQLDPFnglsdkqmsdylneslrieprgcktvpkfprkwphiplkspg	1086
hSos1	LRVESDIKRFFENLNPmgnsmekeftdylfnksleieprnkpplprfpkkyssyplkspgv	1040
mSos1	LRVEPDIKRFFENLNPmgnsmekeftdylfnksleieprhpkplprfpkkyssyplkspgv	1057
mSos2	LRTEPEMRRFFENLNPmgilsekeftdylfnksleieprnckqpprfrpkstfslkspgi	1003

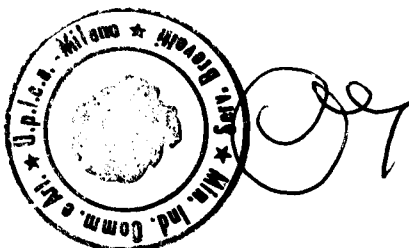


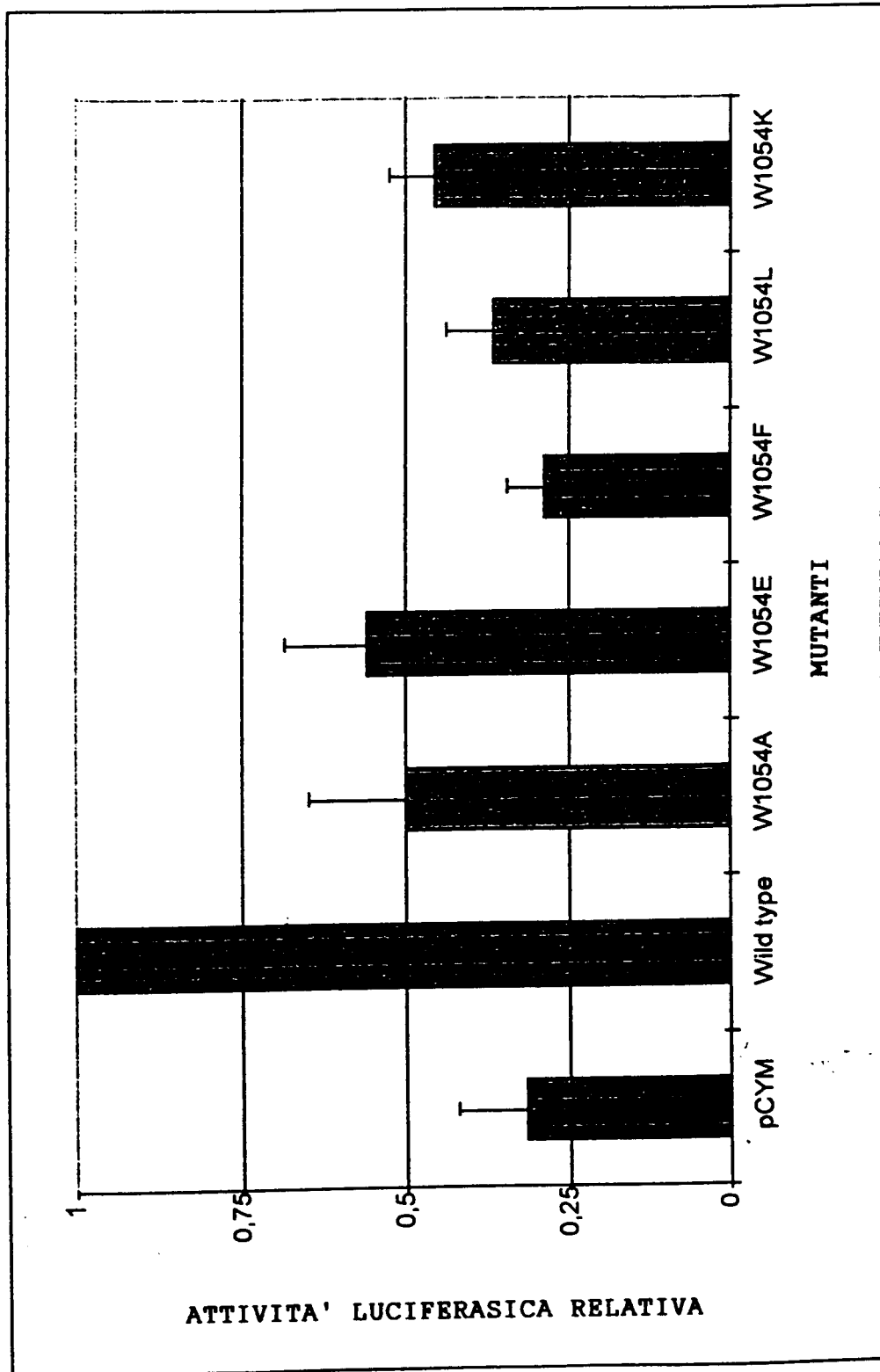
FIGURA 4

Il Mandatario
(Minoja Fabrizio)
dello Studio Consulenza Brevettuale s.r.l.

Allegato

FIGURA 5

MI 97 A 1627



