



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA NUMERO	102000900851738
Data Deposito	05/06/2000
Data Pubblicazione	05/12/2001

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	N		

Titolo

ANIMALI TRANSGENICI NON UMANI ESPRIMENTI ANTICORPI ANTI-NGF.

DESCRIZIONE

a corredo di una domanda di brevetto per invenzione industriale avente per titolo: "Animali transgenici non umani esprimenti anticorpi anti-NGF" a nome: S.I.S.S.A. Scuola Internazionale Superiore di Studi Avanzati inventori: Cattaneo Antonino, Capsoni Simona, Ruberti Francesca

* * * *

Campo tecnico

La presente invenzione concerne animali non umani transgenici per un anticorpo anti-NGF (Nerve Growth Factor) in grado di mimare sindromi neurodegenerative, da utilizzarsi come modello per lo studio di tali patologie e per la messa a punto di terapie.

Stato della tecnica

Il Nerve Growth Factor (NGF) (Levi-Montalcini, 1952) è una neurotrofina pleiotropica che esercita un ruolo fondamentale nel differenziamento neuronale, sia a livello del sistema nervoso centrale che periferico. L'NGF risulta infatti indispensabile per il differenziamento dei neuroni colinergici del telencefalo basale, dei neuroni sensitivi e di quelli del sistema nervoso simpatico.

L'NGF è necessario anche in fasi successive al differenziamento, in quanto in grado di regolare i fenomeni di apoptosi cellulare (Davies, 1992), la sintesi di elementi del citoscheletro durante la rigenerazione dell'assone (Snider, 1989), la sintesi di neurotrasmettitori peptidici ed enzimatici (Eide et al., 1993), il riarrangiamento sinaptico e la proliferazione neuronale (Schnell et al., 1994) e che giochi quindi un

ruolo cruciale anche nei processi neurodegenerativi e nell'invecchiamento neuronale (Connor & Dragunow, 1998).

I meccanismi di azione che regolano attività così diverse, rimangono ancora da chiarire: l'azione pleiotropica dell'NGF e la mancanza di modelli animali adulti non permettono di correlare la sua espressione ad un solo e definito fenotipo o ad una determinata e riconoscibile funzione. L'inattivazione dell'NGF in modelli animali adulti, è stata tentata mediante diversi approcci, tra cui una l'immunoneutralizzazione con la veicolazione ("delivery") sistemica di anticorpi neutralizzanti anti-NGF (Levi-Montalcini et al., 1960), o mediante il "knockout" del gene in topi transgenici (Crowley et al., 1994).

Tuttavia i risultati sono stati, in entrambi i casi, piuttosto deludenti, in quanto gli anticorpi forniti sistemicamente non superano la barriera ematoencefalica, e l'effetto di neutralizzazione dell'NGF negli altri distretti dipende da troppi altri fattori poco standardizzabili quali l'affinità e il titolo dell'antisiero, la velocità di clearance o la cross-reattività dell'anticorpo policlonale con altre neurotrofine, ecc.

D'altra parte, l'approccio di inattivazione molecolare in topi ("knockout") ha permesso di confermare l'importanza di questa neurotrofina e la non ridondanza del suo sistema di signalling intracellulare, ma ha mancato di fornire il modello adulto atteso per lo studio dell'NGF: infatti i topi transgenici $ngf^{-/-}$ muoiono poco dopo la nascita prima di un eventuale sviluppo di patologie degenerative. Anche il fenotipo di topi eterozigoti $ngf^{+/-}$ è risultato poco utile allo studio delle

patologie associate alla mancanza di NGF nell'adulto: il topo eterozigote ha un livello di NGF solo del 25% inferiore al controllo, presenta solo un fenotipo di debole deficit colinergico, senza anomalie evidenti e correlabili con patologie neurodegenerative umane.

Diverse evidenze sperimentali suggeriscono tuttavia che l'NGF rivesta un ruolo chiave in sindromi neurodegenerative (Connor & Dragunow, 1998). La demenza senile e la malattia di Alzheimer (Alzheimer's Disease, AD) sono sindromi neurodegenerative caratterizzate da demenza progressiva. La malattia di Alzheimer colpisce il 5% delle persone intorno ai 70 anni e più del 30% delle persone intorno agli 80 anni. La sua incidenza, in relazione al miglioramento delle condizioni di vita ed al prolungamento dell'età media, è destinata a raddoppiare nei prossimi trenta anni. I costi sociali di tale patologia sono elevatissimi. La malattia di Alzheimer colpisce dapprima i neuroni della corteccia cerebrale ed è caratterizzata sia da sintomi clinici (come per esempio, la perdita progressiva delle capacità cognitive) sia da caratteristici segni patologici (che possono essere diagnosticati solo post-mortem), come la formazione di placche extracellulari di proteina β -amiloide, aggregazioni intracellulari neurofibrillari, costituite da proteina tau iperfosforilata, e «perdita neuronale» (Goedert, 1993; Mandelkow e Mandelkow, 1993; Selkoe, 1994). Nel sistema nervoso centrale, il sistema colinergico è particolarmente colpito, con una diminuzione della sintesi di acetilcolina da parte dei neuroni colinergici del telencefalo basale ed una perdita selettiva di tali neuroni. I neuroni colinergici sono

3
5

dipendenti dall'NGF che agisce attraverso i recettori ad alta (TrkA) e a bassa affinità (p75). La malattia di Alzheimer è associata inoltre a disturbi motori dovuti sia alla perdita delle capacità cognitive e di coordinazione, sia a patologie proprie del muscolo scheletrico come la deposizione di amiloide nelle cellule muscolari scheletriche (Fukuchi et al., 1998; Jin et al., 1998). E' interessante ricordare che l'NGF esercita una funzione anche su cellule non neuronali, anche per la presenza di recettori per l'NGF a bassa e ad alta affinità (p75, TrkA) anche su cellule muscolari, e per il ritrovamento di isoforme diverse del recettore TrkA apparentemente non espresse nel sistema nervoso.

Nonostante gli enormi investimenti effettuati, non esiste a tutt'oggi una diagnosi precoce, nè una terapia adeguata per l'AD. Ciò è dovuto, soprattutto, alla mancanza di modelli sperimentali cellulari o animali che riproducano in modo completo e fedele la formazione delle strutture neuropatologiche aberranti. Negli ultimi anni sono stati proposti diversi modelli transgenici per la definizione dell'eziopatogenesi della malattia di Alzheimer e per la selezione di composti utili nella terapia della malattia. A partire dall'osservazione delle caratteristiche istologiche, immunologiche e molecolari della malattia di Alzheimer, quali la presenza di depositi di proteina β -amiloide nel sistema nervoso centrale, in particolare a livello della corteccia cerebrale e nell'ippocampo, sono stati derivati animali transgenici in cui il precursore della proteina β -amiloide (β APP) wild-type viene espresso a livelli superiori a quelli endogeno, o viene espresso in forma mutata con mutazioni riscontrate

nelle forme genetiche della malattia (Hsiao, WO 97/87492 e Games, WO 96/40896). Altri modelli transgenici proposti riguardano animali in cui il transgene è la presenilina-1 o -2 (Citron et al., 1996; Sturchler-Pierrat et al., 1997), da sola o insieme con il precursore della proteina amiloide (Amyloid Precursor Protein, APP) (Borchelt et al., 1997; Holcomb et al., 1998; Wong et al., 1999), la proteina tau (Gotz et al., 1995; Brion et al., 1999) o il frammento C-99 della proteina β APP (Jin et al., 1998).

Tutti i modelli finora proposti tuttavia, sviluppano solo alcuni dei markers morfologici, istologici, o molecolari definiti come caratteristici per la diagnosi della malattia di Alzheimer e non rappresentano pertanto dei modelli completi, effettivamente utilizzabili per lo studio e la messa a punto di terapie efficaci e per la sperimentazione di farmaci.

Descrizione dell'invenzione

Nella presente invenzione viene descritto un animale transgenico non umano che esprime ubiquitariamente un anticorpo neutralizzante anti-NGF. Viene inoltre descritto il metodo di preparazione dell'animale transgenico ed l'utilizzo di questo modello di knockout fenotipico, per la valutazione degli effetti pleiotropici dell'NGF. Un ulteriore aspetto dell'invenzione riguarda l'uso del topo transgenico come modello animale per le sindromi neurodegenerative, associate o meno a patologie muscolari, quali la malattia di Alzheimer, ed il suo uso per la selezione di composti in grado di bloccare la degenerazione neuronale o la perdita di funzionalità muscolare. Un ulteriore aspetto della presente invenzione è riferito all'uso di NGF per la correzione di patologie

muscolari e del deficit colinergico a livello cerebrale e di patologie neurodegenerative, come AD.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

La presente invenzione descrive un animale transgenico non umano, che esprime un anticorpo neutralizzante anti-NGF (Nerve Growth Factor). L'anticorpo utilizzato (α D11) lega l'NGF in corrispondenza di un epitopo responsabile del legame con il suo recettore ad alta affinità, TrkA, bloccandone il legame, e risulta quindi essere un anticorpo neutralizzante. L'epitopo riconosciuto dall'anticorpo α D11 (comprendente gli amminoacidi 41-49 dell'NGF) corrisponde ad una sequenza poco conservata nella famiglia delle neurotrofine, ed è quindi specifico del NGF. Alternativamente possono essere utilizzati anticorpi che sono in grado di bloccare il «signalling» intracellulare. Alternativamente l'anticorpo ricombinante può essere nella forma Fab, Fv o single chain Fv.

Sorprendentemente gli autori dell'invenzione hanno trovato che topi transgenici per anticorpi anti-NGF, che non esprimono apprezzabili livelli di anticorpo nell'immediato periodo post-natale e che esprimono tale anticorpo a livelli compresi tra 50 e 500 ng/ml nel periodo adulto, sviluppano un complesso quadro patologico, le cui principali caratteristiche sono:

- 1) distrofia muscolare, particolarmente a livello degli arti posteriori;

- 2) dilatazione dei ventricoli cerebrali, segno che viene spesso utilizzato in clinica come indice di malattie neurodegenerative, come la malattia di Alzheimer (Luxenberg et al., 1987);
- 3) atrofia della corteccia cerebrale associata in qualche caso alla totale scomparsa dell'ippocampo;
- 4) perdita di neuroni e/o apoptosi, segno posto in relazione alla malattia di Alzheimer (Mizutani et al., 1990);
- 5) deposizione di placche di proteina β -amiloide nel SNC, a livello della corteccia paracingolare e del neostriato;
- 6) deposizione di placche di proteina β -amiloide nel muscolo scheletrico;
- 7) grovigli (tangles) neurofibrillari e neuriti distrofici;
- 8) deficit cognitivi caratterizzati da difetti nella «working memory» e deficit di orientamento spaziale;
- 9) deficit colinergico;
- 10) iperfosforilazione della proteina tau a livello cerebrale;
- 11) iperfosforilazione della proteina tau nel muscolo;
- 12) infiltrazione di cellule di tipo infiammatorio nel muscolo;
- 13) alterazioni dell'innervazione simpatica della milza e riduzione della vitalità degli splenociti;
- 14) aggregazione della proteina tau nel cervello.

Un aspetto della presente invenzione riguarda l'animale transgenico anti-NGF come modello di studio per le patologie indotte da deprivazione di NGF. La deprivazione di NGF a livello sistemico potrebbe avere diverse eziologie, anche di carattere autoimmune. A

livello locale, una mancanza o limitata disponibilità di NGF da parte delle cellule bersaglio, può essere causata ad esempio da eventi traumatici (denervazione).

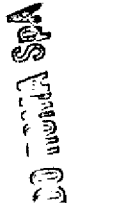
Sorprendentemente, molte delle caratteristiche del modello animale transgenico descritto nella presente invenzione, sono del tutto assimilabili a quelle presentate a livello macroscopico, istologico e molecolare dai malati di Alzheimer. La presente invenzione fornisce quindi un modello transgenico animale non umano per lo studio della malattia di Alzheimer. Le caratteristiche di questo modello sono riassunte in tabella 1, dove vengono riportate in confronto con quelle di altri modelli di animali transgenici proposti per questa malattia. Come appare dalla tabella 1 l'animale transgenico della presente invenzione presenta caratteristiche che, nel loro complesso, non sono mai state osservate nei modelli animali finora messi a punto (Hsiao et al, 1996 e WO 95/20666 e WO 97/48792; Citron et al, 1997; Borchelt et al, 1997; Holcomb et al, 1998; Wong et al, 1999; Gotz et al, 1995; Brion et al., 1999, Jin et al; 1998; Games et al, 1995; Irizarry et al, 1997).

segue tabella 1

Tabella 1

DEFICIT	topo transgenico per APP ^{1,5,9,10}	Topo transgenico per PS-1 ²	topo transgenico per APP e PS-1 ^{3,4,5}	topo transgenico per proteina tau umana mutata ⁶	topo transgenico per proteina tau umana mutata ⁷	topo transgenico per il frammento C-99 di β PP ⁸	topo transgenico per anticorpi anti-NGF (topo anti-NGF)
Dimensioni del cervello	-	-	-	-	-	-	++
Diminuzione di spessore della corteccia cerebrale	-	-	-	-	-	-	+++
Atrofia del cervelletto	-	-	-	-	-	-	+++
Dilatazione dei ventricoli cerebrali	-	-	-	-	-	-	+++
Deficit della memoria e dell'orientamento	++	-	-	-	-	-	+++
Perdita neuronale	-	-	-	-	-	-	++
Apoptosi	-	-	-	-	-	-	++
Placche amiloidee	++	++	+++	-	-	-	++
Iperfosforilazione di tau	-	-	-	++	++	-	++
Neurofibrillary tangles/ neuropil threads	++	-	-	+	+	-	+++
Attivazione delle cellule della microglia	-	-	-	-	+	-	++
Deficit colinergico	+	-	+	-	-	-	+++
Atrofia dei muscoli scheletrici	-	-	-	-	-	++	+++
Depositi amiloidei nei muscoli scheletrici (colorazione Congo Red)	-	-	-	-	-	++	++

segue


 Ministero della Sanità
 Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura delle Degenerazioni Neurodegenerative (INSD)

DEFICIT	topo transgenico per APP ^{1,5,9,10}	Topo transgenico per PS-1 ²	topo transgenico per APP e PS-1 ^{3,4,5}	topo transgenico per proteina tau umana mutata ⁶	topo transgenico per proteina tau umana mutata ⁷	topo transgenico per il frammento C-99 di β PP ⁸	topo transgenico per anticorpi anti-NGF (topo anti-NGF)
Depositi amiloidei nel muscolo scheletrico (anti-APP IH)	-	-	-	-	-	++	++
Tau iperfosforilata nel muscolo (IH)	-	-	-	-	-	-	+
Infiltrazione di macrofagi	-	-	-	-	-	+++	+++
Vacuolizzazione delle fibre muscolari	-	-	-	-	-	+++	++
Aumento del numero di nuclei in posizione centrale (miofibra)	-	-	-	-	-	++	++

- ¹Hsiao et al., 1996.
²Citron et al., 1997.
³Borchelt et al., 1997.
⁴Holcomb et al., 1998.
⁵Wong et al., 1999.⁶Gotz et al., 1995.
⁷Brion et al., 1999.
⁸Jin et al., 1998.
⁹Games et al., 1995.
¹⁰Irizarry et al., 1997.

Risulta quindi evidente che l'animale transgenico della presente invenzione costituisce un modello animale per la malattia di Alzheimer molto più completo di quelli finora proposti. I deficit riscontrati nel topo anti-NGF, dovuti all'espressione del transgene, sono infatti a livello del sistema nervoso centrale e periferico, a livello cognitivo, a livello muscolare ed inoltre a livello morfologico-funzionale nella milza dove possono essere riscontrate anomalie nel pattern di espressione delle immunoglobuline. Risultano a questo proposito particolarmente interessanti le crescenti evidenze sperimentali che indicano come centrale il ruolo del sistema immunitario nello sviluppo della malattia di Alzheimer (Kalaria, 1993).

La preparazione dell'animale transgenico è effettuata per incrocio di due ceppi di topi transgenici parentali (progenitori), di cui uno transgenico per la catena pesante di un anticorpo anti-NGF e l'altro per la catena leggera, ed è questo metodo di preparazione un ulteriore aspetto della presente invenzione. I due ceppi di animali transgenici parentali vengono preparati mediante microiniezione del DNA plasmidico in cellule ES o nell'ocita fecondato secondo metodiche standard, conosciute al tecnico del ramo.

I vettori plasmidici contenenti le unità trascrizionali per l'espressione del cDNA di una e dell'altra delle due catene immunoglobuliniche, vengono purificati, ad esempio mediante bandeggio in un gradiente continuo di CsCl, quindi diluiti in soluzioni fisiologiche. I vettori possono essere microiniettati tal quali nel pronucleo di oociti fecondati, possono essere linearizzati mediante restrizione

enzimatica in un sito unico, oppure le unità trascrizionali separate mediante restrizione enzimatica dal vettore, purificate ad esempio mediante gel elettroforesi o colonnine a scambio ionico, ed introdotte separatamente nei pronuclei. Preferibilmente l'oozita è di topo, ancor più preferibilmente del ceppo B6SJL. Le due catene immunoglobuliniche dell'anticorpo anti-NGF possono essere chimeriche, ottenute per assemblaggio delle regioni variabili murine di un anticorpo monoclonale anti-NGF, quale il Mab α D11, con le regioni costanti delle catene leggere K e pesanti γ 1 umane, come descritto nella presente invenzione, oppure derivate tal quali dal cDNA specifico dell'ibridoma secernente. L'espressione delle due catene anticorpali nel topo transgenico è controllata da un promotore forte o virale, quale il CMV-IE (Cytomegalovirus Immediate Early), che viene espresso ubiquitariamente. Altri promotori ubiquitari che possono essere utilizzati sono il promotore del LTR di RSV (Rous Sarcoma Virus) o il promotore dei geni precoci di SV40 (SV40-IE). In una ulteriore realizzazione dell'invenzione, i due transgeni possono essere posti sotto il controllo di due promotori differenti al fine di modulare l'espressione dell'anticorpo correttamente assemblato e funzionale solo in particolari distretti dell'organismo. Al fine di ottenere l'espressione dell'anticorpo funzionale localizzata solo in un particolare distretto o regolata nel tempo, possono tuttavia essere utilizzati promotori tessuto specifici o inducibili che potranno anche essere diversi tra le due catene anticorpali.

La preparazione dell'animale transgenico effettuata secondo il metodo dell'invenzione determina l'espressione dell'anticorpo

ING. BARZANO & TORNICO ROMA SpA

funzionale nell'animale transgenico adulto a livelli circa 2000 volte superiori che alla nascita e questo consente da un lato di aumentare l'efficienza di ottenimento di prole vitale transgenica per entrambe le catene dell'anticorpo, secondo il metodo dell'invenzione, fino all'80%, e dall'altro di mettere in evidenza il fenotipo dovuto all'azione dell'NGF solo nel periodo adulto, evitando la neutralizzazione dell'NGF durante il differenziamento neuronale.

I topi transgenici derivati secondo il metodo dell'invenzione esprimono, a vari livelli e comunque in quantità compresa tra 50 e 500 ng/ml di siero, l'anticorpo chimerico funzionale costituito da entrambe le catene correttamente assemblate e secrete e non sviluppano un fenotipo letale nelle prime fasi di vita postnatale, al contrario di quanto avviene per l'animale transgenico ottenuto per microiniezione dei plasmidi codificanti per entrambe le catene immunoglobuliniche nello stesso oocita.

