



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

DOMANDA NUMERO	102007901544006
Data Deposito	24/07/2007
Data Pubblicazione	24/01/2009

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	07	K		

Titolo

COMPLESSI DI GRP94 ED IMMUNOGLOBULINE G UMANE.

Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo:

“COMPLESSI DI GRP94 ED IMMUNOGLOBULINE G UMANE”

a nome di: PRIMIERO, Paolo

residente a: Genzano di Roma (RM)

inventori designati: FINOTTI, Paola

CAMPO DELL'INVENZIONE

L'invenzione è relativa a nuovi complessi tra la Grp94 (“glucose-regulated protein” 94) ed IgG umane ed al loro uso terapeutico e diagnostico.

STATO DELLA TECNICA

Complessi di Grp94 con IgG sono stati identificati in plasma di diabetici di tipo 1 (diabete insulino-dipendente). A tali complessi, dotati di un'intensa attività proteolitica, è stato attribuito un ruolo eziopatogenetico nella comparsa delle alterazioni vascolari associate al diabete stesso.

La ricerca di un valido marker biologico di danno vascolare, che sia espresso stabilmente e significativamente nel corso della malattia, ha portato ad identificare nel plasma di soggetti diabetici di tipo 1 la presenza di alcune “Heat Shock Proteins” (HSP) (HSP90, HSP70 e Grp94) fra cui particolarmente abbondante risultava la Grp94. La presenza della Grp94 da sola spiegava tutta l'attività proteolitica di tipo serino-simile del plasma diabetico, notevolmente aumentata rispetto a quella presente nel plasma di soggetti normali (Pagetta A. et al. Diabetologia, 2003; 46:996-1006). I risultati della ricerca fatta su un gruppo di diabetici di tipo 1, nei quali la malattia era insorta da tempo

(media di 10 anni), hanno dimostrato che tale HSP presentava delle proprietà che la distinguevano da una Grp94 normale (Pagetta A. et al., 2003, *rif. cit.*) in quanto non solo era più attiva dal punto di vista enzimatico (Menoret A. et al. J. Biol. Chem., 2001; 276:33313-33318), ma anche differente dal punto di vista strutturale, come dimostrato mediante le metodiche cromatografiche di purificazione su colonne di affinità (Pagetta A. et al., 2003, *rif. cit.*). L'aspetto più importante della ricerca riguardava comunque il fatto che nel plasma ci fossero in concentrazione elevata delle HSP che normalmente sono invece confinate al distretto intra-cellulare in cui svolgono la funzione principale di molecole "chaperones", cioè capaci di indurre la corretta conformazione delle proteine native legandosi ad esse (Pelham H.R.B. Cell, 1986; 46:959-961; Spiess C. et al. Cell, 1999; 97:339-347; Lee A.S. Trends Biochem. Sci., 2001; 26:504-510). Tale funzione è strettamente correlata alla loro struttura che determina il legame a peptidi e proteine sulla base del loro grado di idrofobicità.

E' noto che la liberazione extra-cellulare delle HSP è conseguente a processi di alterata permeabilità della membrana e/o di necrosi cellulare (Finotti P. and Pagetta A. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2004; 315:297-305), come avviene, per esempio, nel corso di processi infiammatori ed immunitari che caratterizzano l'esordio di malattie autoimmuni. La localizzazione non fisiologica delle HSP conferisce a tali proteine delle proprietà immunogenico/infiammatorie simili a quelle delle citochine, che causano un'intensa risposta infiammatoria ed immunitaria di tipo sia umorale che cellulare (Asea A. et al. J. Biol. Chem., 2002;