[Handwritten signature]

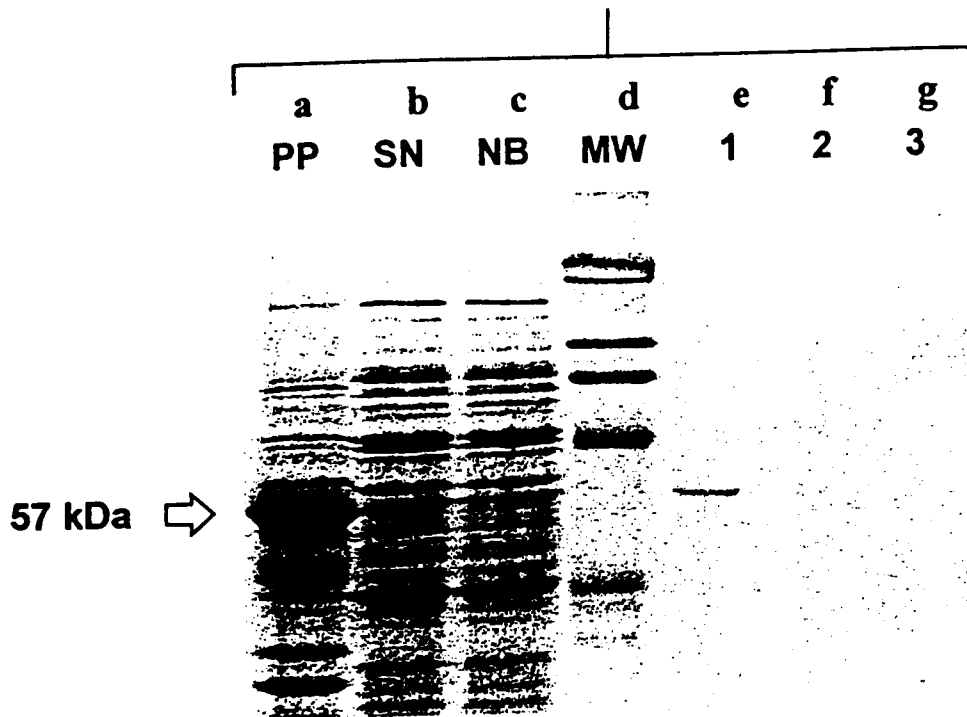
Il Mandatario
(Minoja Fabrizio)
dello Studio Consulenza Brevettuale s.r.l.

[Handwritten signature]

FIGURA 6

MI 97A 1627

GST-CDC25^{Mm}W1054E



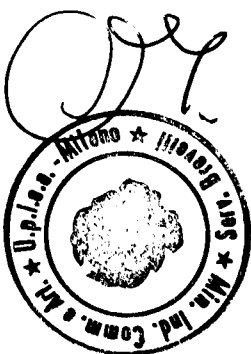
Corsia a: "pellet" cellulare

Corsia b: surnatante

Corsia c: non legato

Corsia d: pesi molecolari

Corsia e, f, g: frazioni purificate



Il Mandatario
(Minoja Fabrizio)
dello Studio Consulenza Brevettuale s.r.l.