Gli esperimenti degli autori dell'invenzione hanno evidenziato come la patologia neurodegenerativa a livello di encefalo sia preceduta da una precoce (a 2 mesi) iperfosforilazione di tau e deposizione di amiloide nel muscolo scheletrico del dorso e degli arti inferiori. Rientra pertanto nella presente invenzione uso del monitoraggio del muscolo scheletrico per una diagnosi precoce di malattie neurodegenerative.

E' stato inoltre osservato che il fenotipo a carico dell'apparato muscolare del topo anti-NGF può revertire mediante somministrazione locale di NGF. Secondo un ulteriore aspetto, l'invenzione è quindi diretta all'uso di NGF per la preparazione di composizioni farmaceutiche

di utilizzo nella terapia di patologie muscolari, quali le distrofie/atrofie muscolari. La somministrazione di questa neurotrofina può essere effettuata con diverse modalità tra cui: iniezione intramuscolare di NGF, ad esempio ricombinante, sciolto in opportune soluzioni fisiologiche, oppure per mezzo di iniezione diretta di vettori plasmidici o virali ricombinanti, ad esempio adenovirus, oppure mediante impianto nel muscolo di cellule geneticamente ingegnerizzate per la secrezione di NGF. Il dosaggio può dipendere da diverse variabili quali l'attività specifica della proteina, la gravità della patologia da trattare, le condizioni generali di salute del paziente e potrà comunque essere compreso tra 2-100 μg /kg di peso corporeo.

Descrizione delle figure

Figura 1. Caratterizzazione molecolare dei topi transgenici progenitori (A): Unità trascrizionali utilizzate per la produzione del topo transgenico: catena leggera (pannello superiore) e catena pesante (pannello inferiore). CK e CH1-CH3, regioni costanti umane delle catene leggere (K) e pesanti ($\gamma 1$); regioni variabili delle catene leggere (VL) e pesanti (VH) dell'anticorpo monoclonale αD11 ; pCMV promotore di Cytomegalovirus. (B): Schema dell'incrocio effettuato per la generazione del topo transgenico anti-NGF esprime l'anticorpo anti-NGF funzionale. VK- αD11 X VH- αD11 (VK: linea progenitrice transgenica per la catena leggera dell'anticorpo αD11 ; VH : linea progenitrice transgenica per la catena pesante dell'anticorpo αD11). (C): Analisi mediante PCR dei transgeni VK (pannello superiore) e VH (pannello inferiore): Il gel mostra l'analisi effettuata su 12 topi omozigoti

incrociati con topi non transgenici. (D): Analisi mediante Dot blot di quattro linee di topi esprimenti la catena leggera o pesante dell'anticorpo α D11 (VK- α D11 o VH- α D11). (E): Livelli di VH- α D11 (sinistra) e VK- α D11 (destra) misurati nel cuore al tempo P1 giorno e P90 giorni mediante analisi di Phosphoimaging, normalizzati per l'mRNA di β -actina (media delle conte \pm SEM).

Figura 2. Espressione dell'anticorpo anti-NGF funzionale in cellule neuronali (A): Espressione della catena VH in cellule di Purkinje del cervelletto di topo progenitore transgenico per la catena pesante (linea C: controllo negativo). Valore della barra di scala=38 μ m. (B): Espressione di VK (sinistra) e VH (centro) nei DRG (Dorsal Root Ganglia) di topi anti-NGF della famiglia 1 di topi (transgenici per entrambe le catene). La co-espressione di entrambe le catene nella stessa cellula è mostrata nel pannello di destra. Valore della barra di scala=75 μ m. (C): Livelli di anticorpo ricombinante α D11 di topi della famiglia 1 e 2 di topi anti-NGF al tempo 1 giorno e 90 giorni, misurati nel siero (sinistra) e nel cervello (destra). La linea punteggiata rappresenta il limite di detezione del saggio (0,1 ng/ml e 0,1 ng/mg, rispettivamente). (D): Topo transgenico di controllo (transgenico solo per VH, sotto) e di un topo anti-NGF della famiglia 3 (sopra), al 17° giorno. Il topo anti-NGF è più piccolo del controllo. (E): Peso corporeo del topo anti-NGF (famiglia 1 e famiglia 2) (sinistra) e di quello di controllo (destra).

Figura 3. Marker istologici e molecolari del topo anti-NGF A-H: sezioni del telencefalo basale; I-L: sezioni di ippocampo. A-B: colorazione per ChAT. A: topi di controllo; B: topi anti-NGF. C-D:

innervazione colinergica verso la corteccia frontale. CP: caudato/putamen; FC: corteccia frontale; GCC: genus del corpo calloso. C: topo di controllo; D: topo anti-NGF. E-F: colorazione per TrkA. E: topo di controllo; F: topo anti-NGF. G-H: colorazione per p75. G: topo di controllo; H: topo anti-NGF. I-L: colorazione per ChAT. I: topo di controllo; H: topo anti-NGF. Sezioni M ed N: colorazione di Timm per le «mossy fibers» dell'ippocampo. M: topo di controllo; N: topo anti-NGF.

Figura 4. Dilatazione dei ventricoli cerebrali Sezioni coronali di encefalo di topi colorate con il metodo di Nissl. I topi anti-NGF "anziani" (15-18 mesi) hanno i ventricoli laterali (VL) dilatati (B) rispetto ai topi di controllo (A). Si osserva atrofia dei nuclei settoippocampali (SHI) e dei nuclei laterali del setto (LS).

Figura 5. Atrofia della corteccia cerebrale Sezioni coronali di encefalo di topi ottenute all'altezza del telencefalo basale. La corteccia frontale è atrofica nei topi transgenici (B) rispetto a quella dei topi di controllo (A). La barra bianca indica lo spessore della corteccia misurata in uno stesso punto anatomico. (C) Istogramma che mostra il grado di atrofia nei topi transgenici (B) rispetto a quella dei topi di controllo (A).

Figura 6. Atrofia dell'ippocampo Gli ippocampi (Hp) dei topi di controllo sono perfettamente formati (A) rispetto ai topi transgenici (B). (C) Istogramma che mostra il grado di formazione nei topi transgenici (B) rispetto a quella dei topi di controllo (A).

Figura 7. Apoptosi neuronale Marcatura di neuroni corticali apoptotici ottenuta con il metodo TUNEL. Nei topi di controllo (A) non si

osservano cellule positive, mentre nei topi anti-NGF (B) si osservano numerosi nuclei con frammentazione del DNA.

Figura 8. Fosforilazione della proteina tau I topi transgenici presentano una marcata positività per il segmento N-terminale della proteina tau (B), tau non fosforilata (D) e soprattutto per tau fosforilata (F). Nei topi di controllo non c'è marcatura (A, C, E). La marcatura è soprattutto localizzata a livello della corteccia cerebrale (per esempio in E). La marcatura per il segmento N-terminale della proteina tau (B) è presente in alcune cellule dell'ippocampo (freccie).

Figura 9. Deposizione di placche di proteina β -amiloide nel cervello Sia l'anticorpo monoclonale anti-APP che l'anticorpo policlonale contro la proteina precursore della β -amiloide evidenziano la presenza di "placche" nella corteccia paracingolare e nel neo-striato in topi di controllo (A) e in maggior numero e di maggiori dimensioni nei topi transgenici anti-NGF (B). In entrambe le figure le frecce puntano alle placche di beta amiloide.

Figura 10. Western blot di estratti di encefalo di topi anti-NGF e topi di controllo L'esperimento è stato ottenuto utilizzando gli anticorpi anti-tubulina (A), anti-tau fosforilata AT8 (B) e anti-proteina precursore dell'amiloide (C). I blots sono rappresentativi di 3 esperimenti in cui sono stati utilizzati almeno 3 topi di controllo e 3 topi transgenici per ogni età analizzata.

Figura 11. Accumulo della proteina tau La frazione insolubile della proteina tau si accumula negli encefali dei topi anti-NGF a 15 mesi di età. La quantità di proteina negli estratti è stata valutata usando

l'anticorpo anti-tubulina (A). I tessuti sono stati estratti in modo sequenziale con i tamponi RAB Hi-salt (B), RIPA (C) e con 70% di acido formico (D). La frazione insolubile di tau rappresentata dalle frazioni estratte dal RIPA e dall'acido formico si accumula nei topi anti-NGF ma non negli estratti da topi di controllo. Le colonne 1 e 2 si riferiscono ai topi di controllo, quelle da 3 a 5 ai topi anti-NGF.

Fig. 12. Depositi di amiloide nella corteccia cerebrale di topi anti-NGF (a,c) e topi di controllo (b) I numerosi depositi extracellulari osservati nella corteccia cerebrale dei topi anti-NGF dimostrano una natura di tipo fibrillare. Barra di ingrandimento in a, b=75 μm ; c=25 μm .

Figura 13. Presenza di placche compatte di amiloide Placche compatte di amiloide sono visibili in topi anti-NGF a 6 mesi di età nella sostanza bianca subcorticale (A) e nella corteccia cerebrale (B). La morfologia delle placche in topi anti-NGF di 15 mesi (C) e' simile a quella di placche evidenziate in sezioni di cervello da pazienti Alzheimer (D). Barra di ingrandimento in A 150 μm ; in B-D = 75 μm .

Figura 14. (a,b) Sezioni della corteccia parietale ed (c) entorinale di topi anti-NGF L'anticorpo NFT200 evidenzia la presenza di tangles (grovigli neurofibrillari) in cellule piramidali (frecce) ed in neuriti distrofici (punta di freccia). d, In sezioni di cervello di topi di controllo non è visibile nessuna marcatura. Barra di ingrandimento=25 μm .

Figura 15. Marcatore di neuroni con anticorpi anti-NFT200 anti-tangles L'anticorpo NFT200 marca neuroni sia in sezioni di encefalo di topi anti-NGF (G) che in sezioni ottenute da encefalo di pazienti colpiti da Alzheimer (H). Barra di ingrandimento: 50 μm .

Figura 16. Progressione temporale della marcatura di neuroni con anticorpi anti-MAP2 Nei topi di controllo, a 2 (A), 6 (C) e 15 (E) mesi di età, la marcatura ottenuta utilizzando l'anticorpo anti-MAP2 e' distribuita per tutta la lunghezza dei dendriti. Nei topi anti-NGF, si osserva una diminuzione nel numero dei dendriti marcati ed una ridistribuzione della proteina all'interno dei dendriti. Questa diminuzione e' progressiva e colpisce la corteccia cerebrale dei topi anti-NGF a 2(B), 6 (D) e 15 (F) mesi di età. Barra di ingrandimento: 100 μ m.

Figura 17. Impregnazione argentica (E,F) L'impregnazione argentica evidenzia la presenza di depositi extracellulari (asterischi) associati a neuriti distrofici (freccie) e formazioni simili a tangles (punta di freccia). Barra di ingrandimento: 50 μ m.

Figura 18. Colorazione per ChAT Colorazione per colinacetil transferasi ChAT del proencefalo basale di topi transgenici anti-NGF c) e di topi di controllo (d). Barra di ingrandimento: 200 μ m.

Figura 19. Marcatura per proteina tau. A 1 mese di età, mAb AT8 marca tutti i neuroni della corteccia entorinale (A) e della corteccia parietale (B) In entrambe le corteccie la marcatura diminuisce a 1.5 mesi di età (C). A 2 mesi di età, i neuroni positivi per AT8 sono presenti solo nella corteccia entorinale (D), mentre solo pochi neuroni sono marcati nella corteccia parietale (F). Nessun neurone è marcato nella corteccia entorinale di topi di controllo (E). A 6 mesi di età, tutti i neuroni della corteccia entorinale (G) e di quella parietale (H) sono AT8-positivi. Nessun neurone positivo è osservabile nella corteccia cerebrale di topi di controllo della stessa età (I). Barra di ingrandimento: 100 μ m.

Figura 20. Marcatura per proteina tau A 15 mesi di età, gli anticorpi AT270 (A,B) e AT8 (C,D) marcano le cellule piramidali della regione CA1 dell'ippocampo di topi anti-NGF. Nei topi di controllo, i due anticorpi marcano solo gli assoni [AT270 (B) e AT8 (D)]. Barra di ingrandimento: 100 μ m.

Figura 21. Marcatura per proteina tau La marcatura ottenuta con mAb AT180 aumenta con l'età nei topi anti-NGF. (E) Corteccia cerebrale ad 1 mese di età, (F) a 6 mesi e a (G) 15 mesi di età. Le frecce puntano ai neuriti distrofici, le punte di freccia evidenziano cellule positive non neuronali. Barra di ingrandimento: 75 μ m.

Figura 22. Marcatura ottenuta con mAb AT270 nella corteccia cerebrale di topi anti-NGF a (A) 1 mese, (B) 1.5 mesi e (C) 2 mesi di età. Nessuna differenza è osservabile in relazione ai topi di controllo. A partire da 6 mesi di età, nei topi anti-NGF appare una marcatura nei neuroni corticali (D). Il numero dei neuroni marcati aumenta nei topi anti-NGF di 15 mesi (E). A 6 e 15 mesi i topi di controllo non mostrano neuroni positivi nella corteccia cerebrale (F). Barra di ingrandimento: 100 μ m.

Figura 23. Atrofia muscolare. Sezioni trasversali dei muscoli prelevati da topi di controllo e topi anti-NGF. Colorazione: ematossilina eosina. M. retto mediale della coscia di un topo di controllo (A) e di un topo transgenico (B). M. gastrocnemio di un topo di controllo (C) e di un topo transgenico (D). M. tibiale anteriore di un topo di controllo (E) e di un topo transgenico (F).

Figura 24. Deposizione di amiloide nel muscolo. La colorazione con Congo Red evidenzia la presenza di depositi di amiloide nei muscoli di topi transgenici (B) rispetto a quelli di controllo (A).

Figura 25. Deposizione di amiloide nel muscolo. L'immunoreattività contro la proteina β -amiloide nei muscoli di topi di controllo "anziani" (A) è completamente assente. Nei topi anti-NGF (B) si assiste ad un aumento della marcatura, evidenziata dal precipitato marrone, a livello del sarcolemma e del citoplasma delle miofibre.

Figura 26. Fosforilazione della proteina tau nel muscolo. L'immunoreattività contro la proteina tau fosforilata nei muscoli di topi di controllo "anziani" (A) è completamente assente. Nei topi anti-NGF si assiste ad un aumento della marcatura, evidenziata dal precipitato marrone, a livello del sarcolemma e del citoplasma delle miofibre (B).

Figura 27. Infiltrazione di macrofagi nel muscolo. Sezioni longitudinali (A) e trasversali (B) di muscoli di topi transgenici anti-NGF "anziani". Fra le miofibre si osserva la presenza di cellule di tipo immunitario, quali i macrofagi (freccie).

Figura 28. Posizione dei nuclei nelle miofibre di topi anti-NGF. In alcune miofibre dei topi "anziani" si osserva la presenza di nuclei posti al centro della cellula (freccie), anziché alla periferia (asterischi).

Figura 29. Test di comportamento di topi anti-NGF. A) Test nocicettivo di topi transgenici anti-NGF e di topi di controllo. B) Test «Open field». C) Test «Rotarod». D) Curve di «orientamento spaziale» per topi anti-NGF (n=10, cerchi pieni) e topi di controllo (n=10, cerchi vuoti) nel test del labirinto radiale. Le barre verticali rappresentano

l'errore standard. Il numero di entrate necessarie per trovare tutti e quattro i pasti è riportata in funzione del tempo. E) Test di mantenimento delle funzioni acquisite, effettuato a 31 giorni dalla fase di apprendimento. F) Test di trasferimento delle nozioni acquisite, effettuato il giorno dopo il test di mantenimento.

Figura 30. Test di discriminazione degli oggetti. Il test di discriminazione degli oggetti evidenzia un difetto nella distinzione degli oggetti nei topi anti-NGF. *, $P < 0.03$.

Esempio 1. Produzione dei topi transgenici anti-NGF e loro caratterizzazione molecolare.

Preparazione del transgene.

L'anticorpo chimerico ricombinante è stato ottenuto per assemblaggio delle sequenze di DNA corrispondente alle regioni variabili murine dell'anticorpo monoclonale anti-NGF Mab α D11 (Ruberti et al. et al., 1993) (Genbank, n° di accesso: L17077/NID g310168, catena pesante e L17078/g310169, catena leggera) con il DNA corrispondente alle regioni costanti delle catene leggere K e pesanti γ 1 umane. Le unità trascrizionali corrispondenti alla catena chimerica leggera e a quella pesante (figura 1A), contenenti in 5' il promotore di Cytomegalovirus ed in 3' il sito di poliadenilazione dell'ormone della crescita bovino (bGH), clonate rispettivamente nei vettori di espressione pcDNAI-NeoVK α D11HuCK e pcDNAI-NeoVH α D11HuCy sono state estratte mediante restrizione enzimatica con gli enzimi KpnI-ApaI e KpnI-XbaI rispettivamente, purificate e microiniettate separatamente o in combinazione nel pronucleo di cellule

uovo di topo del ceppo B6SJL fecondate, secondo metodiche standard descritte ad esempio in Allen et al., 1987. Sono stati ottenuti due progenitori transgenici per la catena leggera (famiglia A, basso produttore e B, alto produttore), due per quella pesante dell'anticorpo (famiglia C, alto produttore e D, basso produttore) e tre per entrambe (doppio transgenico). Questi ultimi progenitori, che esprimono l'anticorpo ad un livello di circa 50 ng/ml, non sono in grado di riprodursi e sono quindi inutilizzabili per il proseguimento delle ricerche.

L'analisi molecolare dei topi transgenici progenitori (famiglie A, B, C, D) è stata effettuata mediante PCR (Figura 1C) o Dot Blot (Figura 1D), su DNA genomico estratto da biopsie ottenute dalla coda, come descritto in Piccioli et al., 1995. L'RNA messaggero è stato estratto secondo il metodo di Chomczynski and Sacchi, 1987 a tempi diversi dalla nascita ed è stato analizzato mediante RNase-protection.

Preparazione del topo anti-NGF.

Al fine di generare animali transgenici per l'anticorpo funzionale, composto da entrambe le catene, i due progenitori transgenici solo per la catena leggera (progenitori A e B) o solo per quella pesante (progenitori C e D) sono stati incrociati in diverse combinazioni (Figura 1B). Solo gli incroci dei progenitori A con D e dei progenitori B con C, che danno rispettivamente famiglia 1 e famiglia 2 di topi eterozigoti doppi transgenici, risultano fecondi e generano animali vitali con una efficienza superiore all'80%.

Caratterizzazione del topo anti-NGF.

I livelli di anticorpo funzionale o delle catene leggera o pesante degli animali transgenici sono stati misurati mediante saggio ELISA (Molnar et al.,1998), utilizzando un anticorpo secondario anti-IgG umane marcato con biotina, dopo diluizione del siero o degli omogenati di cervello (Piccioli et al., 1995) 1:10 in PBS-2% latte in polvere.

I livelli di anticorpo chimerico anti-NGF della famiglia 1 e 2 , misurati nel siero e nel tessuto cerebrale di animali adulti (90 giorni), superano i 100 ng/ml ed i 100 ng/mg, rispettivamente. Nella famiglia 2 i livelli risultano essere circa doppi che nella famiglia 1. Nell'animale appena nato (1 giorno) i livelli di anticorpo sono invece inferiori al limite di detectabilità del saggio (0,1 ng/ml nel siero e 0,1 ng/mg nei tessuti) (Figura 2C).