277:15028-15034). Tale proprietà era confermata indirettamente anche dal riscontro di complessi circolanti delle HSP con le IgG (Pagetta A. et al., 2003, *rif. cit.*; Finotti P. et al., 2004, *rif. cit.*). In particolare, nel plasma diabetico sia la Grp94 che la HSP70 erano presenti solo in forma di omo- ed etero-complessi ad alto peso molecolare, in cui si dimostrava la presenza di altre proteine plasmatiche, in particolare dell'albumina e di α 1-antitripsina, proteina cui appariva soprattutto legata indissolubilmente l'HSP70 (Finotti P. et al., 2004, *rif. cit.*). L'ulteriore riscontro che anche la Grp94 poteva stabilire un legame indissolubile con frammenti di IgG, come dimostrato dagli esperimenti di immunoprecipitazione (Finotti P. et al., 2004, *rif. cit.*), avvalorava l'ipotesi che le HSP potessero essere presenti in circolo in forma legata ad altre proteine plasmatiche e che il legame indissolubile che si formava con alcune di esse, dando luogo in alcuni casi ad una proteina di fusione, potesse essere responsabile dello scatenamento della risposta immune con la produzione di anticorpi (Ac) circolanti. Mentre, comunque, la presenza dell'albumina nei complessi poteva essere attribuita ad un "binding" aspecifico, grazie alla elevata concentrazione dell'albumina ed alla sua estesa capacità di legarsi a proteine diverse, la presenza di grossi aggregati molecolari con IgG aveva un significato più specifico in quanto sia la HSP da sola, ma soprattutto quella legata tenacemente ad altre proteine, poteva assumere valenza di immunogeno capace di stimolare la produzione di anticorpi diretti contro il complesso stesso. Tale interpretazione era anche avvalorata dai dati di letteratura che dimostrano come in alcune malattie di natura infiammatoria ed immunitaria, come l'ipertensione e

l'arteriosclerosi, vi è un aumento della concentrazione plasmatica di Ac diretti contro alcune HSP (Xu Q. *Thromb. Vasc. Biol.*, 2002; 22:1547-1559), dato che implicitamente dimostra che le HSP liberate fuori dalla cellula in concentrazione elevata fungono da immunogeni (Finotti P. *Curr. Diabetes Rev.*, 2006; 2:295-305). Non si può escludere che i complessi stabili delle HSP con i frammenti di IgG ed anche con α 1-antitripsina possano essere presenti già come tali nelle cellule ed essere liberati in seguito ad un processo necrotico e/o di alterata permeabilità cellulare. Questa possibilità sarebbe sostenuta anche dal fatto che sia HSP70 che Grp94 sono HSP specificamente coinvolte nell'assemblaggio di catene di IgG all'interno delle cellule specializzate da cui le IgG possono essere secrete solo dopo essere state correttamente conformate (Melnick J. et al. *J. Biol. Chem.*, 1992; 267:21303-21306).

Considerando, quindi, la funzione principale di "chaperones" svolta dalle HSP, si può ragionevolmente ipotizzare che le HSP presenti nel plasma possano diventare facilmente immunogene non tanto (o non solo) per una intrinseca caratteristica della loro molecola, ma soprattutto per la loro capacità di formare complessi (Pagetta A. et al., 2003, *rif. cit.*; Finotti P. et al., 2004, *rif. cit.*; Finotti P., 2006, *rif. cit.*).

La successiva sperimentazione condotta sul plasma di altri soggetti diabetici ha confermato ed esteso i risultati ottenuti precedentemente. Si è confermato così che la Grp94 è l'immunogeno contro cui si sviluppano anticorpi primari (anti-Grp94, idiotipici o primari), e che la Grp94 risulta inglobata in complessi immuni in cui la sua attività catalitica risulta

completamente mascherata (Pagetta A. et al. Mol. Immunol., 2007; 44:2870-2883).

La purificazione degli anticorpi dal plasma, mediante cromatografia di affinità su colonna di Proteina G, ha anche mostrato la difficoltà di isolare completamente questi complessi e di arrivare così ad una purificazione dell'immunogeno primario. Infatti, nei campioni di plasma utilizzati (sia singolarmente che in "pool") si notava la formazione di complessi ad elevato peso molecolare in cui anticorpi interi (i soli in grado di legarsi alla Proteina G con la loro porzione Fc) si trovano strettamente associati anche con frammenti di IgG, come Fab e Fab₂.