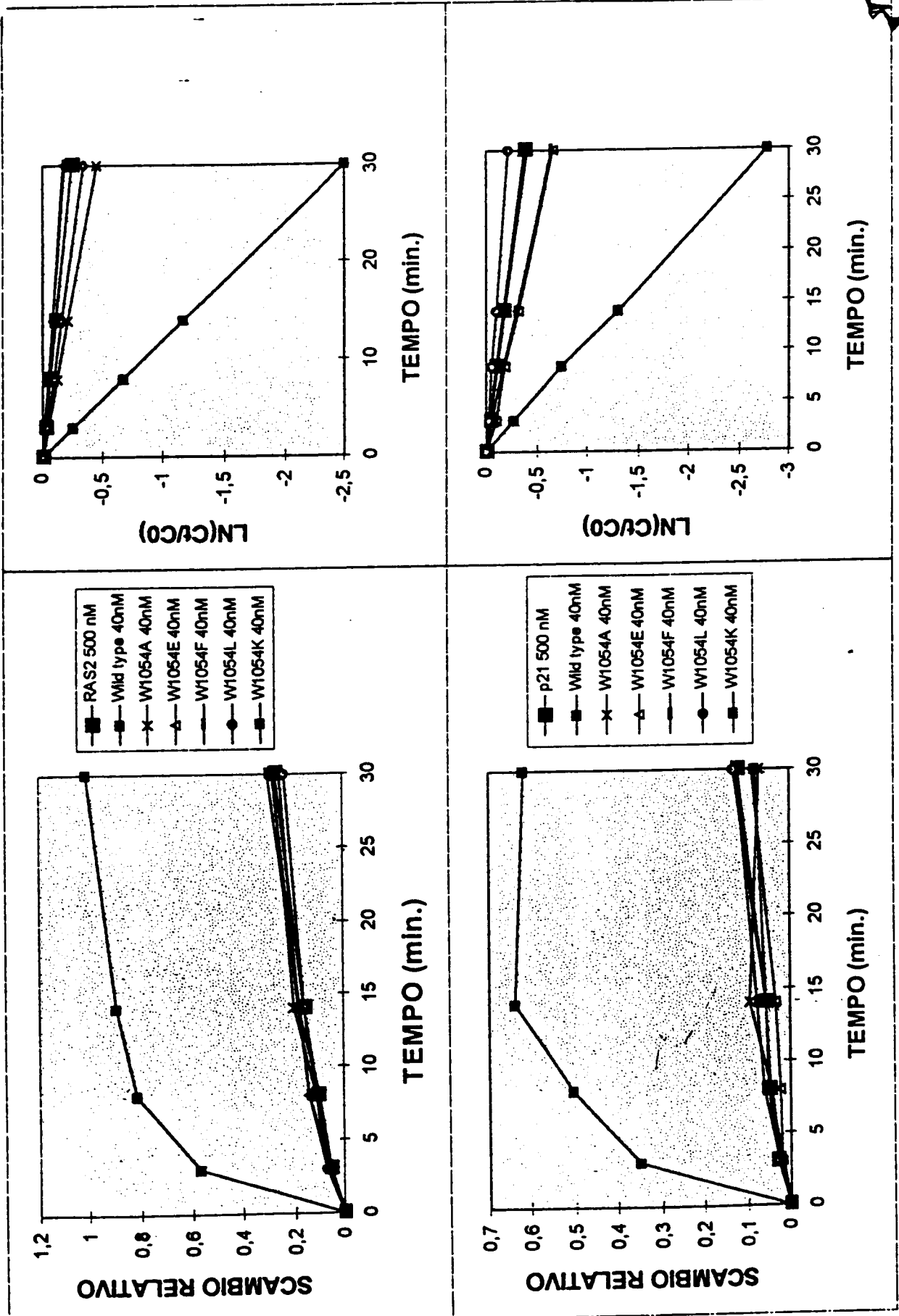


FIGURA 7

Il Mandatario
 (Minoja Fabrizio)
 dello Studio Consulenza Brevettuale s.r.l.