Gli mRNA specifici per le catene VH e VK chimeriche vengono espressi in diversi tessuti tra cui il cervello, il rene, il cuore, il muscolo, il fegato ed i testicoli. I livelli di mRNA di entrambe le catene sono circa sei volte superiori nell'animale adulto (90 giorni) rispetto al neonato (1 giorno) (Figura 1 E).

Risulta quindi che l'aumento di espressione (1-2000X) dell'anticorpo funzionale anti-NGF osservato nell'animale eterozigote anti-NGF (doppio transgenico), è solo in parte dovuto all'aumento dei livelli di espressione di mRNA.

Sezioni di organo di topi anti-NGF sono quindi state fissate mediante perfusione intracardiaca di paraformaldeide 4% in PBS, raccolte su vetrino, preincubate in siero fetale 10% e BSA 5%, quindi utilizzate per evidenziare mediante immuno-istochimica l'espressione di

Vita e Scienze - Università degli Studi di Padova - Dipartimento di Biologia Animale e Umana

diversi antigeni: in particolare la co-espressione della catena leggera e di quella pesante dell'anticorpo anti-NGF sono state evidenziate mediante anti-human light o heavy chain biotinilate (Amhersham), rivelate da avidina-biotina coniugata con HRP o AP (Elite Standard kits, Vector). La localizzazione a livello cerebrale è mostrata in figura 2A, in figura 2B è evidenziato, mediante immuno-istochimica, che le due catene dell'anticorpo chimerico sono frequentemente co-esprese.

Esempio 2. Knockout fenotipico dell'NGF nel topo transgenico anti-NGF.

La caratterizzazione del fenotipo del topo anti-NGF è stata effettuata a vari livelli: macroscopico, istologico e molecolare. A livello macroscopico, nelle prime tre-quattro settimane di vita i topi transgenici anti-NGF non mostrano anomalità di rilievo, ad esclusione di una diminuzione del peso corporeo di circa il 25% rispetto a corrispondenti topi di controllo (Figura 2 D ed E). In genere, gli esperimenti sono stati effettuati con gruppi di numerosità n=6 animali transgenici anti-NGF con livelli anticorpo anti-NGF compresi tra 50 e 300 ng/ml; come controlli sono stati utilizzati topi transgenici solo per la catena pesante (VH) dell'anticorpo (progenitori C o D), quindi non esprimenti l'anticorpo funzionale.

A livello istologico e molecolare vengono osservate le seguenti differenze rispetto ai topi normali, suddivise per distretto: 1) sistema nervoso centrale e periferico, 2) apparato muscolare e 3) milza.

1) Sistema nervoso centrale e periferico.

Nel telencefalo basale si osserva una riduzione fino al 57% del numero di neuroni positivi per l'acetil-trasferasi (ChAT) ed una riduzione del livello di espressione, mentre fino al 70% in meno dei neuroni è osservabile nell'ippocampo. Inoltre le cellule appaiono morfologicamente più piccole. Per quanto riguarda il sistema nervoso periferico, i gangli cervicali superiori risultano fino al 45% più piccoli del controllo; anche in questo caso le cellule costituenti appaiono morfologicamente più piccole (Figura 3 A-B). L'aspetto morfologico ed istologico degli encefali di topi che esprimono l'anticorpo ricombinante anti-NGF è stato analizzato in topi transgenici con un'età compresa tra 15 e 18 mesi (animali «anziani») in combinazione con la presenza di marcatori fenotipici di malattie neurodegenerative, quali: «neuronal loss» e apoptosi, sintesi di colin-acetiltransferasi (ChAT) (Figura 3 A,B), misurata mediante immuno-istochimica con antisiero anti-ChAT (Chemicon), rapporto proteina tau fosforilata e non fosforilata (misurate mediante immuno-istochimica o western blot con antisieri specifici), presenza di proteina β -amiloide e del precursore della proteina amiloide APP (Amiloid Precursor Protein) fosforilata (misurati mediante immuno-istochimica con antisieri specifici). La numerosità dei gruppi utilizzati per gli esperimenti, dove non altrimenti indicata, è stata pari a n=6 transgenici anti-NGF con livelli anticorpo anti-NGF transgenico compresi tra 50 e 300 ng/ml; come controlli sono stati utilizzati topi transgenici solo per la catena pesante (VH) dell'anticorpo (progenitori C o D), quindi non esprimenti l'anticorpo funzionale.

I risultati ottenuti possono essere riassunti nei seguenti punti:

(a) Dilatazione dei ventricoli cerebrali (Figura 4). La gravità della dilatazione ventricolare si accompagna ad una marcata atrofia della corteccia cerebrale (Figura 5) e dell'ippocampo (Figura 6).

(b) Neurodegenerazione e perdita neuronale. E' possibile visualizzare cellule apoptotiche nei topi con più gravi danni a livello cerebrale, come evidenziato dalla metodica TUNEL (Figura 7). Fenomeni apoptotici sono indice di una progressiva morte cellulare.

(c) Diminuzione della sintesi di colin-acetiltransferasi (ChAT), (Figura 3 A-B e I-L) specialmente nel telencefalo basale. In particolare non si osservano neuroni positivi per questo marcatore nel nucleo del setto mediale in nessuno degli animali analizzati. L'espressione, in rapporto a quella osservata in topi transgenici più giovani (2-3 mesi di età), è diminuita. Una inferiore espressione si osserva anche a carico dei due recettori dell'NGF TrKA (Figura 3 E-F) e p75 nel telencefalo basale (Figura 3 G-H). In particolare, la diminuzione delle cellule positive per TrKA è più consistente rispetto a quella per p75.

(d) Aumento della fosforilazione di proteina tau (Figura 8). Utilizzando anticorpi specifici contro il segmento N-terminale della proteina tau [Alz-50 (Wolozin et al., 1986)] (Figura 8A e 8B), contro la proteina tau non fosforilata [anti-Tau 1(Grundke-Iqbal et al., 1986)] (Figura 8C e 8D) e contro lo stesso epitopo della proteina tau fosforilata [mAb AT-8 (Greenberg e Davies, 1990)] (Figura 8E e 8F), è stato evidenziato mediante immuno-istochimica, un consistente aumento generalizzato della sintesi di tau ma, soprattutto della sua componente fosforilata. Gli anticorpi utilizzati marcano neuroni corticali che

Pertanto l'alterazione a livello della proteina del citoscheletro tau precede le alterazioni osservabili a livello della proteina amiloide. Gli esperimenti inoltre evidenziano la presenza di tau insolubile, che potrebbe far parte di quella componente che forma i PHF (paired helical filaments) che costituiscono le inclusioni intracellulari ed i depositi extracellulari nel morbo di Alzheimer. I risultati evidenziano anche un alterato processamento della proteina amiloide.

La presenza di placche di amiloide è stata evidenziata utilizzando un anticorpo contro la proteina precursore dell' amiloide. Gli esperimenti sono stati effettuati sia usando tecniche di immunisto chimica che di Western blot (si veda sopra). I risultati hanno evidenziato che, a quindici mesi di età, placche di amiloide sono presenti sia nella corteccia cerebrale che nell'ippocampo di topi anti-NGF (Fig.12). Queste placche occupano una parte significativa della superficie della corteccia entorinale con un valore pari al 21% della superficie rispetto ad una percentuale pari a 0.5% negli topi di controllo. In altre regioni della corteccia cerebrale la percentuale di superficie occupata da placche di amiloide è pari al 10% nei topi anti-NGF, mentre è uguale al 0.1% nei topi di controllo. Nell'ippocampo dei topi anti-NGF la percentuale è uguale al 4%, mentre è pari al 0.1% nei topi di controllo.

La distribuzione delle placche, e la loro morfologia, nei topi anti-NGF è del tutto paragonabile con quelle osservate in sezioni di cervello di pazienti Alzheimer (Fig. 13). Da questi dati si conclude che nei topi anti-NGF si osserva una elevata deposizione extracellulare di amiloide

in formazioni a placca simili, nella morfologia e nella distribuzione, a quelle osservate in sezioni di cervello umano i soggetti colpiti dal morbo di Alzheimer.

(e) Presenza di inclusioni intracellulari (tangles) in neuroni di topi anti-NGF. La presenza di inclusioni intracellulari (tangles) in sezioni di encefalo di topi anti-NGF è stata evidenziata utilizzando un anticorpo, mAb NFT200, che è in grado di evidenziare tangles in sezioni da encefalo di pazienti colpiti da Alzheimer. MAb NFT200 ha marcato molti neuroni distribuiti in tutto l'encefalo di topi anti-NGF (Fig. 14a-c), ma non in animali di controllo Fig. 14d. L'anticorpo ha evidenziato la presenza di inclusioni intracellulari anche in neuriti distrofici. Il paragone fra la distribuzione delle tangles in topi anti-NGF e quella osservabile in sezioni cervello di pazienti Alzheimer è visibile nella figura 15.

L'anticorpo MAb NFT200 evidenzia, nell'encefalo di topi anti-NGF, delle formazioni simili a quelle osservate in sezioni di cervello umano. Questa caratteristica, indispensabile nell'uomo per avere una conferma della diagnosi di malattia di Alzheimer, non era mai stata evidenziata prima in altri modelli animali tendenti a riprodurre parzialmente questa patologia.

(f) Alterazioni della distribuzione della proteina associata ai microtubuli MAP-2. La proteina associata ai microtubuli (MAP-2) fa parte di quel complesso di proteine che formano il citoscheletro dei neuroni. Le alterazioni a livello di questa proteina sono state messe in evidenza usando l'anticorpo anti-MAP-2. A 1 e 1.5 mesi di età la distribuzione della proteina MAP-2 nei neuroni della corteccia nei topi

transgenici anti-NGF è simile a quella osservata nei topi di controllo della stessa età. A 2 mesi di età, nei topi di controllo la marcatura per MAP-2 è distribuita per tutta la lunghezza dei dendriti (Fig. 16A). A questa età, nei topi anti-NGF si osserva una diminuzione del numero dei dendriti marcati e una redistribuzione della marcatura lungo i dendriti (Fig. 16B). A 6 e 15 mesi di età, il numero dei dendriti continua a diminuire nei topi anti-NGF. Nei dendriti di questi animali si osserva anche un'evidente redistribuzione della marcatura, che appare localizzata nella parte prossimale dei dendriti. (Fig. 16D,F). Nei topi di controllo di età corrispondente la marcatura per MAP-2 rimane distribuita per tutta la lunghezza del dendrita (Fig. 16C,E).

Da questi risultati si può dedurre che la deprivazione da NGF determina un'alterazione della distribuzione delle proteine del citoscheletro dei neuroni corticali. Questa alterazione potrebbe far parte di quei fenomeni neurodegenerativi che portano all'instaurarsi della malattia di Alzheimer.

(g) Impregnazione argentica di encefali di topi anti-NGF. per questi esperimenti e' stata utilizzata una tecnica di impregnazione argentica (metodo di Bielschowsky) precedentemente utilizzata per evidenziare placche neuritiche extracellalari e tangles in sezioni di encefalo di pazienti Alzheimer.

Nei topi anti-NGF questa tecnica ha consentito di evidenziare la co-esistenza di neuriti distrofici e di materiale fibroso extracellulare raggruppato sotto forma di placche (Fig. 17E,F). Queste formazioni sono evidenti in topi di 6 e 15 mesi di età.

L'impregnazione argantica è una tecnica istologica che ha consentito di evidenziare la presenza di placche di materiale depositato extracellalarmente e di neuriti distrofici in modo indipendente dalle tecniche immunostochimiche. Inoltre, questa tecnica ha permesso di evidenziare la co-esistenza di queste due alterazioni. I tentavi di evidenziare queste alterazioni in altri modelli animali per la malattia di Alzheimer sono falliti.

(h) Progressione temporale della neuropatologia in topi anti-NGF. Sono stati eseguiti esperimenti per valutare l'insorgenza di alterazioni nei diversi markers fenotipici. Questa progressione temporale è riassunta di seguito e nella tabella 2:

1. La diminuzione di neuroni positivi per la colin-acetiltransferasi (ChAT), evidenziata precedentemente (Ruberti et al., 2000), continua dopo i 2 mesi di età e raggiunge un plateau a 6 mesi di età, dove si osserva una riduzione del numero di neuroni positivi nel nucleo del setto mediale pari al 90% (Fig. 18C,D).

2. La determinazione della distribuzione somatodendritica della proteina tau nel suo stato iperfosforilato è stata eseguita con diversi anticorpi e, nei topi anti-NGF, ha evidenziato che:

- a 2 mesi di età solo la corteccia entorinale presenta alterazioni evidenziate con mAb AT8 (Fig. 19),
- queste alterazioni si estendono ad altre regioni della corteccia cerebrale e all'ippocampo (Fig 19 e Fig. 20) a partire da 6 mesi di età,
- queste alterazioni sono evidenziate anche da altri anticorpi, diversi da AT8, cioè da mAbs AT180 e AT270.

3. L'anticorpo AT8, utilizzato in associazione a tecniche di estrazione, evidenzia che la maggior parte della proteina tau estratta dagli encefali di topi anti-NGF e' di tipo insolubile.

4. Le alterazioni citoscheletriche non sono solo a livello della proteina tau ma anche a livello della proteina MAP-2 ed incominciano a 2 mesi di età.

5. Le inclusioni tangle-like sono presenti solo a 15 mesi di età, mentre i neuriti distrofici vengono evidenziati già a partire da 6 mesi.

6. La frammentazione di DNA si osserva solo a 15 mesi di età.

In conclusione i topi anti-NGF presentano una progressione temporale della neurodegenerazione che parte dal deficit colinergico e dalle alterazioni a livello di alcune proteine del citoscheletro. La progressione spaziale della patologia è simile a quanto osservato in encefali da pazienti Alzheimer.

Segue tabella 2

Tabella 2

MARCATORI FENOTIPICI	ZONE CEREBRALI	ETA' (MESI)				
		1	1.5	2	6	15
Riduzione di ChAT		-	-	+	++	++
Presenza di tau iperfosforilata nel compartimento somatodendritico						
AT180	Corteccia entorinale	-	-	-	+	++
	Corteccia parietale	-	-	-	+	++
	Corteccia occipitale	-	-	-	+	++
	Ippocampo	-	-	-	-	-
AT270	Corteccia entorinale	-	-	-	+	++
	Corteccia parietale	-	-	-	+	++
	Corteccia occipitale	-	-	-	+	++
	Ippocampo	-	-	-	-	+
AT8	Corteccia entorinale	-	-	+	++	++
	Corteccia parietale	-	-	-	+	++
	Corteccia occipitale	-	-	-	+	++
	Ippocampo	-	-	-	+	++
Tau insolubile		ND	ND	ND	ND	++
Localizzazione subcellulare anormale di MAP-2		-	-	+	++	++
Tangles neurofibrillari		-	-	-	-	++
Placche amiloidi		-	-	-	+	++
Inclusioni rivelate per Impregnazione argenticca		-	-	-	+	++
Neuriti distrofici*	Corteccia entorinale	-	-	-	++	++
	Corteccia parietale	-	-	-	+	++
	Corteccia occipitale	-	-	-	+	++
	Ippocampo	-	-	-	-	-
Frammentazione del DNA	Corteccia cerebrale	-	-	-	-	+
	Proencefalo basale	-	-	-	-	-

Il simbolo + indica una misura qualitativa di ciascun marcatore fenotipico. ND, non effettuato.

* Come rivelato da impregnazione argenticca e immunostochimica con anticorpi anti-tau iperfosforilata e "tangles".

Pertanto l'analisi di questi topi ha evidenziato come la patologia neurodegenerativa a livello di encefalo sia preceduta da una precoce (a 2 mesi) iperfosforilazione di tau e deposizione di amiloide nel muscolo scheletrico del dorso e degli arti inferiori. Il muscolo scheletrico potrebbe pertanto essere utilizzato come elemento di diagnosi precoce della malattia neurodegenerativa nell'uomo. E' da ricordare che è già noto che, nell'uomo, il morbo di Alzheimer è associato ad una miosite a corpi inclusi (Inclusion Body Myositis).

In conclusione, i topi transgenici che esprimono l'anticorpo anti-NGF ricapitolano a livello del Sistema Nervoso Centrale e Periferico molte delle alterazioni patologiche tipiche di malattie neurodegenerative, in particolare della malattia di Alzheimer.

2) Apparato muscolare.

I topi analizzati (n=15) di età compresa tra i 45 e 60 giorni, mostrano a livello macroscopico un'andatura ondeggiante, dovuta ad una anormale posizione delle zampe posteriori e all'appoggio sulla punta delle dita, e sviluppano spesso scoliosi della colonna vertebrale. L'analisi anatomica mostra una riduzione dei muscoli scheletrici longitudinali della schiena, dei flessori e degli adduttori delle zampe posteriori, caratteristica non osservabile in altri muscoli, per esempio dei corrispondenti muscoli delle zampe anteriori. Alcuni deficit sono stati meglio caratterizzati e sono descritti nei seguenti punti in dettaglio:

a) distrofia muscolare, caratterizzata dal punto di vista morfologico ed istologico. L'atrofia delle fibre muscolari è presente, in tutti gli animali analizzati (n= 15), a livello dei muscoli che consentono i movimenti della colonna vertebrale e coadiuvano la stabilità delle connessioni fra vertebra e vertebra (m. lunghissimo del dorso e mm. intervertebrali, rispettivamente). Inoltre, in tutti gli animali, la riduzione del diametro delle fibre muscolari (fino al 50%) è osservabile nel 70% delle fibre: nei muscoli adduttori (m. retto mediale della coscia, mm. grande e piccolo adduttore), nei muscoli flessori della coscia (mm. ischiotibiali esterno, medio e interno) ed estensori del metatarso (m. gastrocnemio e m. soleo). L'atrofia non è invece presente a livello dei

muscoli flessori del metatarso (m. tibiale anteriore e mm. estensori delle falangi), ed è molto meno evidente nei muscoli estensori degli arti anteriori (m. tricipite brachiale). Tutte queste differenze vengono mostrate nella Figura 23. Inoltre tutte le fibre muscolari colpite da atrofia presentano anche una marcata vacuolizzazione (Figura 23 B-E) e una più intensa colorazione per l'ematosilina/eosina.

b) scoliosi, presente in alcuni animali ($n < 6$), associata in alcuni casi con uno sviluppo incompleto dei corpi vertebrali.

c) atrofia muscolare, tipizzata a livello molecolare come segue:

c.1) riespressione del recettore per l'NGF a bassa affinità (p75).