SOMMARIO

L'Inventrice ha ora trovato che le caratteristiche di complessi endogeni formati da HSP con IgG ed isolati negli esperimenti di purificazione *ex vivo*, come menzionato sopra, sono sostanzialmente molto diverse da quelle di complessi ottenibili *in vitro* tra Grp94 ed IgG umane non immuni. Questi ultimi complessi hanno anche proprietà biologiche peculiari, diverse da quelle evidenziate finora per i complessi immuni endogeni ed in particolare si caratterizzano per:

- 1) essere formati da un legame stabile tra Grp94 e IgG umane che non coinvolge la porzione di riconoscimento antigenico sulle IgG (porzione Fab);
- 2) essere resistenti a processi di denaturazione, come ad esempio la bollitura ed il trattamento con sostanze riducenti;

3) avere una massa superiore a 300 kDa, compresa tra 300 e 350 kDa, come risulta dagli esperimenti di centrifugazione su gradiente di glicerolo (dal 10% al 40%);

4) possedere un'attività biologica citochino-simile, di tipo immunostimolante o immunoadiuvante, ma non un'attività catalitica di tipo serino-simile.

Sono quindi oggetto dell'invenzione i complessi tra Grp94 ed IgG umane non immuni caratterizzati dal fatto di:

- presentare un legame stabile tra Grp94 ed IgG non mediato dal sito di legame antigenico sulle IgG;
- essere resistenti a processi di denaturazione;
- avere una massa superiore a 300 kDa misurata con gradiente di glicerolo tra il 10% ed il 40%.

È ancora oggetto l'uso di tali complessi Grp94-IgG come immunomodulatori, agendo sia da immunostimolanti o immunoadiuvanti, in patologie in cui si richieda la stimolazione della risposta immunitaria, allorché questa sia insufficiente, come pure nei casi in cui si richieda l'inibizione di una risposta immunitaria esacerbata (malattie autoimmunitarie).

È un ulteriore oggetto dell'invenzione l'uso di tali complessi Grp94-IgG a scopi diagnostici.

BREVE DESCRIZIONE DELLE FIGURE

Figura 1. La figura mostra la formazione del complesso Grp94-IgG analizzata con le diverse metodiche sperimentali riportate in dettaglio nella parte sperimentale: **(A)** Dot-blot di Grp94 nativa (2 µg, 10 µl) su

membrane di Immobilon precedentemente immerse in metanolo (1 min), risciacquate in acqua bi-distillata (1 min) e lasciate asciugare (3 min). **(B)** SDS-PAGE e Western "blotting" con Ac anti-Grp94 (monoclonali) e anti-IgG umane (da pecora) su soluzioni di Grp94 nativa dopo lo "step" finale di purificazione da colonna di Con A-Sepharose, con e senza IgG umane non immuni (rapporto molare di 1:1 con Grp94), dopo incubazione per 1 h a 37°C. **(C)** Centrifugazione frazionata su gradiente di glicerolo (10-40%) di Grp94 (100 µg) dopo incubazione per 1 h a 37°C, sia da sola che in presenza di IgG umane non immuni (rapporto molare di 1:1).

Figura 2. La figura mostra gli effetti della Grp94, da sola ed in complessi con le IgG, sulla stimolazione della crescita cellulare e sulla differenziazione angiogenetica in cellule endoteliali umane (HUVEC). **(A)** Istogrammi della crescita cellulare dopo incubazione con Grp94 (1 e 10 ng/ml), da sola ed in complessi con le IgG; gli istogrammi rappresentano la media ($\pm$ SEM) del numero di cellule contate in almeno tre differenti esperimenti. **(B)** Istogrammi della crescita cellulare in cui alla coltura cellulare è stato aggiunto anche l'inibitore delle MEK (Mitogen activated protein kinase kinase) U0126 (10 µM, concentrazione finale). Gli istogrammi rappresentano la media ($\pm$ SEM) del numero di cellule contate in almeno tre differenti esperimenti. **(C)** Rilevazione al microscopio ottico della trasformazione angiogenetica delle HUVEC dopo trattamento con Grp94 (10 ng/ml), da sola ed in complessi con le IgG, in assenza e presenza dell'inibitore U0126.