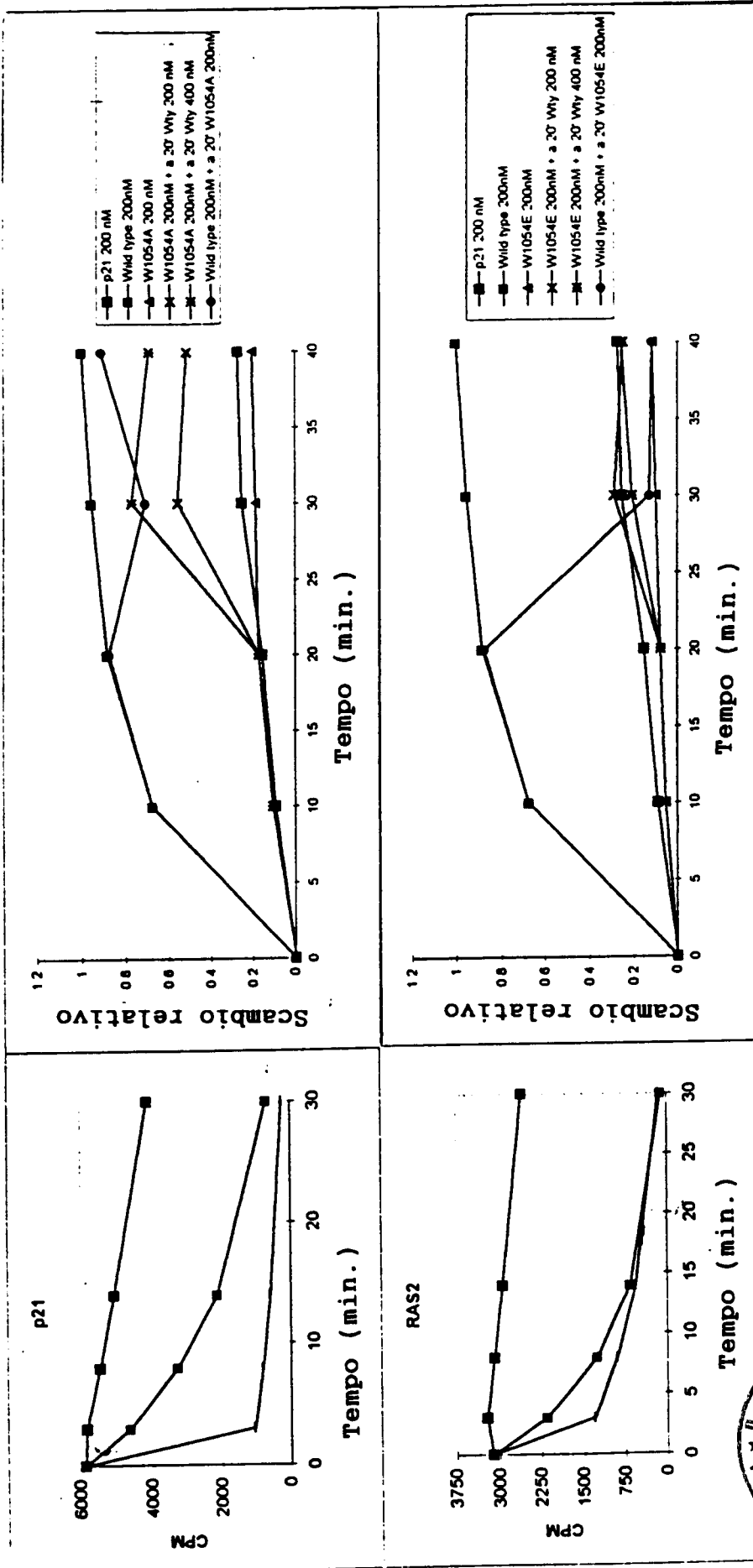
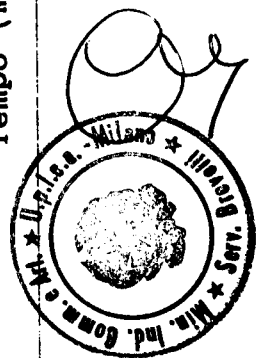


FIGURA 8

Il Mandatario
 (Minoja Fabrizio)
 dello Studio Consulenza Brevettuale s.r.l.