E' particolarmente evidente in alcune cellule muscolari che presentano alterazioni nella distribuzione dei recettori nicotinici a livello delle giunzioni neuromuscolari.

c.2) diminuzione del numero delle terminazioni nervose peptidergiche a livello di giunzioni neuromuscolari. Questa diminuzione è stata evidenziata con anticorpi contro il peptide "calcitonin gene-related peptide" [CGRP (Gibson et al., 1984)].

c.3) assenza dell'aggregazione dei recettori per l'acetilcolina presenti nella membrana plasmatica delle cellule muscolari ed evidenziati dal legame irreversibile della alfa-bungarotossina (Changeux, 1991), dovuta ad una mancata innervazione della fibra muscolare. La distribuzione delle cellule muscolari che presentano questa alterazione conferisce ai muscoli dei topi transgenici un caratteristico "pattern" a mosaico.

c.4) aumento dell'immunoreattività per la distrofina, evidenziabile nelle stesse cellule che presentano le alterazioni molecolari sopra descritte, mediante immuno-istochimica con l'anticorpo D-8043 (Sigma). La distrofina è una proteina del citoscheletro della cellula muscolare coinvolta nella contrazione e nell'aggregazione dei recettori colinergici. E' noto che un aumento della sintesi di distrofina avviene in coincidenza con la denervazione del muscolo.

c.5) alterato metabolismo dell'ATPasi dovuto al mancato effetto trofico da parte del nervo.

c.6) marcata deposizione di sostanza amiloide, evidenziata da una caratteristica marcatura citoplasmatica ad anello con Congo Red (Figura 24 A-B). La presenza di amiloide, ed in particolare di β -amiloide, è stata evidenziata anche tramite immuno-istochimica contro la proteina precursore della β -amiloide (Figura 25 A-B) in topi anziani.

c.7) proteina tau fosforilata nei muscoli dei topi anziani (di età compresa tra 15 e 18 mesi) Figura 26 A-B.

c.8) presenza di numerose fibre muscolari con nuclei localizzati in posizione centrale anziché al di sotto del sarcolemma in topi anti-NGF «anziani» (Figura 28). L'istologia mette in evidenza una infiltrazione di cellule di origine immunitaria, probabilmente macrofagi, fra le fibre muscolari (Figura 27 A-B).

La presenza di depositi di β -amiloide e di proteina tau iperfosforilata ed inoltre dei nuclei posti in posizione centrale e della infiltrazione macrofagica, correla con quanto osservato nella miosite a

corpi inclusi (inclusion body myositis, IBM), patologia strettamente in relazione con la malattia di Alzheimer.

3) Milza.

A livello anatomico la localizzazione dell'innervazione simpatica è sparsa nel centro germinale e nella zona marginale, anziché nelle vicinanze dell'arteria centrale, come nei topi di controllo. Il recupero degli splenociti vitali è ridotto di circa un ordine di grandezza ($2-3 \times 10^6$ vs. $2-3 \times 10^7$ dei controlli) nei topi transgenici anti-NGF, come osservato mediante citometria a flusso. Funzionalmente si può osservare una riduzione del numero di linfociti IgG positivi ed un discreto aumento di linfociti IgD positivi, come misurato dopo incubazione (30', 4°C) degli splenociti con anticorpi primari marcati con FITC anti-IgG (Sigma), IgM, IgA, IgD di topo (Pharmingen) ed analisi con Coulter Epics Elite Esp Flow Cytometer a 488 nm. Inoltre, nella polpa rossa può essere evidenziata frammentazione del DNA, che indica apoptosi in accordo con il ridotto recupero di splenociti vitali.

Esempio 3. Analisi del comportamento di topi transgenici anti-NGF.

E' stata effettuata su animali (n=6) di età compresa tra 12 e 18 mesi, selezionando animali senza evidenti anomalie di andatura. Sono state riscontrate le seguenti anomalie rispetto agli animali di controllo riassunte in Figura 29:

- aumento del tempo di latenza per la sensibilità al calore, che passa da 3" nei topi di controllo a 16" nei topi anti-NGF, misurato secondo il saggio nocicettivo della "piastra calda", come descritto in Eddy et al., 1953;

- orientamento spaziale: i topi anti-NGF compiono un numero più alto di errori durante la fase di apprendimento nei primi tre giorni (working memory learning), le due curve di apprendimento differiscono infatti in modo significativo (test di RMANOVA a due vie, $p < 0,05$) tuttavia il livello finale di apprendimento non differisce da quello dei topi di controllo, come misurato nel test del «labirinto radiale», effettuato come segue: gli animali furono posti in labirinto radiale ad 8 braccia e lasciati liberi di nutrirsi per 5' e di familiarizzare con il labirinto per due giorni (pre-training). Per la prova, le stesse quattro braccia furono riempite di cibo ogni giorno: all'inizio di ogni prova, i topi furono lasciati al centro del labirinto, liberi di esplorarlo: il test fu fatto terminare a cibo terminato, o quando furono rilevate 25 entrate nelle braccia del labirinto: le prove furono ripetute due volte al giorno per 14 giorni, misurando gli errori commessi (errori di memoria a breve e lungo termine) ed il tempo utilizzato. Il livello iniziale e finale di apprendimento fu misurato dal numero medio di errori commessi nei primi tre giorni e negli ultimi tre.

- capacità di mantenimento delle nozioni acquisite. I topi anti-NGF non mantengono le nozioni acquisite a 31 giorni dalla fase di apprendimento, come misurato nello stesso test del «labirinto radiale». Le curve di apprendimento furono comparate con il test di ANOVA a due vie (trattamento x tempo), e la significatività delle differenze verificata mediante T-test.

- deficit della capacità di trasferimento dell'insegnamento ad un'altra situazione, come misurato mediante test del «labirinto radiale», utilizzando uscite riempite di cibo diverse da quelle utilizzate durante la

fase di apprendimento. I topi anti-NGF mostrano un chiaro deficit di apprendimento ($p < 0,01$ in test di RMANOVA a due vie) rispetto ai controlli, anche dopo 5 giorni di apprendimento. Le differenze sono dovute principalmente ad un numero più alto di errori di memoria a breve termine (T-test, $p < 0,006$).

- test di memoria a breve termine (test di discriminazione degli oggetti): Per questo test, i topi hanno esplorato 2 cubi bianchi per 10 min. Quindi, uno dei cubi è stato rivestito con carta a scacchi bianchi e neri. Dopo un'ora dalla conclusione del primo trial, i topi sono stati rimessi in contatto con i cubi e gli è stato consentito di esplorarli per ulteriori 10 min. I topi transgenici anti-NGF non sono stati in grado di distinguere fra i due cubi rivestiti con carta di colore diverso (Fig. 30). Pertanto, i topi anti-NGF mostrano una diminuzione della memoria a breve termine, non essendo in grado di memorizzare e di distinguere i due cubi di colore diverso.

Esempio 4. Reversibilità della distrofia muscolare in topi anti-NGF mediante somministrazione locale di NGF.

Tutti gli esperimenti sono stati effettuati in topi a partire dal 45 giorno di età, quando il tasso dell'anticorpo anti-NGF nel siero sta per raggiungere il livello massimo (osservato a 60 giorni). L'NGF è stato somministrato localmente con metodi diversi: (a) per iniezione intramuscolare di NGF, (b) per mezzo di un vettore virale ricombinante (adenovirus) codificante per il cDNA dell'NGF o (c) l'impianto di fibroblasti che secernono NGF. Tutte le vie di somministrazione hanno previsto l'iniezione o l'impianto nel muscolo gastrocnemio, uno dei

muscoli scheletrici colpiti da distrofia muscolare. Le iniezioni e gli impianti sono stati effettuati nella zampa destra, mentre il muscolo gastrocnemio della zampa sinistra è stato utilizzato come controllo. a) L'NGF è stato iniettato sotto forma di pellet, costituito da NGF miscelato a diazocellulosa in tampone borato a pH 8.0 per 72 ore e da una successiva neutralizzazione con glicina ad una concentrazione saturante (Hendry, 1982). Questo metodo consente la precisa localizzazione ed il rilascio lento di questa neurotrofina. Sono state utilizzate diverse concentrazioni di NGF comprese in un range fra i 100 µg e 2 mg per animale. Per la somministrazione di cDNA secondo il metodo b), 10 µl di una soluzione del vettore adenovirale pari a 10^7 pfu/ml sono stati iniettati nel muscolo gastrocnemio. Negli animali di controllo è stato iniettato un adenovirus ricombinante contenente il gene reporter Lac Z di Escherichia coli. Sia in questo caso che in quello dell'impianto di fibroblasti (vedi dopo), la produzione di NGF è stata costante per almeno 1 mese, consentendo l'osservazione di una reversibilità del fenotipo.

Secondo il metodo c) sono stati impiantati nel muscolo, fibroblasti modificati geneticamente per secernere NGF tramite l'infezione con un vettore retrovirale codificante per il cDNA di questa neurotrofina, secondo il metodo descritto da Gage et al. (1990). Questo ha consentito di raggiungere una produzione in situ di NGF pari a 100 ng/ 10^6 cellule/giorno. I fibroblasti sono stati iniettati dopo risospensione in soluzione fisiologica sterile alla concentrazione pari a 2×10^5 cellule/µl. Il volume di iniezione è stato pari a 10 µl/animale.

Per verificare l'effetto della somministrazione di NGF, gli animali sono stati sacrificati dopo 7, 15 e 30 giorni dal momento dell'iniezione. Il muscolo iniettato e quello controlaterale sono stati prelevati e analizzati con tecniche istologiche ed immunoistochimiche per verificare l'attenuazione della distrofia e il ristabilirsi della normale innervazione. Si è potuto constatare che, in tutti gli animali iniettati, il diametro delle fibre muscolari è ritornato a valori simili a quelli degli animali di controllo. Inoltre, la loro morfologia e l'innervazione colinergica e peptidergica ha assunto un aspetto normale.

Per quanto riguarda il ristabilirsi del fenotipo colinergico nel telencefalo basale, sono stati utilizzati due differenti approcci. In una prima serie di esperimenti, è stato utilizzato, dopo anestesia, l'impianto di minipompe che rilasciano NGF. Un capillare in gomma è stato inserito nel ventricolo laterale e quindi collegato con una minipompa osmotica collocata in una «tasca» dello strato sottocutaneo. Questa pompa è stata riempita con NGF (30 - 100 μg) diluito nella soluzione fisiologica di Ringer-Locke. Un altro gruppo di animali è stato trattato con un impianto di fibroblasti modificati geneticamente per la secrezione di NGF. I fibroblasti sono stati iniettati nel ventricolo laterale alla concentrazione di 2×10^5 cellule/ μl . Il volume di iniezione è stato pari a 1.5 μl /animale. Questo secondo metodo ha consentito di verificare, tramite E.L.I.S.A., una produzione di NGF costante per 4 settimane dopo l'impianto. L'analisi della espressione di colinacetiltransferasi (ChAT) nei nuclei del telencefalo basale e l'analisi del comportamento

di questi topi ha permesso di osservare la reversibilità del fenotipo osservato nei topi anti-NGF a livello del sistema colinergico.

Nell'insieme questi risultati confermano che la somministrazione di NGF è in grado di correggere il deficit muscolare e colinergico osservati nei topi anti-NGF.

BIBLIOGRAFIA

- Allen, ND, et al. (1987) In Mammalian development: A practical approach, M. Monk, ed . (Washington DC: IRL Press) pp 217-234.
- Baron P, et al. (1994). Muscle and Nerve 17: 276-284.
- Boissiere F, et al. (1997). Exp Neurol 145: 245-252.
- Borchelt DR, et al. (1997). Neuron 19:939-945.
- Brion JP, Tremp G, Octave JN (1999). Am J Pathol 154:255-270.
- Changeux JP, Duclert A, Sekine S (1992). NY Acad Sci 657:361-378.
- Chomczynski, P, and Sacchi, N (1987). Anal. Biochem. 162:156-159.
- Citron M, et al. (1997). Nat Med 3: 67-72.
- Connor B, Dragunow M (1998) Brain Res Rev 27: 1-39.
- Crowley, C, et al. (1994). Cell 76:1001-1011
- Davies AM (1992). In Sensory Neurons: Diversity, Development and Plasticity, S. Scott, ed. (Oxford: Oxford University Press), pp 194-214.
- Eddy, NB, and Leimbach, D (1953) J. Pharmacol. Exp. Ther. 107: 385-396.

RIVENDICAZIONI

1. Animale mammifero non umano transgenico per un anticorpo anti-NGF (NGF: Nerve Growth Factor).
2. Animale secondo la rivendicazione 1 in cui l'anticorpo anti-NGF blocca il legame dell'NGF ai suoi recettori.
3. Animale secondo la rivendicazione 1 che esprime l'anticorpo anti-NGF solo nell'età adulta.
4. Animale transgenico secondo la rivendicazione 3 che esprime l'anticorpo anti-NGF a livelli misurabili nel siero compresi tra 50 e 500 ng/ml.
5. Animale secondo la rivendicazione 1 dove l'anticorpo anti-NGF e' il monoclonale α D11.
6. Animale secondo la rivendicazione 5 dove l'anticorpo α D11 e' chimerico.
7. Animale secondo la rivendicazioni 6 dove l'anticorpo chimerico e' umanizzato.
8. Animale secondo la rivendicazione 1 appartenente al genere murino.
9. Animale secondo la rivendicazione 8 appartenente alla razza BS6JL.
10. Animale transgenico secondo la rivendicazione 1 che esprime almeno una delle patologie comprese nel seguente gruppo:
 - sindromi neuro-degenerative
 - atrofia/distrofia muscolare
 - alterazione delle sottopopolazioni linfocitarie e morte cellulare nella milza
11. Animale transgenico secondo la rivendicazione 10 in cui la sindrome neurodegenerativa presenta almeno uno dei marcatori

anatomici, o istologici, o molecolari, o fenotipici compresi nel seguente gruppo:

- dilatazione dei ventricoli cerebrali
- atrofia della corteccia cerebrale e/o totale scomparsa dell'ippocampo,
- perdita e/o apoptosi neuronale,
- deposizione di placche di proteina β -amiloide nel SNC,
- deficit cognitivi caratterizzati da perdita della memoria a lungo/breve termine,
- iperfosforialzione della proteina tau,
- patologia neurofibrillare.

12. Animale secondo la rivendicazione 11 dove almeno uno dei marcatori anatomici o istologici compresi nel seguente gruppo:

- dilatazione dei ventricoli cerebrali
- atrofia della corteccia cerebrale
- perdita neuronale

sono presenti ad un livello superiore a quello degli animali utilizzati come controllo.

13. Animale transgenico secondo la rivendicazione 10 in cui l'atrofia/distrofia muscolare è accompagnata a livello muscolare, da almeno uno dei marcatori anatomico o istologico o molecolari o fenotipici compresi nel seguente gruppo:

- deposizione di placche di proteina β -amiloide,
- iperfosforilazione della proteina tau,
- infiltrazione di cellule infiammatorie.

14. Animale transgenico secondo la rivendicazione 13 in cui la comparsa di una iperfosforilazione di tau e/o deposizione di amiloide nel

muscolo scheletrico del dorso e/o degli arti inferiori è precoce rispetto alla comparsa di marcatori neurologici.

15. Metodo di monitoraggio della comparsa di una iperfosforilazione di tau e/o deposizione di amiloide nel muscolo scheletrico del dorso e/o degli arti inferiori di un soggetto per una diagnosi precoce di malattie neurodegenerative.

16. Cellule derivate dall'animale transgenico secondo la rivendicazione 1.

17. Uso delle cellule secondo la rivendicazione 16 per la selezione di molecole attive nelle patologie neurodegenerative.

18. Uso delle cellule secondo la rivendicazione 16 per la selezione di molecole attive nelle patologie muscolari.

19. Metodo per la preparazione di un animale transgenico non umano secondo la rivendicazione 1 che comprende essenzialmente le fasi di:

a) preparazione di una linea progenitrice animale non umana, transgenica per la catena leggera dell'anticorpo monoclonale anti-NGF e di una linea progenitrice animale non umana, transgenica per la catena pesante dell'anticorpo anti-NGF,

b) incrocio delle due linee animali transgeniche progenitrici

c) selezione della prole.

20. Metodo secondo la rivendicazioni 19 dove la fase a) consiste essenzialmente nell'introduzione dell'unità trascrizionale contenente il transgene codificante per la catena leggera dell'anticorpo anti-NGF e dell'unità trascrizionale contenente il transgene codificante per la catena pesante dell'anticorpo anti-NGF, separatamente, in diversi oociti

fecondati e nella selezione di progenitori transgenici per uno o per l'altro transgene.

21. Uso dell'animale transgenico secondo la rivendicazione 1 come modello per lo studio delle patologie legate ad un deficit di NGF.

22. Uso dell'animale transgenico secondo la rivendicazione 21 dove tale deficit è dovuto alla presenza di auto-anticorpi anti-NGF.

23. Uso dell'animale transgenico la rivendicazione 1 come modello per lo studio delle sindromi neurodegenerative.

24. Uso dell'animale transgenico secondo la rivendicazione 23 dove la sindrome neurodegenerativa è la malattia di Alzheimer.

25. Uso dell'animale transgenico secondo la rivendicazione 1 come modello per lo studio delle patologie dell'apparato muscolare.

26. Uso dell'animale transgenico secondo la rivendicazione 1 per la selezione di sostanze efficaci nella cura di patologie comprese nel seguente gruppo:

- sindromi neurodegenerative
- atrofia/distrofia muscolare

27. Uso dell'animale transgenico della rivendicazione 26 dove la sindrome neurodegenerativa è la malattia di Alzheimer.

28. Uso dell'NGF (Nerve Growth Factor), o di suoi frammenti peptidici, per la preparazione di composizioni farmaceutiche per il trattamento di patologie muscolari.

29. Uso dell'NGF secondo la rivendicazione 28 dove l'NGF viene fornito in una delle seguenti forme:

- NGF naturale
- NGF ricombinante

- NGF sintetico
- NGF secreto da impianto di cellule geneticamente ingegnerizzate
- NGF codificato da vettori virali.