Figura 3. La figura mostra l'aumento dell'espressione di HSP90 e HSP70 dopo trattamento con Grp94 da sola ed in complessi con le IgG in cellule

HUVEC. **(A)** Lisato cellulare intero analizzato in SDS-PAGE (gel di acrilamide al 10%) seguito da Western “blotting” con Ac anti-HSP90, anti-HSP70 e anti-IgG umane in assenza e presenza dell’inibitore U0126 (10 μ M, concentrazione finale). Le frecce a sinistra dei tracciati indicano le bande che sono presenti alla stessa altezza anche nei tracciati a destra. I “blotting” mostrati sono rappresentativi di tre esperimenti differenti fatti sugli stessi campioni in tempi diversi. **(B)** Analisi in SDS-PAGE (gel di acrilamide al 10%) seguita poi da Western “blotting” con Ac anti-HSP90, anti-HSP70 ed anti-IgG umane (come sopra, per i lisati cellulari) dei terreni delle colture cellulari utilizzate per gli esperimenti sui lisati (vedi sopra).

Figura 4. La figura mostra gli effetti di cambiamento strutturale dovuto all’aumento dell’espressione di HSP90 e HSP70 indotti dalla Grp94 da sola e in complessi con le IgG sulle HUVEC. **(A)** Fluorescenza (verde) evidenziata al microscopio confocale prodotta dalla rivelazione degli Ac diretti contro HSP90 nei controlli e nei trattati (pannelli a,b,c a sinistra). **(B)** Si vede la fluorescenza emessa dalla HSP70 in seguito alla reazione con Ac specifici anti-HSP70, analogamente a quanto rilevato in (A) per HSP90.

Figura 5. La figura mostra gli effetti sulla stimolazione della proliferazione dei linfociti umani in presenza della Grp94 da sola ed in complessi con le IgG.

Figura 6. La figura mostra gli effetti sulla produzione di IgG da coltura di linfociti umani in presenza della Grp94 da sola ed in complessi con le IgG.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

La premessa per la formazione di un complesso *in vitro* fra Grp94 ed IgG riguardava la possibilità di riuscire a riprodurre, semplificandolo, il modello del complesso immune dedotto dalla sperimentazione *ex vivo* e di valutarne gli effetti su colture cellulari endoteliali umane (HUVEC) prese come modello di cellula vascolare.

È chiaro però che esistono sostanziali differenze delle condizioni di base nella formazione dei complessi che si formano *in vitro* rispetto a quelli purificati dal plasma di pazienti diabetici di cui si è già discusso in precedenza.

Tali differenze sono:

- 1) la Grp94 impiegata negli esperimenti di incubazione è ottenuta da microsomi di fegato di ratto e si può ragionevolmente presumere che, pur avendo gli stessi siti di riconoscimento antigenico di Grp94 di origine umana (reagisce con anticorpi anti-Grp94), non sia uguale a quella trovata nel plasma di diabetici (Pagetta A. et al. 2003, *rif. cit.*);
- 2) le IgG umane utilizzate negli esperimenti *in vitro* non sono immuni (sono ottenute infatti da "pool" di plasmi di soggetti normali).

Dalla ricerca è poi emerso che:

- 3) il complesso Grp94-IgG ottenuto *in vitro* si forma già dopo un tempo di incubazione relativamente breve, il che depone per una reazione di tipo chimico che coinvolge siti particolari, utili per stabilire il legame rapidamente;

4) il legame può essere in parte ancora reversibile, mentre nei complessi che si formano *in vivo* la Grp94 si stacca difficilmente (o quasi mai) dalle IgG e dalle altre componenti di natura proteica.

Questo può dipendere dalla natura delle variabili che influenzano la reazione *in vitro*, quali la concentrazione dei due reagenti, il tempo di incubazione e la temperatura.

I complessi oggetto dell'invenzione sono stati ottenuti incubando Grp94 ed IgG umane non immuni in rapporti molarali compresi tra 0.5 e 1 (Grp94-IgG, M/M), e preferibilmente 1:1, alla temperatura compresa tra 30°C e 40°C, e preferibilmente di 37°C, per almeno 1 ora in un solvente acquoso opzionalmente tamponato ad un pH compreso tra 6.5 e 7.4.

Per gli scopi dell'invenzione la Grp94 è la proteina di mammifero P14625 (codice di identificazione della proteina nella banca dati Swiss Prot & Tremble). Essendo noto che la Grp94 è una proteina altamente conservata con un'elevata omologia di sequenza (>80%) tra la variante umana e quella di ratto, per la preparazione dei complessi dell'invenzione può essere impiegata la proteina nativa ottenuta da ratto o da topo, che però, a differenza dell'umana, non è glicosilata.