Fabrizio



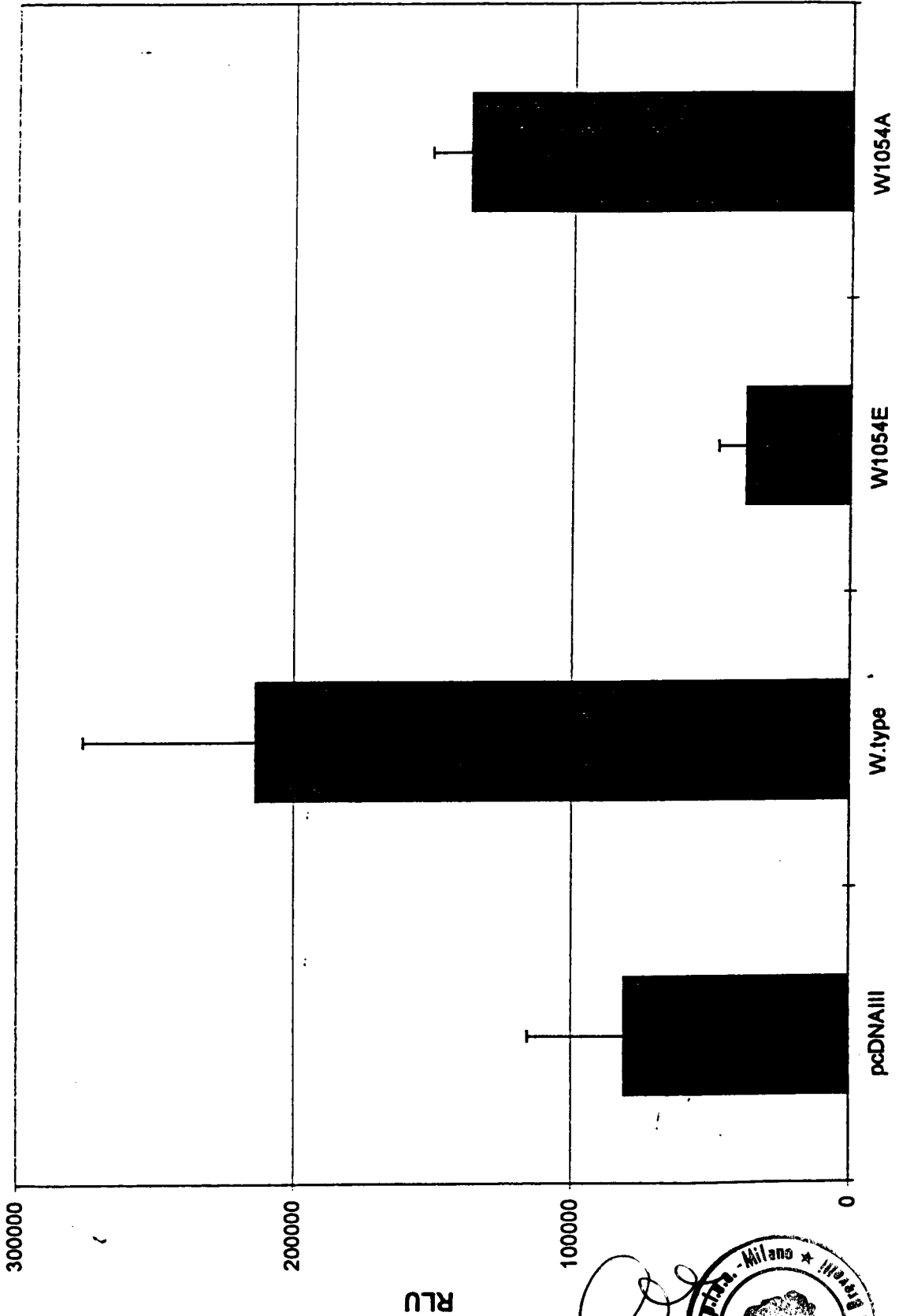
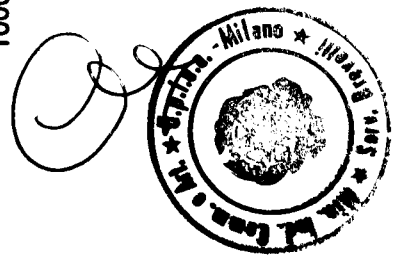


FIGURA 9

Il Mandatario
(Minoja Fabrizio)
dello Studio Consulenza Brevettuale s.r.l.