30. Uso dell'NGF secondo la rivendicazione 29 dove tale trattamento avviene per somministrazione locale.

31. Composizioni farmaceutiche comprendenti NGF (Nerve Growth Factor) per la terapia delle patologie muscolari.

Roma, - 5 GIU. 2000

p.p.: S.I.S.S.A. Scuola Internazionale Superiore di Studi Avanzati

ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

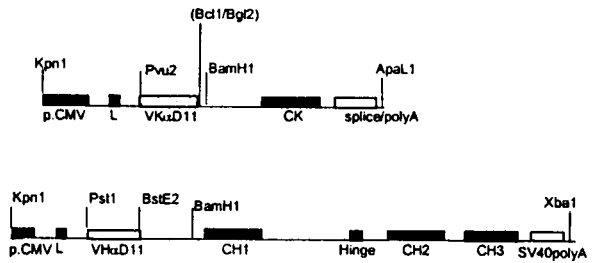
UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'istr. 820 B) OC

Olga Capasso

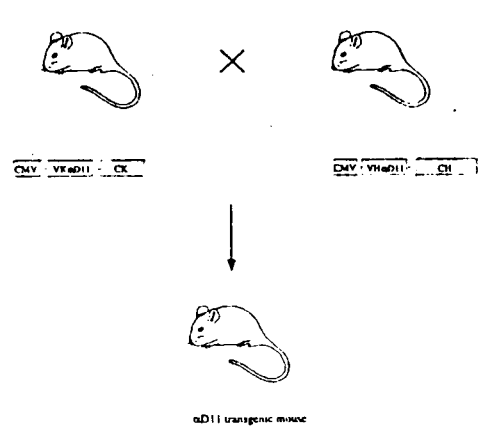
ING. BARZANO & ZANARDO ROMA SPA



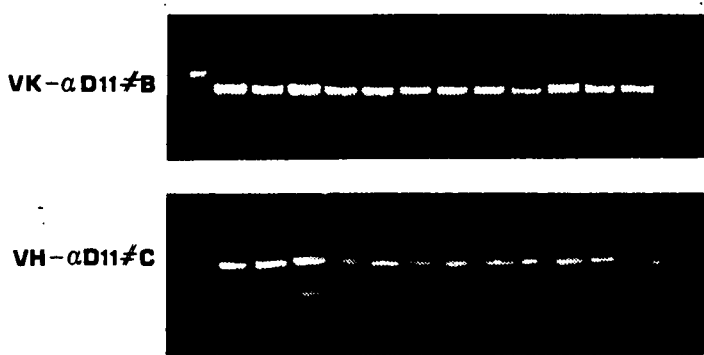
A



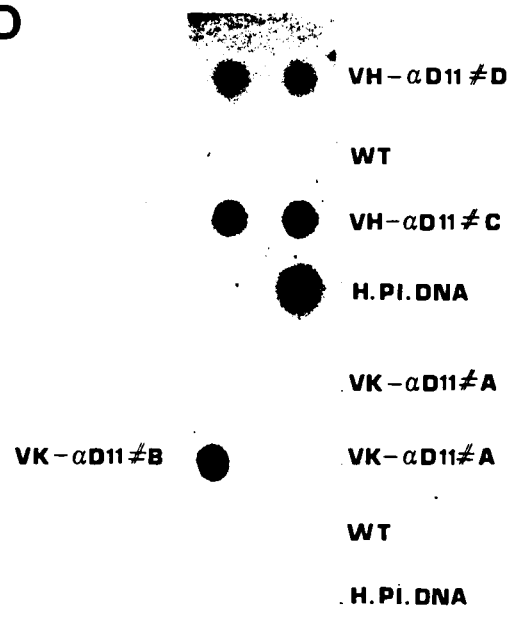
B



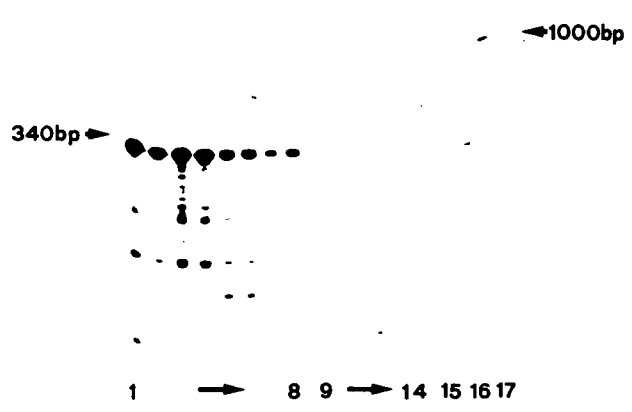
C



D



E



F

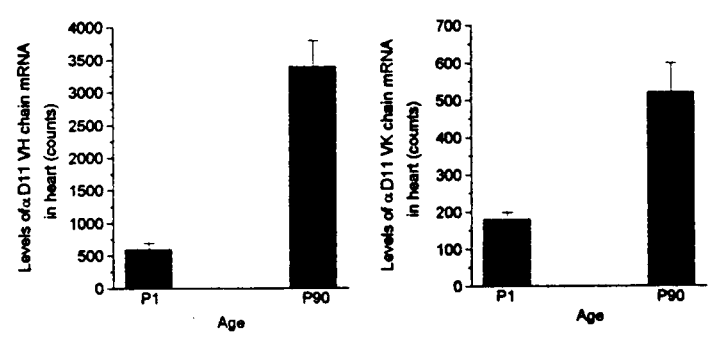


FIG. 1

d.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

Olga Capasso
UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)



RM2000 A 000306

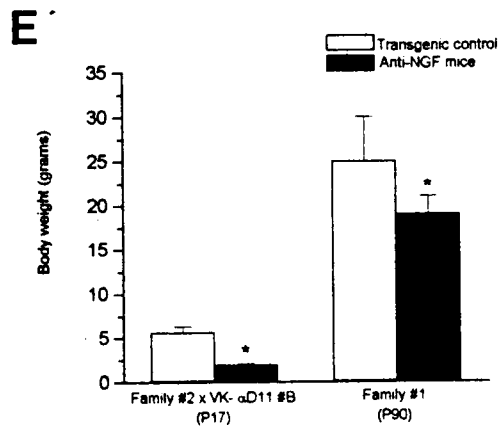
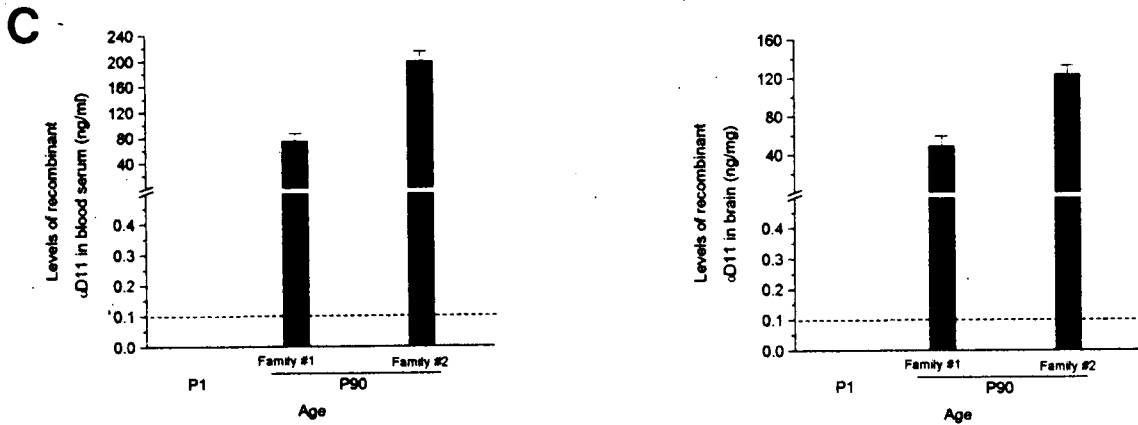
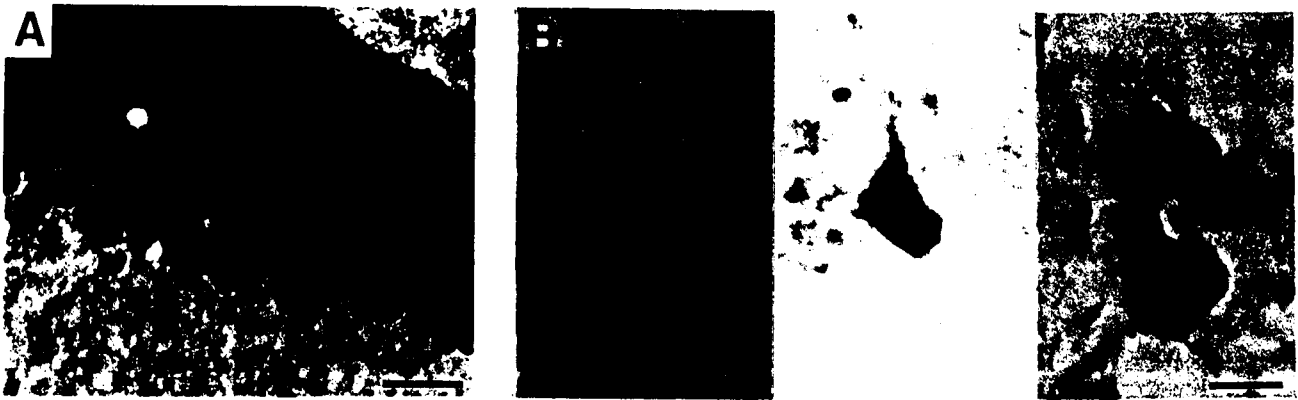


FIG. 2

p.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

dega as pe
UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Siga Capasso
(N° d'isr. 820 B)



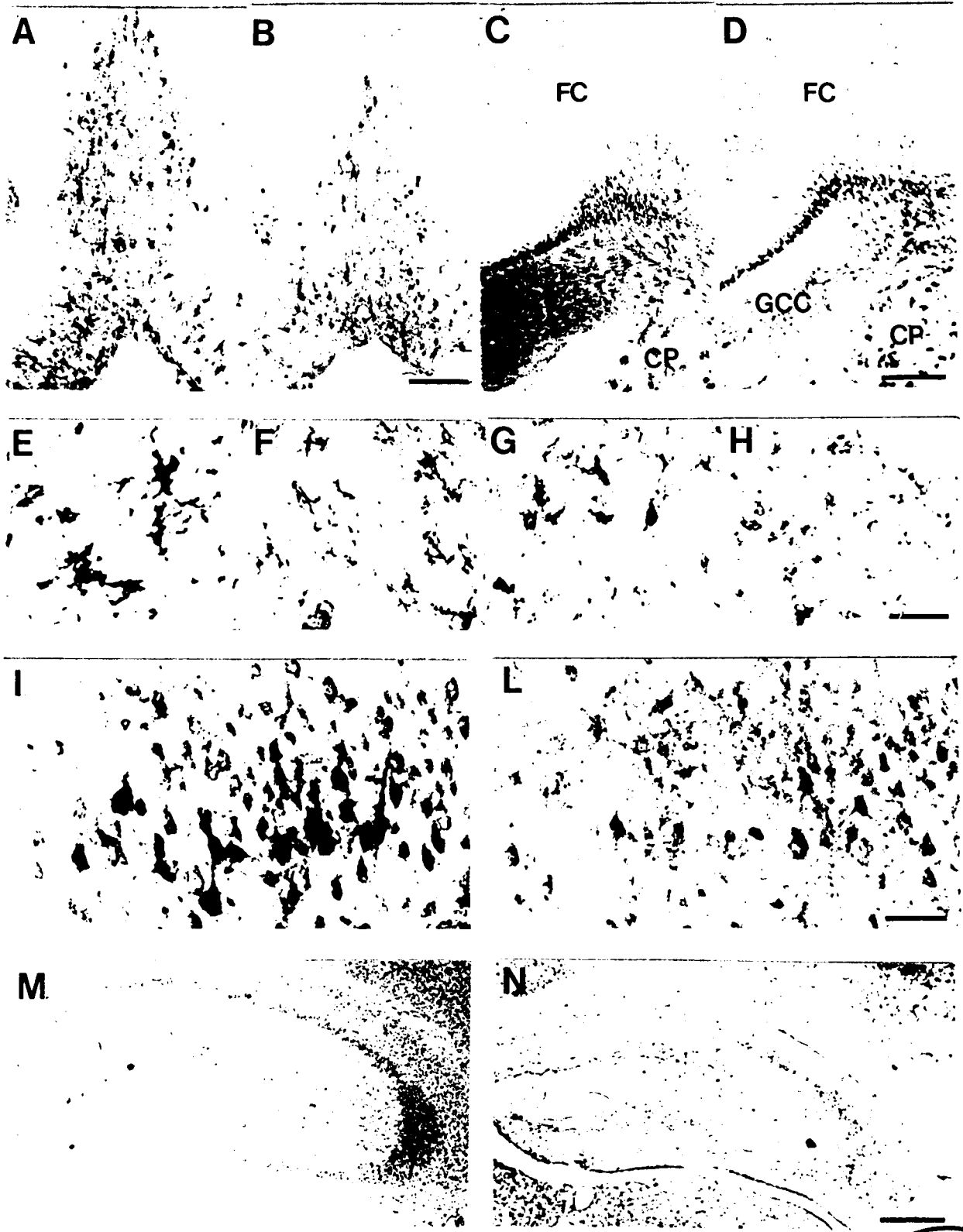


FIG. 3

p.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.



Olga Capasso
 UN MANDATARIO
 per se e per gli altri
 Olga Capasso
 (N° d'iscr. 820 B)

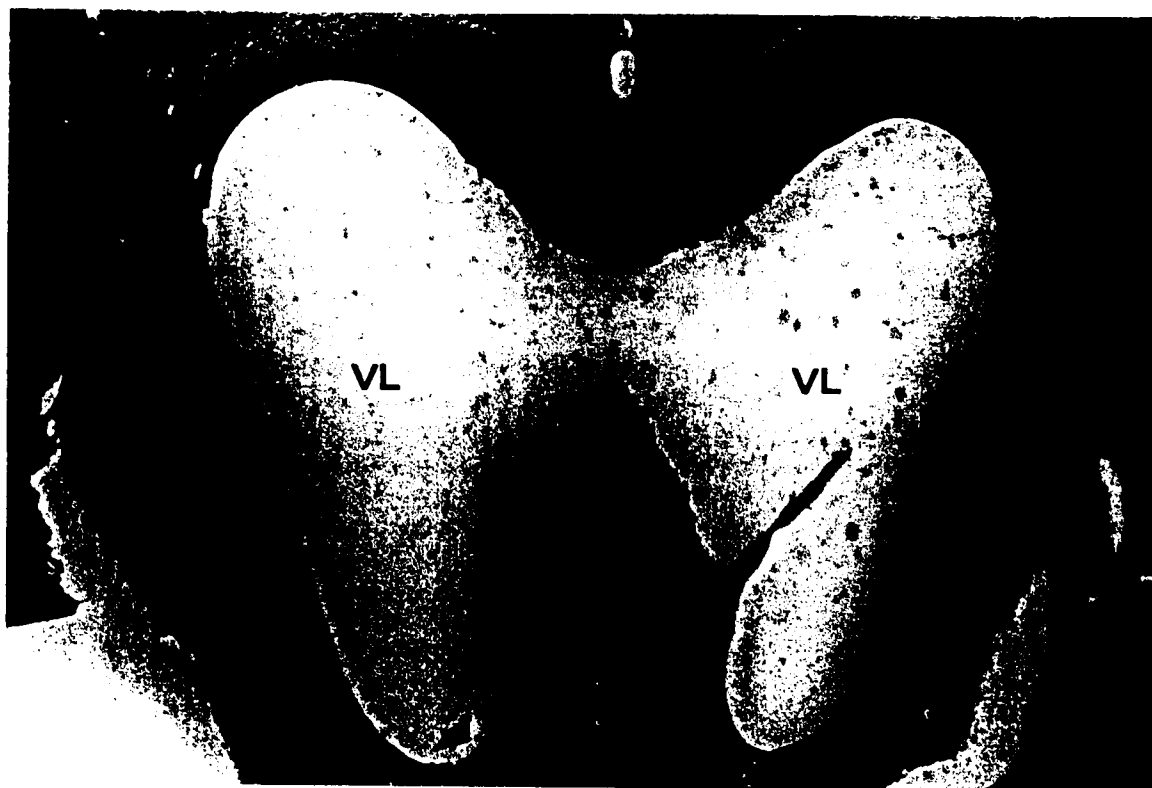
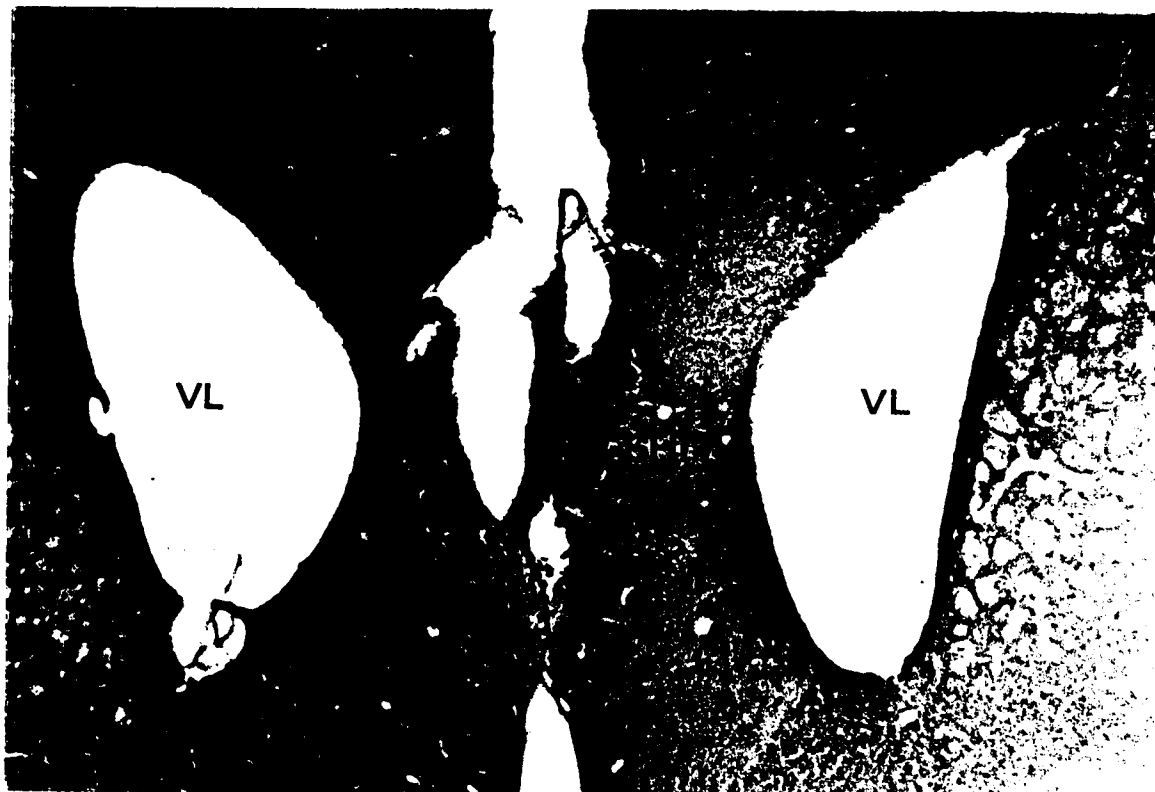


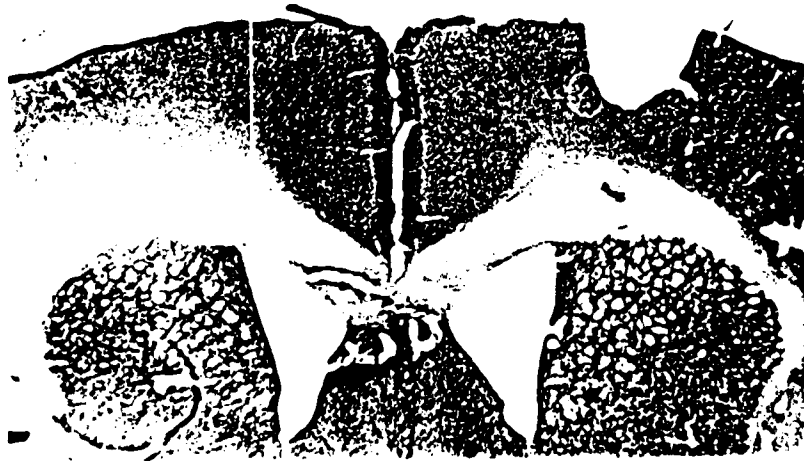
FIG. 4

p.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI
 ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.