Le immunoglobuline invece sono sempre di provenienza umana e sono pre-immuni. Ai fini della presente invenzione, sono definite pre-immuni (o non immuni) le IgG derivate da plasma di soggetti normali e purificate secondo le procedure standard.

A seguito dell'incubazione tra Grp94 ed IgG non immuni si formano i complessi aventi le caratteristiche riportate in precedenza e cioè: i) complessi aventi un legame stabile tra la Grp94 ed IgG non mediato dal

sito di legame antigenico sulle IgG; ii) essere resistenti a processi di denaturazione, come ad esempio la bollitura ed il trattamento con sostanze riducenti; iii) avere una massa superiore a 300 kDa e compresa tra 300 e 350 kDa misurata su un gradiente di glicerolo tra il 10% ed il 40%.

Oltre a questi aspetti strutturali è stato inoltre riscontrato che i complessi tra Grp94 e IgG hanno attività biologiche inaspettate.

Infatti, i complessi hanno dimostrato di:

- 1) stimolare la crescita cellulare e la differenziazione di cellule endoteliali, con formazione di strutture simili a capillari;
- 2) aumentare nello stesso tipo cellulare l'espressione di HSP70 e HSP90 associata a modifiche strutturali del citoscheletro con formazione di podosomi;
- 3) indurre nello stesso tipo cellulare l'espressione di IgG;
- 4) stimolare la proliferazione di linfociti umani a cui si associa una significativa produzione di IgG.

Mediante analisi di "dot-blot" si è potuto verificare che è la Grp94 nativa non denaturata che reagisce con le IgG umane formando un legame stabile, ma non quella denaturata, per esempio dopo bollitura. Il legame stabile tra Grp94 ed IgG si forma quindi solo con la Grp94 nativa intatta. Da questa analisi si è poi potuto verificare che il complesso Grp94-IgG che si forma è non-immune, essendo le IgG impiegate pre-immuni. Inoltre con l'analisi della velocità di sedimentazione su gradiente di glicerolo dal 10% al 40%, si è potuto anche verificare che i complessi Grp94-IgG dell'invenzione hanno una massa compresa tra 300 e

350kDa e che tali complessi sono stabili anche dopo trattamento con sostanze riducenti, come il β -mercaptoetanololo e bollitura.

Questi complessi inoltre determinano importanti effetti biologici che comprendono la stimolazione della crescita e la differenziazione delle HUVEC, che subiscono una trasformazione di tipo angiogenetico. Inoltre, sulle stesse cellule endoteliali i complessi stimolano l'espressione delle HSP70 e HSP90 ed hanno un notevole effetto proliferativo su linfociti umani già a concentrazioni molto basse (1 ng/ml). L'andamento della stimolazione della proliferazione dei linfociti è simile a quanto visto sulle HUVEC e richiama l'andamento prodotto da fattori di crescita diversi che danno una stimolazione della crescita cellulare in un intervallo piuttosto stretto di concentrazioni, provocando l'effetto massimo a concentrazioni particolarmente basse. A questa stimolazione sui linfociti è associata inoltre una produzione significativa di IgG ad una concentrazione del complesso Grp94-IgG di 10 ng/ml.

Gli effetti riscontrati con i complessi sono sovrapponibili a quelli prodotti da citochine e risultano quindi significativi per un utilizzo *in vivo*, in quanto sfruttabili ai fini di modulare la risposta immunitaria.

Sulla base dei risultati ottenuti, e qui di seguito descritti in dettaglio, si può prevedere un importante impiego di tipo terapeutico dei complessi dell'invenzione come immunomodulatori nelle patologie in cui si richieda la stimolazione della risposta immunitaria, allorché questa sia deficitaria o insufficiente (malattie tumorali, infezioni, depressione immunitaria dovuta a cause diverse), o una sua inibizione, allorché vi sia un'eccessiva stimolazione, come nelle malattie autoimmunitarie.