Fabrizio

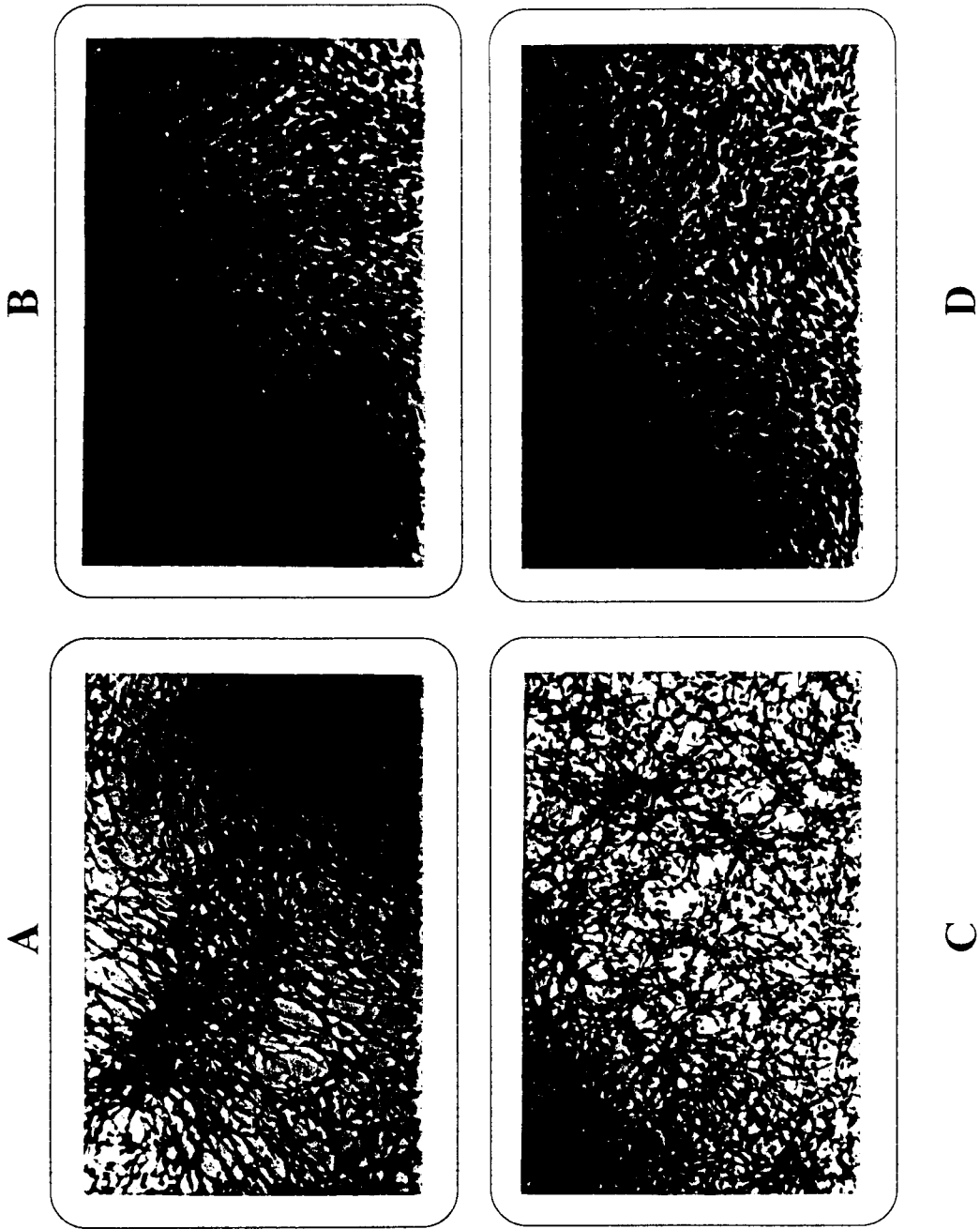


FIGURA 10

Il Mandatario
(Minoja Fabrizio)
dello Studio Consulenza Brevettuale s.r.l.

F. Minoja