Olga Capasso UN MANDATARIO
 per se e per gli altri
 Olga Capasso
 (N° d'iscr. 820 B)

A



B

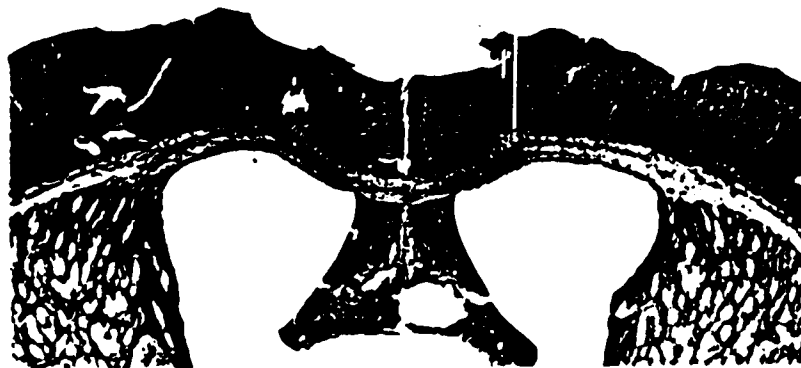


FIG. 5

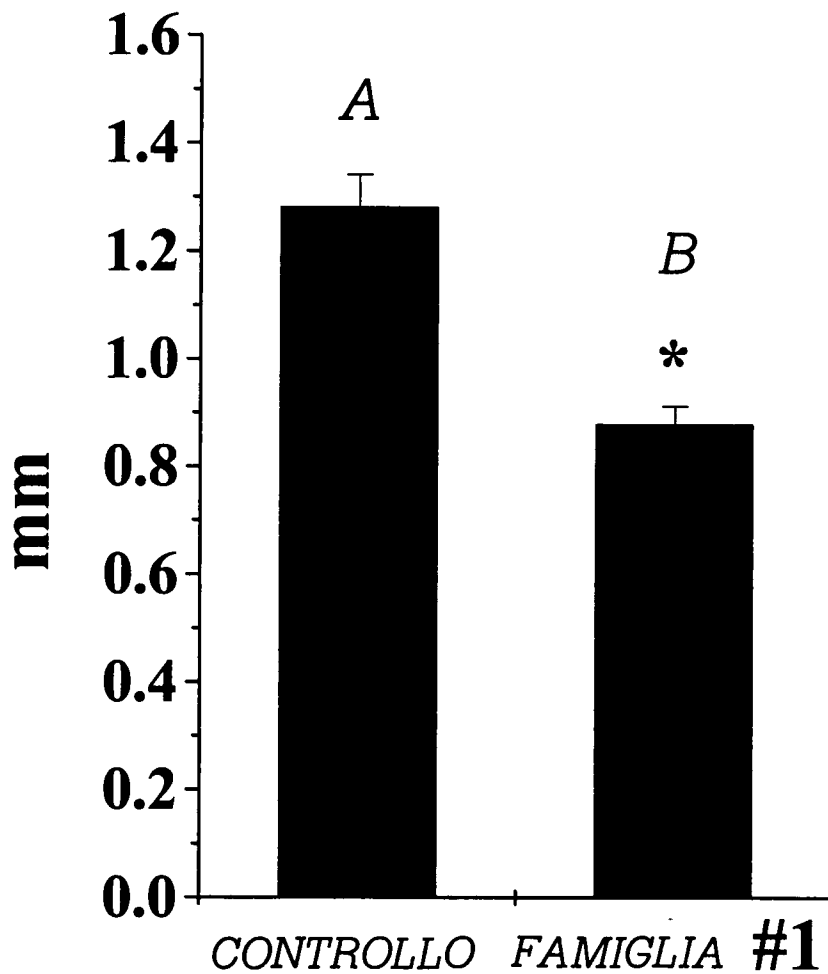
p.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

Olga Capasso

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)



SPESSORE CORTICALE



CONTROLLO : 1.282 +/- 0.059

FAMIGLIA #1: 0.879 +/- 0.033

FIG. 5c

p.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.



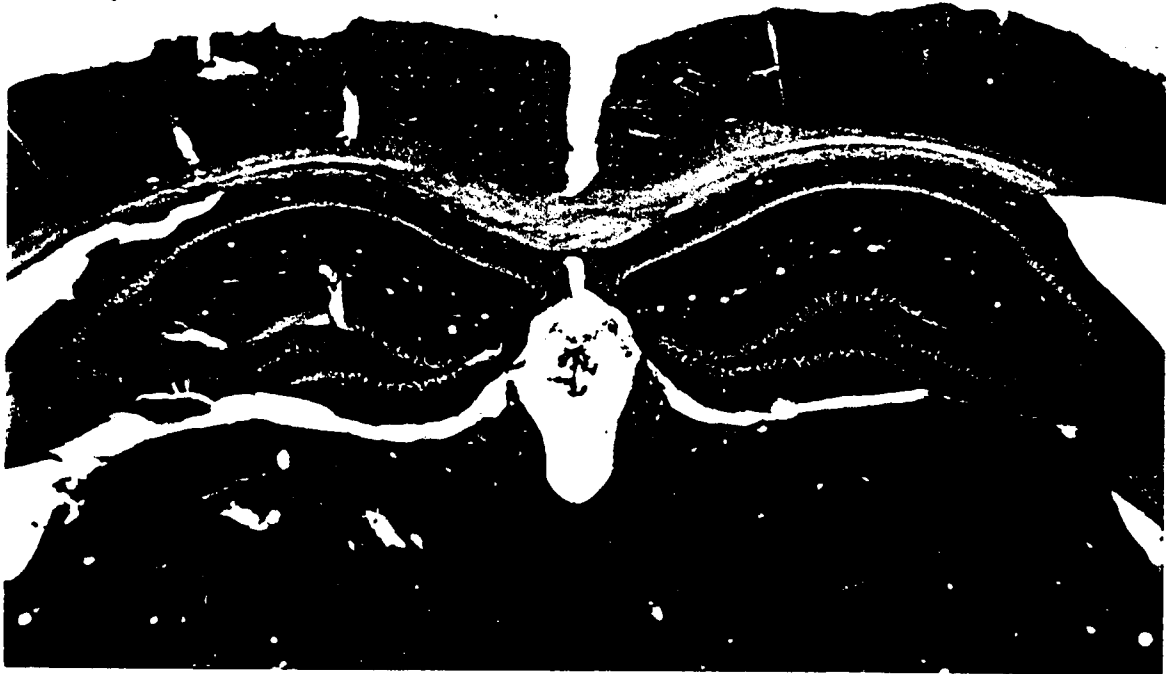
Olga Capasso

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'isr. 820 B)

A

7/32

RM2000 A 000306



B



FIG. 6

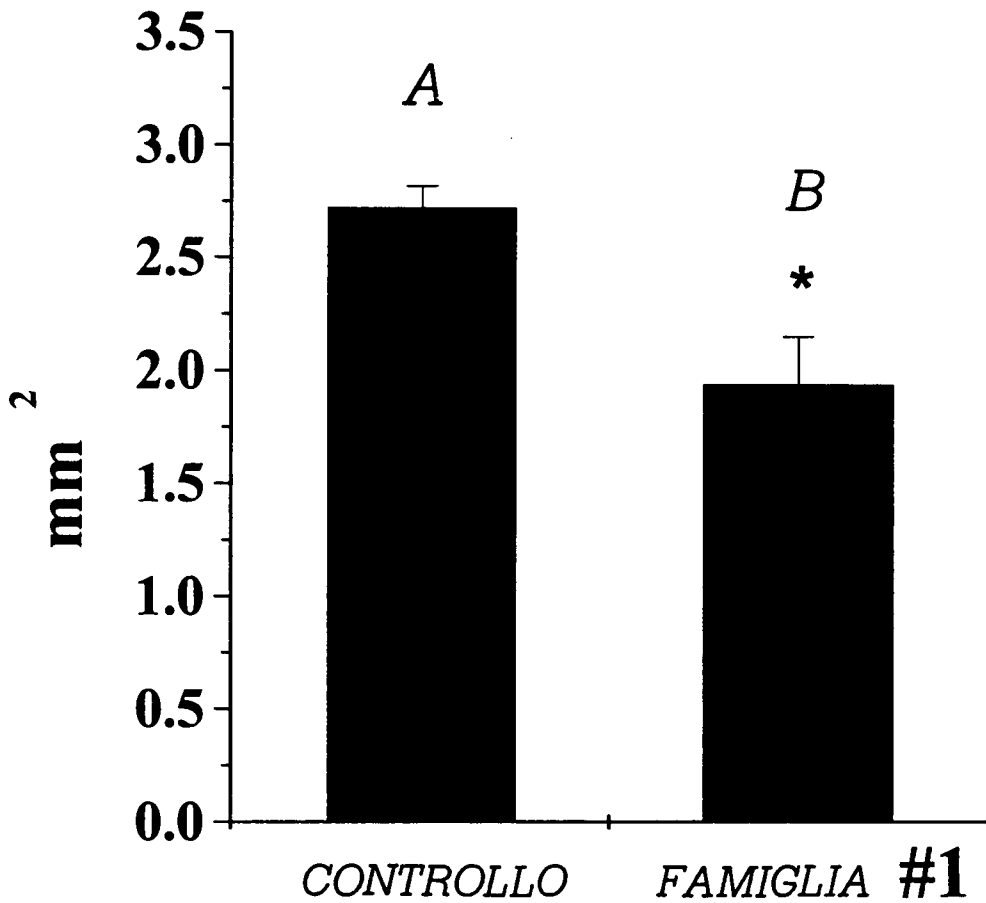
p.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI
 ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.



Olga Capasso

UN MANDATARIO
 per se e per gli altri
 Olga Capasso
 (N° d'iscr. 820 B)

SUPERFICIE DELL IPPOCAMPO



CONTROLLO : 2.72 +/- 0.098

FAMIGLIA #1: 1.94 +/- 0.211

FIG. 6c

p.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.



Olga Capasso UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)

9/32

A

RM2000 A 000306

B



FIG. 7

p.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.



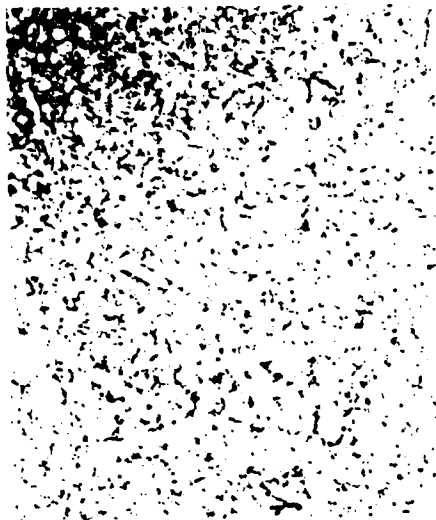
Olga Capasso

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)

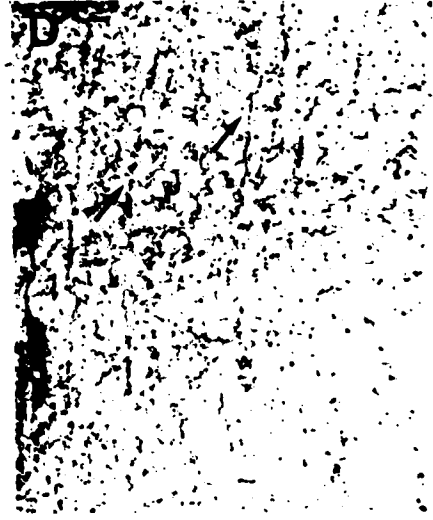
A



B



D



E



F



FIG. 8



Olga Capasso

11/32

RM2000 A 000306

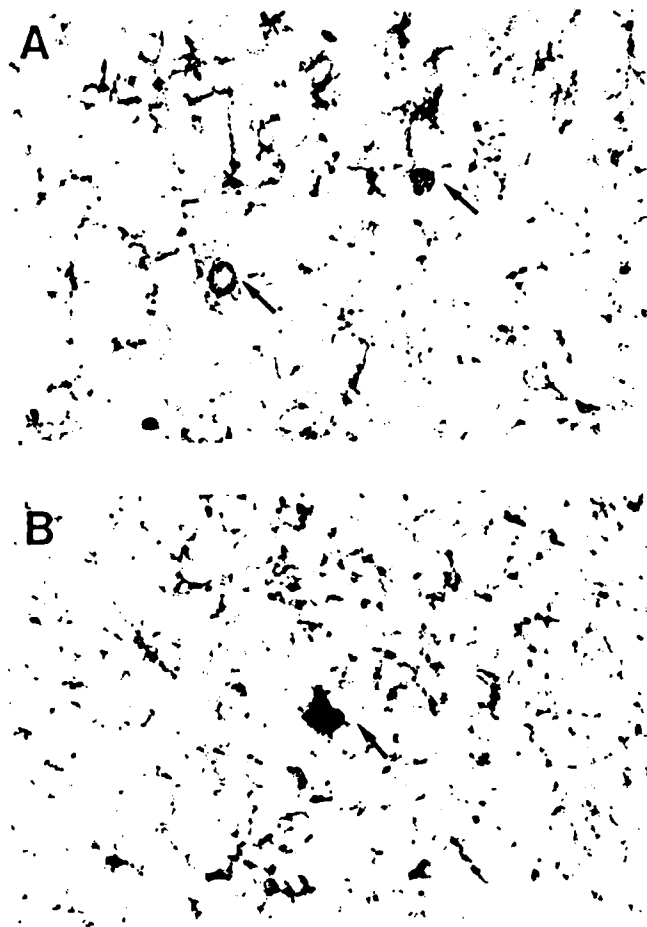


FIG. 9

D.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

olga capasso
UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)



12/32

RM2000 A 000306

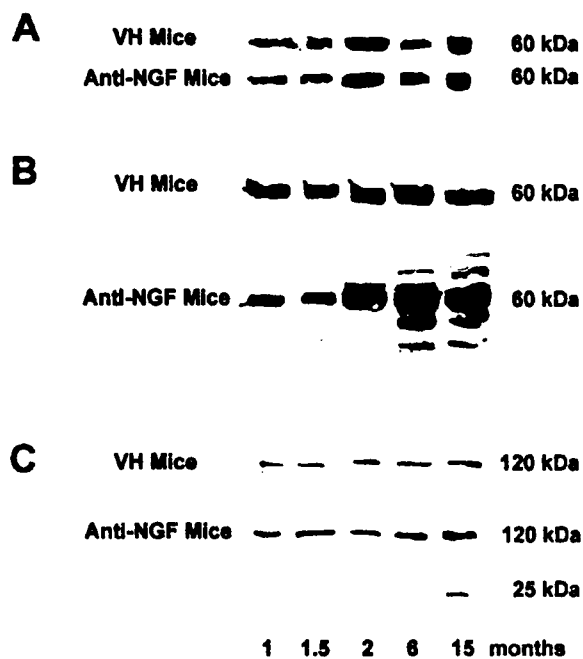


FIG. 10

p.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

Olga Capasso

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)



13/32

RM2000 A 000306

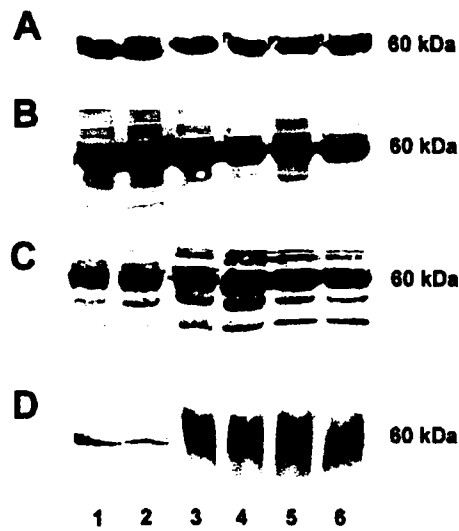


FIG. 11



p.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

Olga Capasso

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)

14/32

RM2000 A 000306

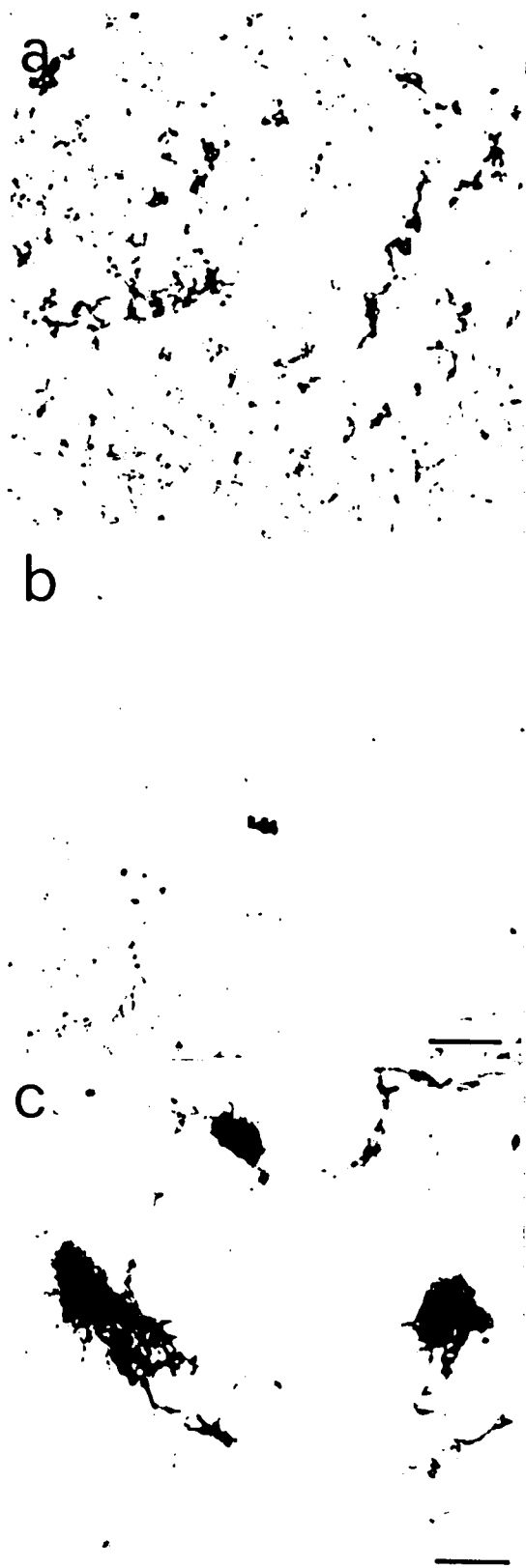


FIG. 12

p.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

Olga Capasso

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)

RM2000 A 000306



FIG. 13



p.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(n. d'iscr. 820 B)

Olga Capasso

16/32

RM2000 A 000306

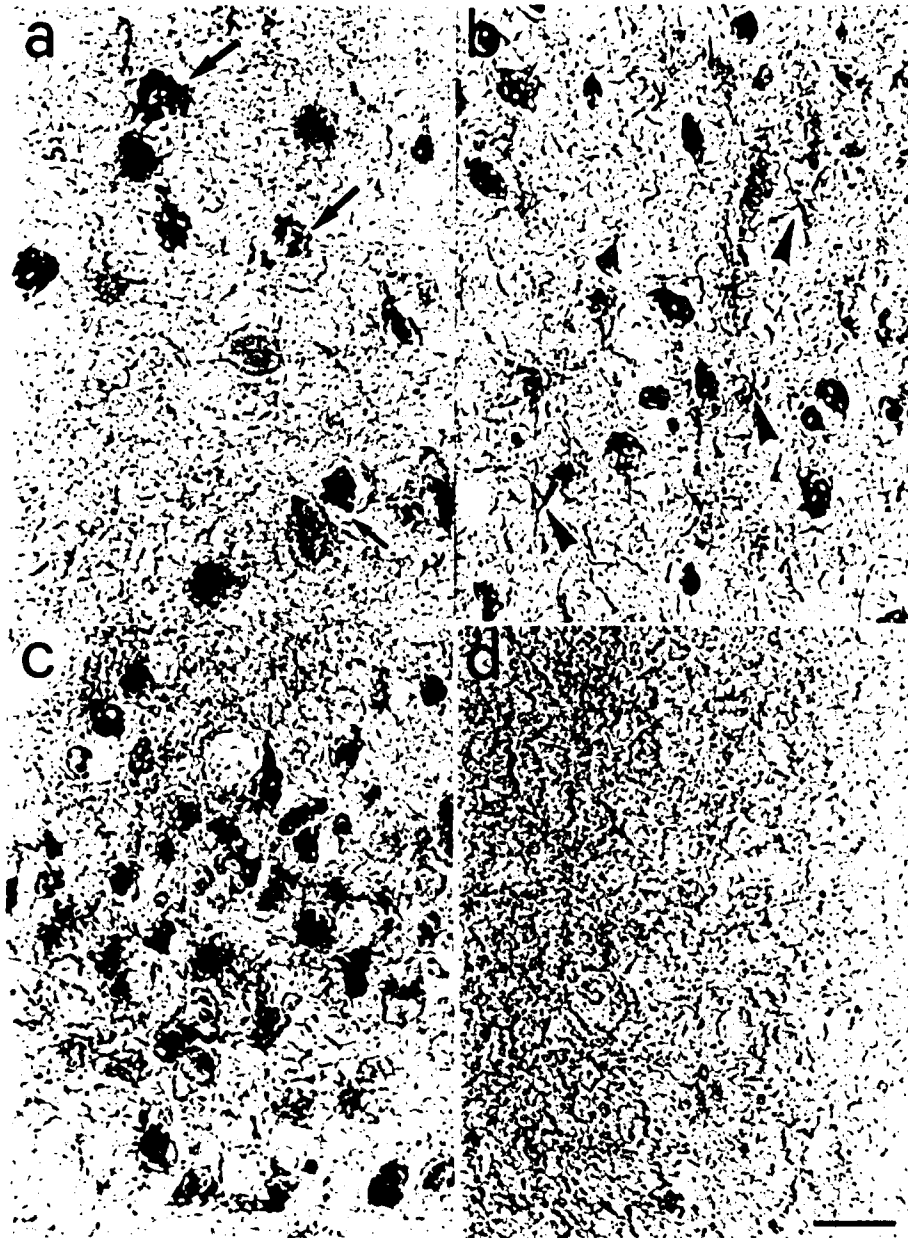


FIG. 14

p.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

Olga Capasso

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)