In particolare, i complessi di Grp94 con IgG umane possono essere impiegati come immunomodulatori nella terapia vaccinale per i tumori, operando alla stregua di potenti citochine e specifici antigeni che evocano una risposta immunitaria di tipo umorale e cellulare. Infatti, la somministrazione di complessi di Grp94 con IgG umane non-immuni può avere il vantaggio di veicolare l'antigene (Grp94) direttamente combinato con l'adiuvante (IgG) con la capacità di evocare la produzione di anticorpi diretti specificamente contro la Grp94 (e quindi Ac che riconoscono la Grp94 circolante e/o espressa a livello di membrana cellulare, soprattutto su cellule tumorali). Rispetto all'uso che attualmente si fa, anche nella sperimentazione animale, della Grp94 complessata con peptidi di varia natura, allo scopo di indurre una maggiore risposta immune contro le cellule tumorali, l'impiego di Grp94 con IgG umane, secondo l'invenzione, ha il vantaggio di combinare l'effetto di potenziamento della risposta immune con l'effetto differenziativo che il complesso come tale può produrre su cellule diverse, comprese quelle dell'immunità.

Inoltre, i complessi dell'invenzione Grp94-IgG possono essere impiegati anche come immunomodulatori nella terapia vaccinale "negativa" per le malattie autoimmuni, determinando l'inibizione della risposta immunitaria che in questo caso è esaltata ed autodiretta. Il presupposto su cui si basa tale impiego è che gli stessi complessi di Grp94 con IgG si possono formare in concentrazione più elevata e molto precocemente in pazienti con una risposta immunitaria autodiretta, come ad esempio nei diabetici di tipo 1, dando luogo ad una intensa risposta immune. Uno dei

meccanismi con cui si potrebbe ottenere un arresto del processo autoimmune, prevede la somministrazione di dosi adeguate dell'antigene (costituito in questo caso dallo stesso complesso) in una fase della malattia in cui vi è un'intensa attivazione della risposta immunitaria sostenuta da una specifica sottopopolazione di linfociti di tipo infiammatorio, i Th1. In queste condizioni, si può prevedere lo "shift" nella popolazione di linfociti, da infiammatori Th1 a quelli responsabili dell'induzione della tolleranza, i Th2 (Ghoreschi K., Trends Mol. Med., 2003; 9:331; Steinman R.M. J. Clin. Inv., 2002; 12:1519).

Agli scopi terapeutici, quindi, i complessi GRP94-IgG dell'invenzione possono essere utilmente impiegati nel trattamento preventivo o terapeutico come immunostimolanti in patologie con risposta immune deficitaria come le patologie tumorali, infettive e causate da depressione immunitaria di varia origine, o come immunoadiuvanti in malattie autoimmuni in composizioni farmaceutiche con eccipienti o diluenti farmaceuticamente accettabili. Allo scopo, i complessi possono essere preparati in formulazioni farmaceutiche adatte alla somministrazione per via parenterale e/o enterale (non per bocca in quanto proteine), sistemica e/o locale anche in adatti dispositivi a rilascio controllato. Le formulazioni in questione possono essere preparate secondo metodi noti o anche nuove tecnologie farmaceutiche, utilizzando biomateriali innovativi, materiali di supporto, eccipienti, diluenti, emulsificanti, veicoli acquosi od oleosi o polimerici etc., comunque accettabili per l'impiego farmaceutico.

Le forme impiegabili per via parenterale possono essere tutte le usuali forme farmaceutiche, come, fiale contenenti il principio attivo in soluzione o sospensione, oppure in forma liofilizzata, sciolto o disperso, da sciogliere o disperdere al momento della somministrazione in veicoli acquosi od anche oleosi, in soluzioni tamponate o contenenti adeguati sospendenti.

La quantità di principio nella(e) formulazione(i) specifica(che), come pure il dosaggio a scopo terapeutico, varieranno in funzione della gravità ed estensione della patologia in atto, dall'entità del rischio di sviluppare la patologia stessa, dalle condizioni generali del paziente e dal suo peso corporeo, e potrà essere compresa fra 0.02 mg/Kg e 5 mg/Kg, in somministrazione giornaliera unica o refratta, ad intervalli di tempo diversi, per cicli successivi.