17/32

RM2000 A 000306

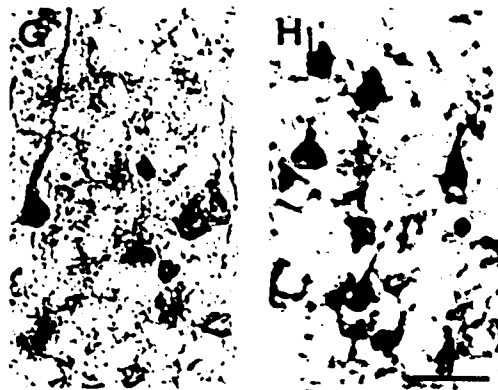


FIG. 15

p.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

Olga Capasso
UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)



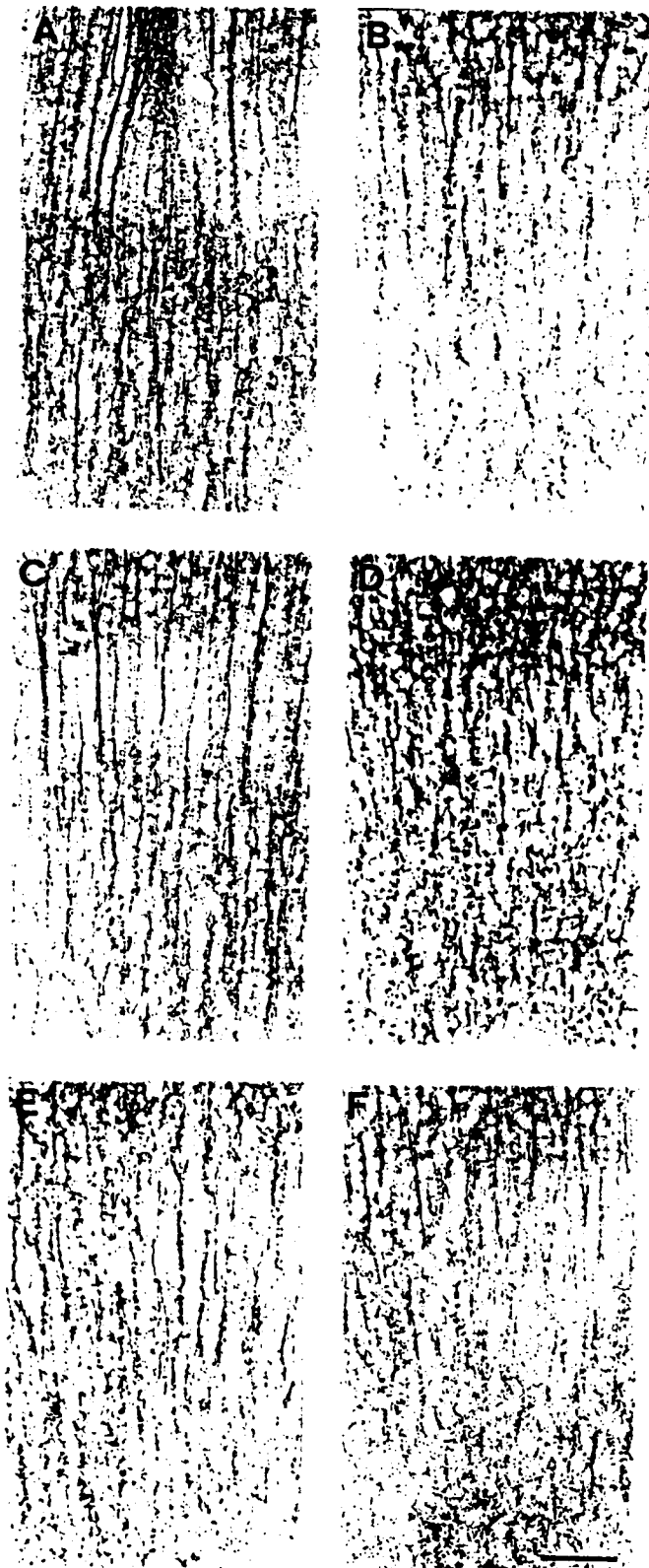


FIG. 16

p.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

Olga Capasso UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)

19/32

RM2000 A 000306

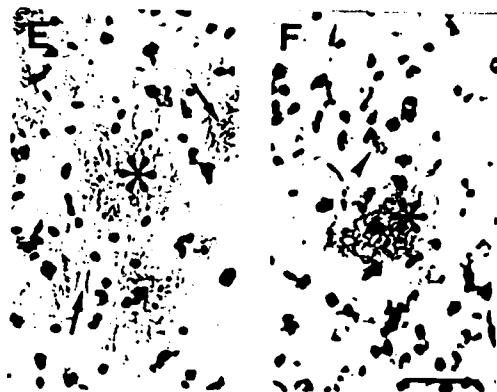


FIG. 17

p.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.



Olga Capasso

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)

RM2000 A 000306

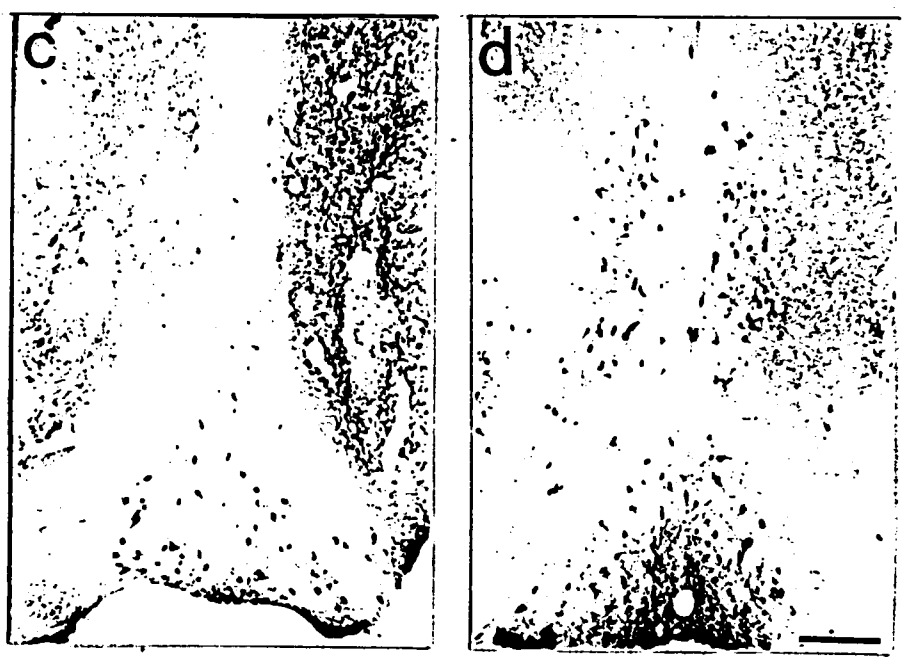


FIG. 18



p.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

Olga Capasso

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)

21/32

RM2000 A 000306

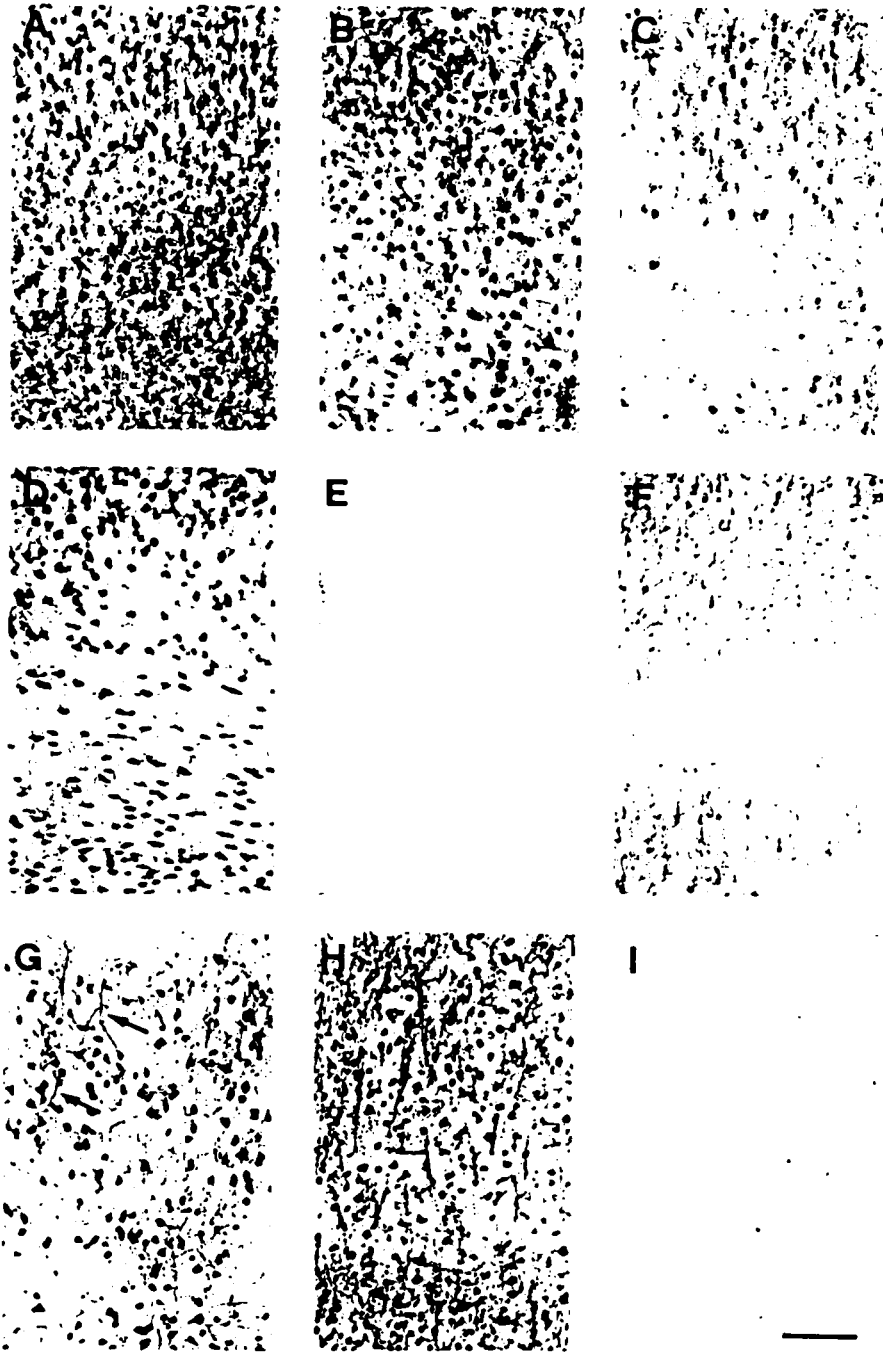


FIG. 19

p.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

Olga Capasso

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)

22/32

RM2000 A 000306

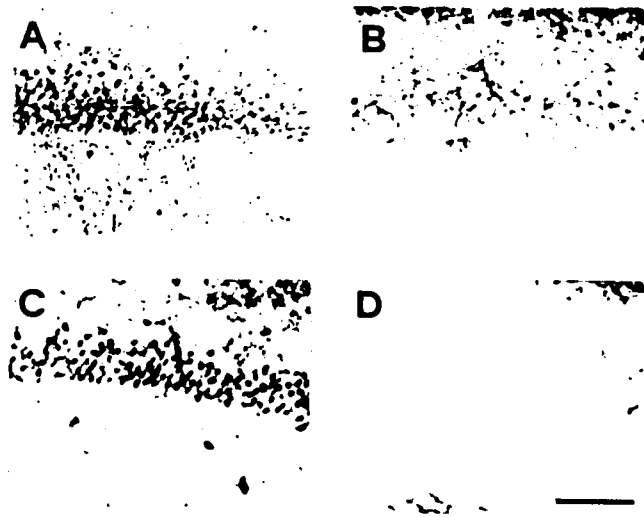


FIG. 20



D.P.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.P.A.

Olga Capasso

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'isr. 820 B)

23/32

RM2000 A 000306

E

F

G

H



FIG. 21



p.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

Olga Capasso

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)

24/32

RM2000 A 000306

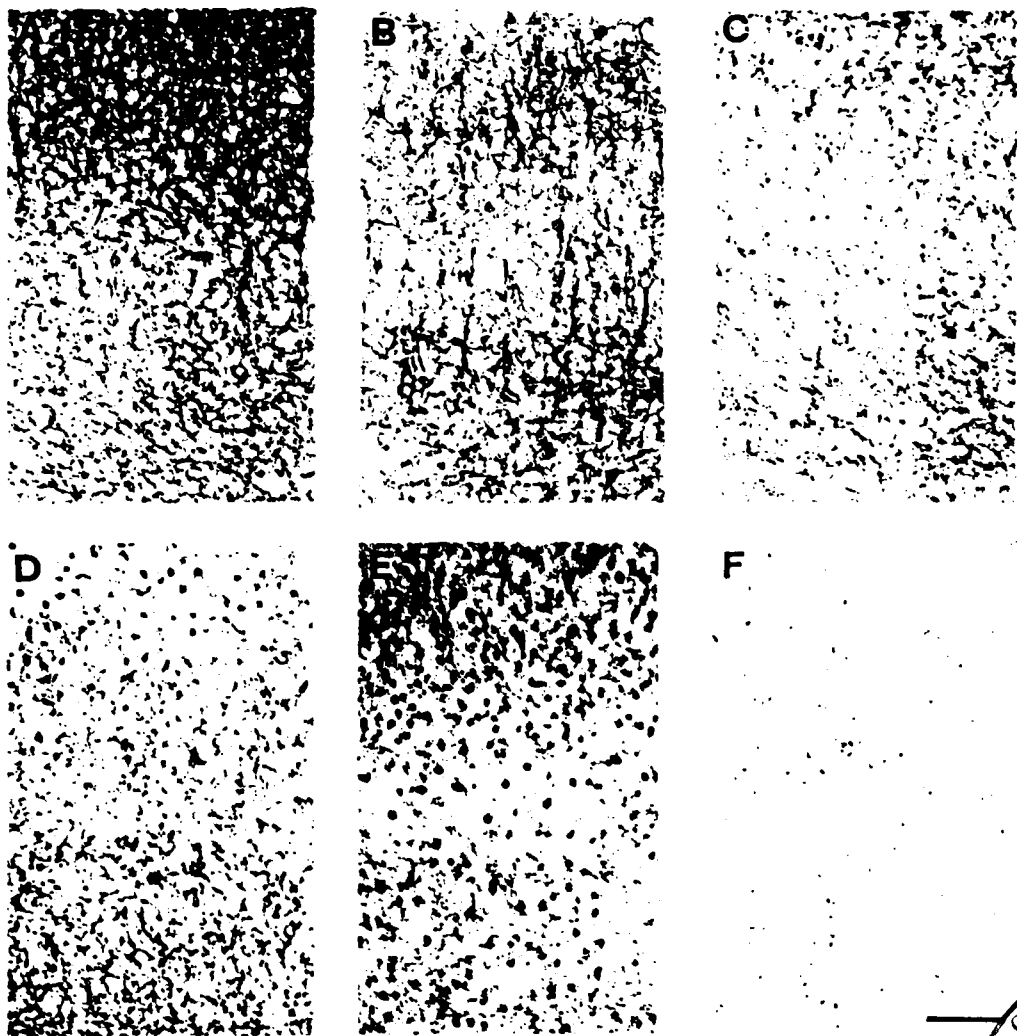
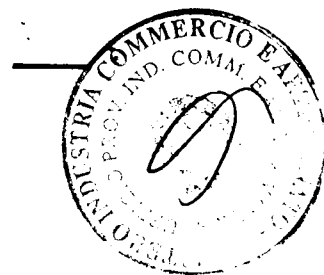


FIG. 22



p.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

Olga Capasso

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)

25/32

BM2000 A 000306

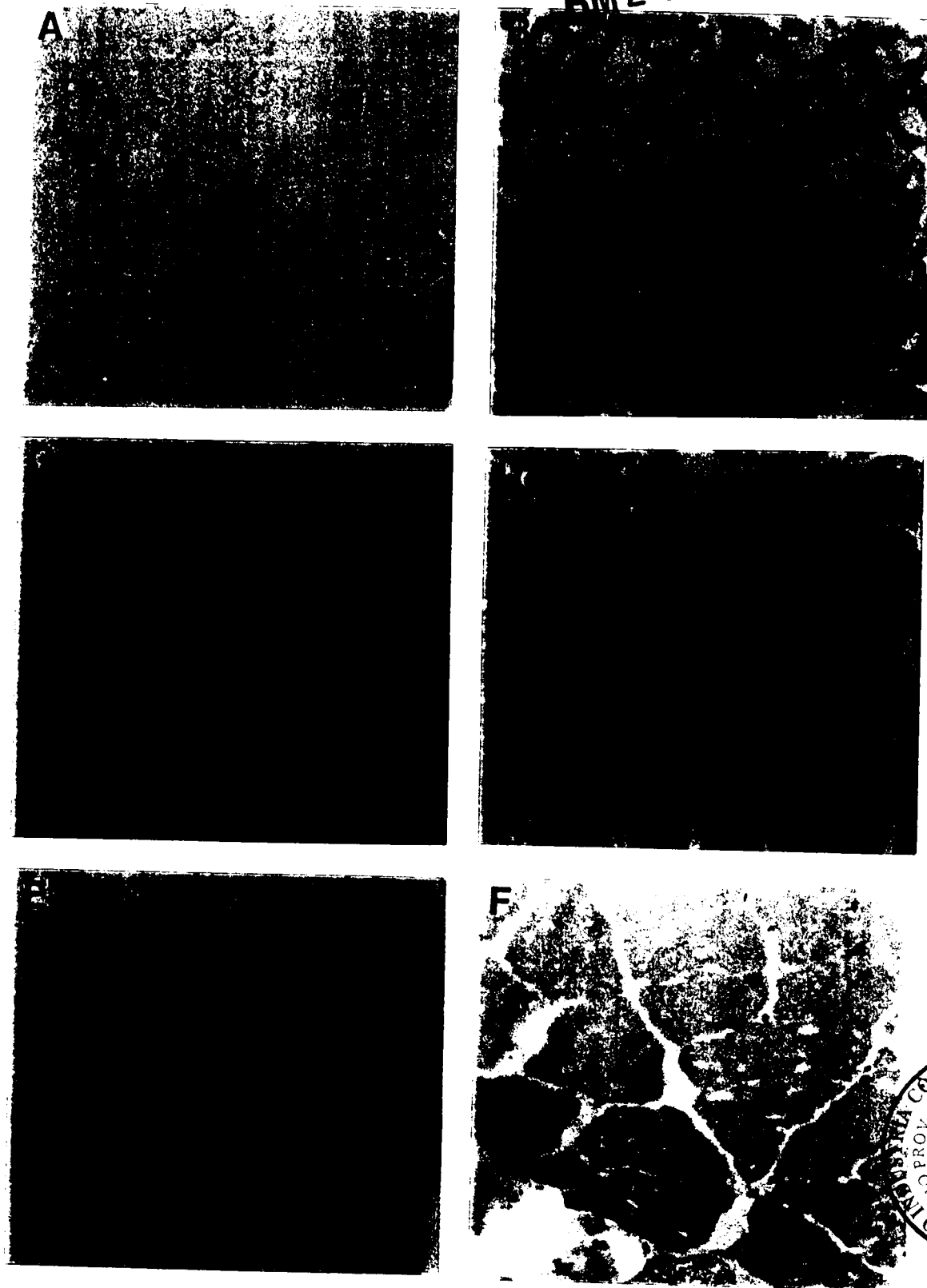


FIG. 23

p.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

Olga Capasso

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)

26/32

A



B

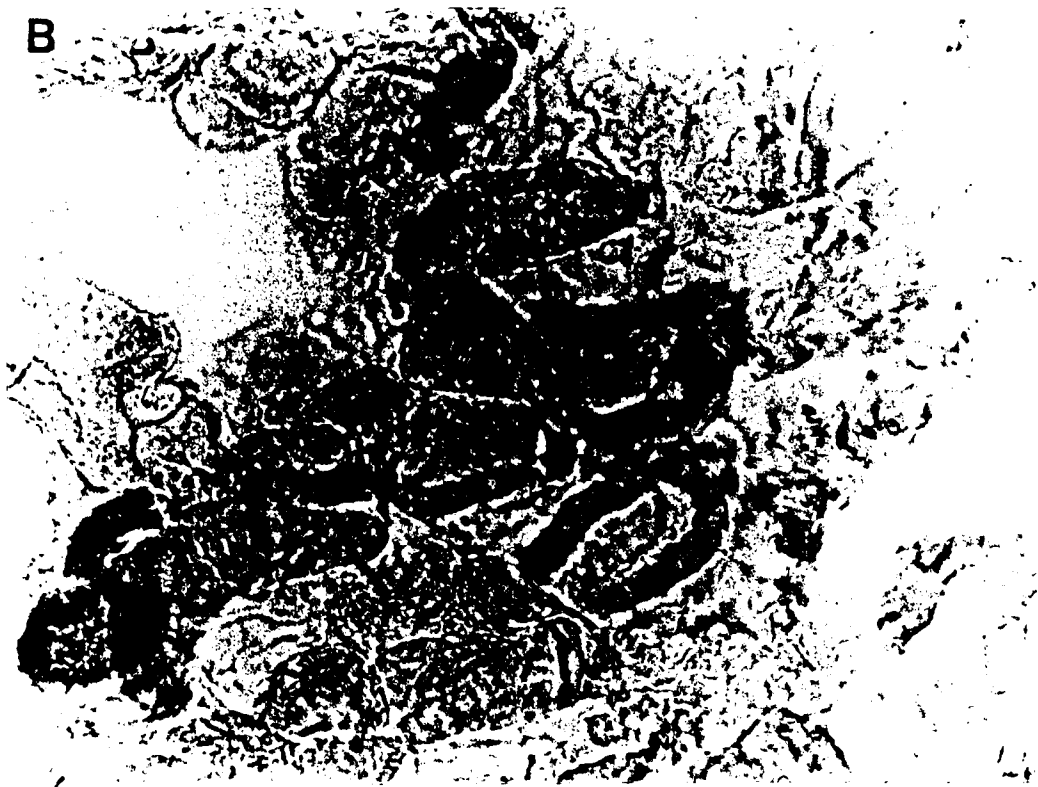


FIG. 24

p.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

Olga Capasso

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'isr. 820 B)



A

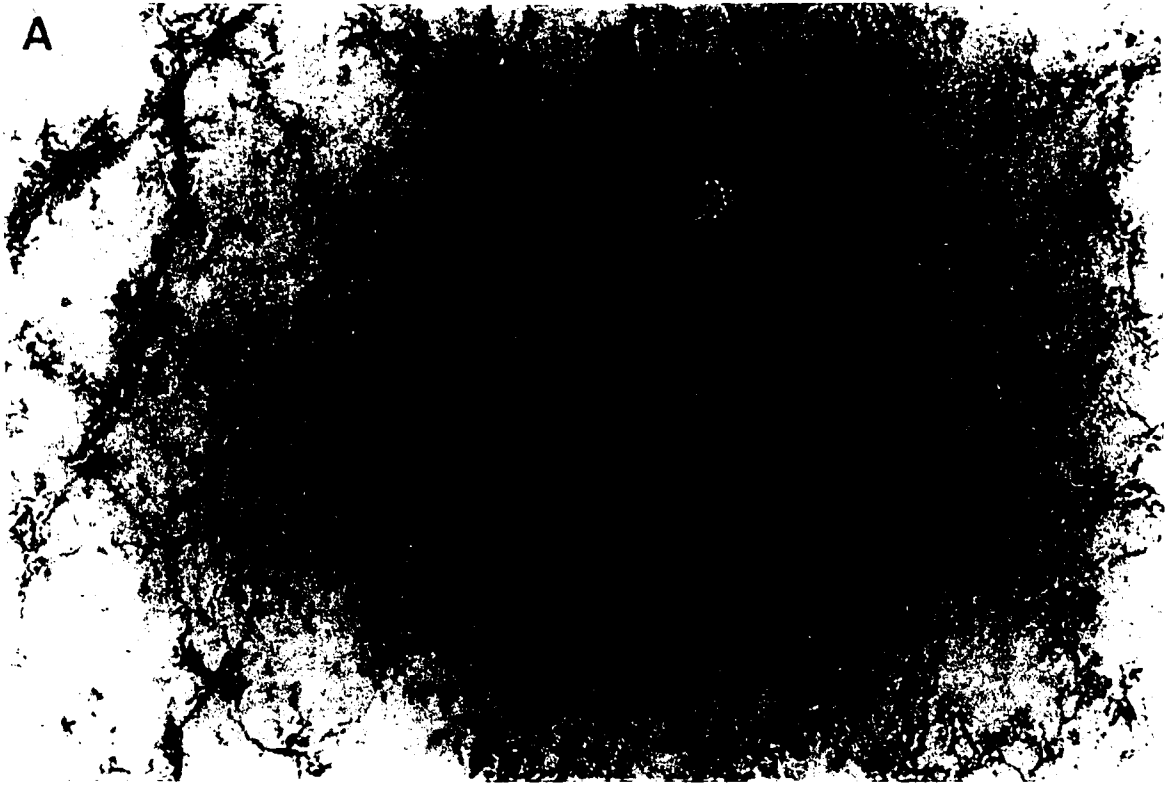


FIG. 25

p.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

Olga Capasso



UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)

RM2000 A 000306



FIG. 26

p.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

Olga Capasso

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)



29/32

RM2000 A 000306

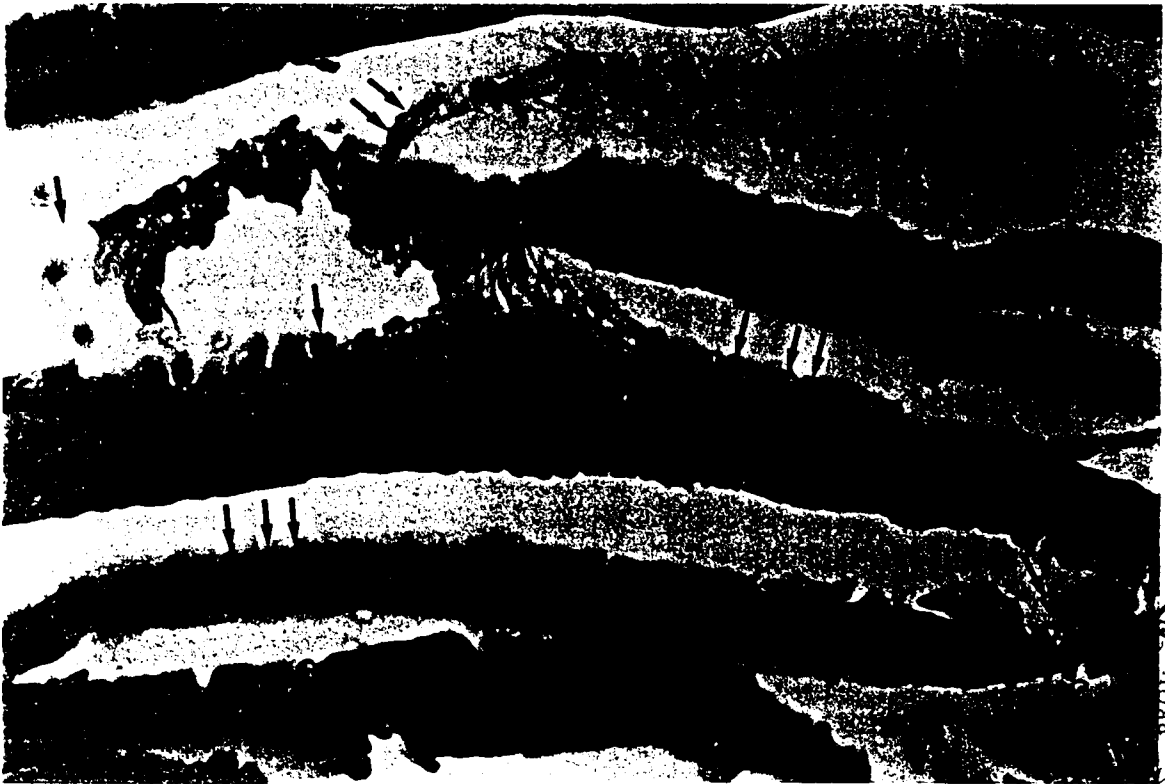
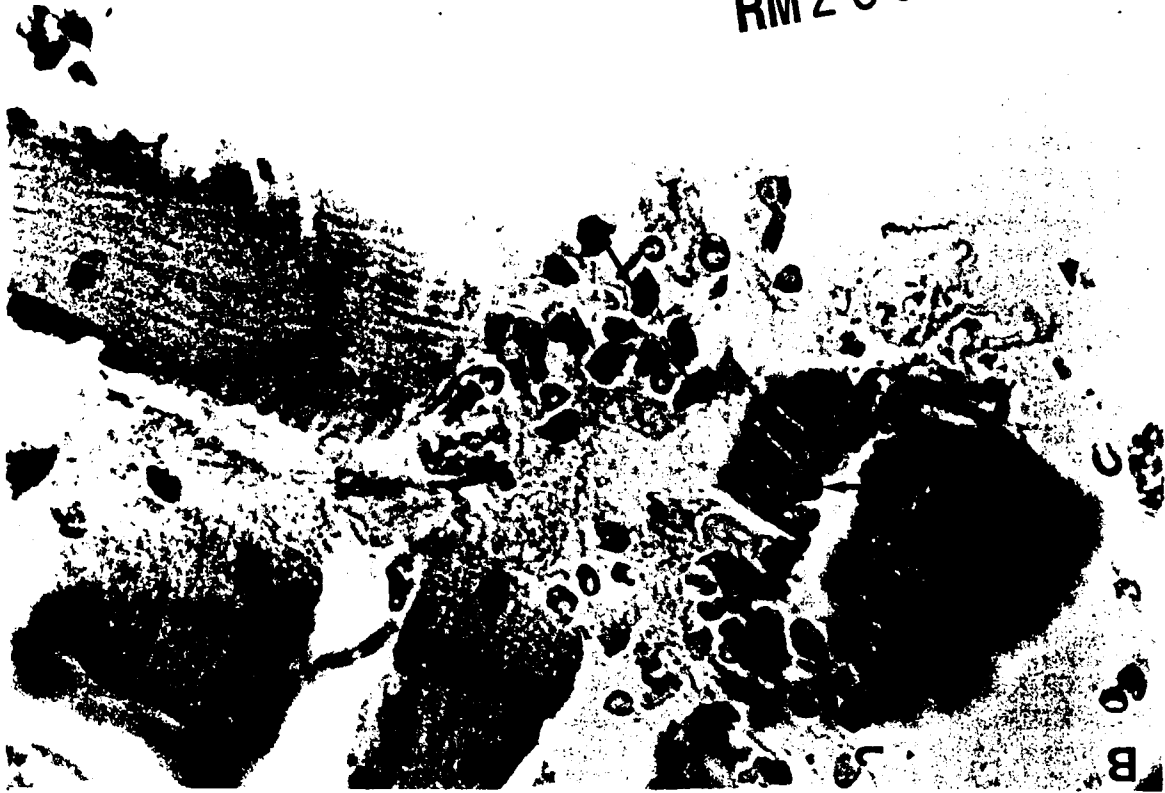


FIG. 27

ING. S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI
ING. BARZANO & ZANARDO ROMA S.P.A.

Olga Capasso

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)

RM2000 A 000306



FIG. 28



p.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

Olga Capasso

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)

RM2000 A 000306

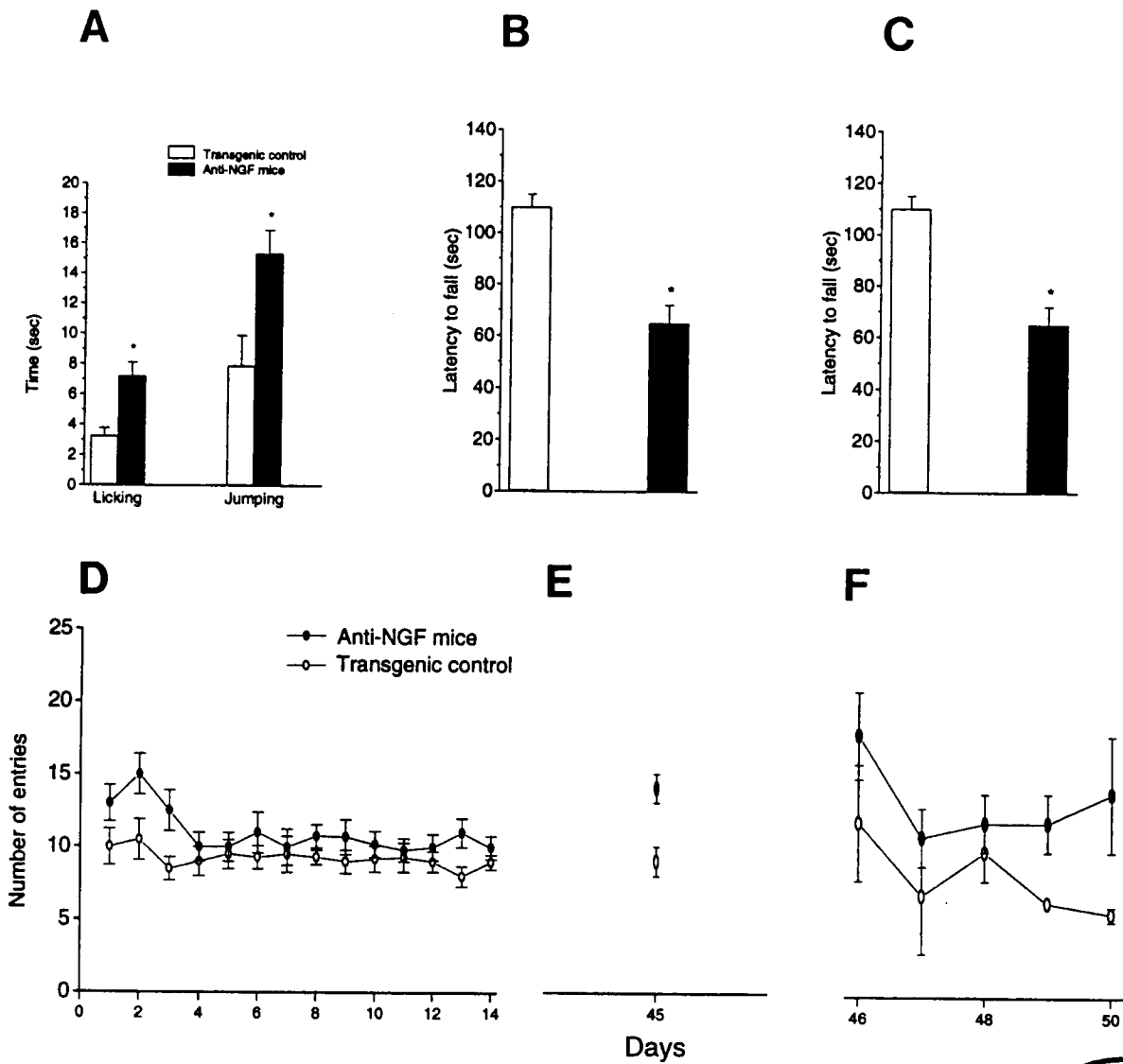


FIG 29

p.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

Olga Capasso



UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)

RM2000 A 000306

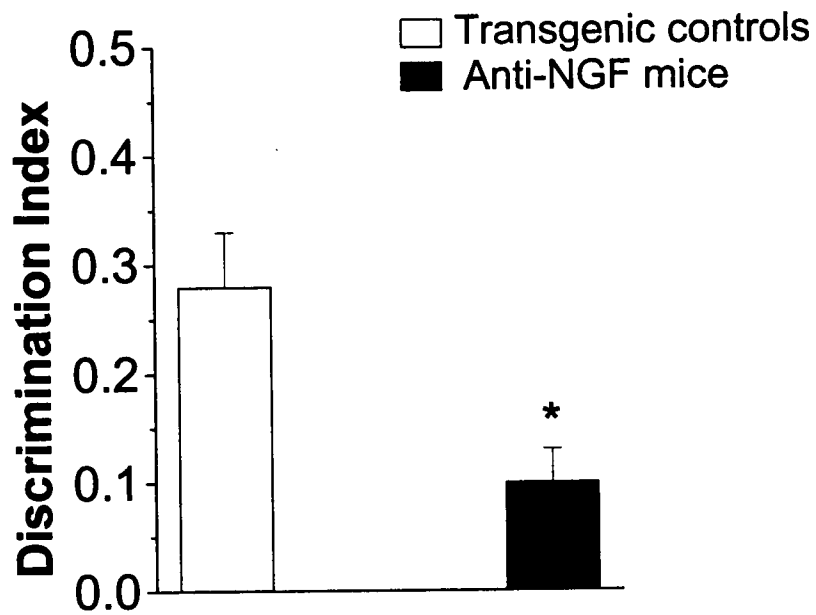


FIG. 30

p.p.: S.I.S.S.A. SCUOLA INTERNAZIONALE SUPERIORE DI STUDI AVANZATI
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

Olga Capasso

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)