Date le premesse che: a) nel plasma dei diabetici, come pure in altre condizioni infiammatorie, sia acute che croniche, circolano, indipendentemente dalla durata della malattia ed in proporzione diversa fra soggetto e soggetto, Ac anti-Grp94, anti- HSP70 e anti-HSP90 (Ac idiotipici o primari); b) nel plasma di soggetti diabetici di tipo 1 circolano anche Ac anti-complesso (Grp94-IgG) (anti-idiotipici o secondari) verso il complesso immune di Grp94 con IgG), ne consegue che gli Ac idiotipici come pure gli anti-idiotipici sono indici di uno stato infiammatorio correlato con uno scompenso della risposta immunitaria. La rilevazione di tali Ac, preferibilmente anti-idiotipici contro il complesso Grp94-IgG immune, come anche Ac idiotipici contro la sola Grp94, può quindi essere sfruttata come marker diagnostico e prognostico dello stato

infiammatorio che si associa a patologie di natura diversa. La rilevazione di questi Ac trova utile indicazione nelle fasi precoci, di sviluppo, e nelle fasi di evoluzione o remissione di malattie dismetaboliche diverse, come il diabete e varie forme di dislipidemie, nell'ipertensione arteriosa, nell'arteriosclerosi grave, nelle malattie autoimmunitarie, come il lupus eritematoso, l'artrite reumatoide ed allergie gravi, nelle malattie infettive in cui sia stato dimostrato un ruolo eziopatogenetico della Grp94 nell'insorgenza di reazioni infiammatorie a livello vascolare (infezioni da *Mycobacterium tuberculosis*, *Clamidia*, virus diversi).

Pertanto, i complessi dell'invenzione possono essere utilmente impiegati anche a scopo diagnostico in kit di tipo ELISA finalizzati alla misurazione quantitativa soprattutto di Ac anti-idiotipici che riconoscono come antigene il complesso immune Grp94-IgG, mentre la Grp94 denaturata può essere impiegata come antigene per la rilevazione di anticorpi idiotipici anti-Grp94.

La rilevazione degli anticorpi essere fatta seguendo due differenti approcci:

- a) ricerca di Ac anti-idiotipici che riconoscono il complesso immune Grp94-IgG mediante l'impiego dei complessi dell'invenzione immobilizzati su resina, in cui tali complessi sono immobilizzati tramite un legame tra la parte libera della IgG e la resina stessa;
- b) ricerca di Ac idiotipici che riconoscono la Grp94 mediante l'impiego di una Grp94 denaturata.

Per quanto riguarda il punto a) la determinazione può essere eseguita su plasma e/o siero secondo il metodo di seguito riportato:

- preparazione del plasma e/o siero da sangue di un soggetto su cui effettuare la misura del marker dello stato infiammatorio;
- passaggio del plasma e/o siero su una colonna di resina su cui è legato il complesso Grp94-IgG mediante un legame IgG/resina ed esposizione quindi della Grp94 legata alla IgG assieme ad una porzione libera di IgG;
- distacco degli anticorpi anti-idiotipici legati al complesso immobilizzato sulla resina e loro eluizione con opportuno tampone a pH acido;
- rilevazione degli anticorpi negli eluati con opportune metodiche standard.

Per quanto riguarda il punto b) la determinazione può essere eseguita su plasma e/o siero secondo il metodo di seguito riportato:

- preparazione del plasma e/o siero di un soggetto su cui effettuare la misura del marker dello stato infiammatorio;
- incubazione del plasma e/o siero in pozzetti in cui è stata fatta aderire la Grp94 denaturata;
- rilevazione della reazione tra antigene e Ac idiotipici con opportune metodiche standard.

Il kit diagnostico per la determinazione della concentrazione di anticorpi anti-idiotipici contro complesso immune Grp94-IgG e/o anticorpi idiotipici contro Grp94 potrà comprendere almeno: un contenitore contenente complessi dell'invenzione Grp94-IgG, opzionalmente marcati,

immobilizzati su resina tramite un legame tra IgG e la resina stessa, e/o un contenitore contenente Grp94 denaturata, opzionalmente marcata, un contenitore contenente un plasma e/o siero di controllo ed un foglietto illustrativo.

Di seguito viene descritta in dettaglio la preparazione dei complessi dell'invenzione e la loro caratterizzazione sia strutturale che biologica.

Parte sperimentale

A-Preparazione dei complessi Grp94-IgG umane

Per la preparazione dei complessi si è proceduto in prima istanza alla purificazione della Grp94 da frazioni microsomiali di fegato di ratto. Tali frazioni erano passate poi su colonne di DEAE-Sepharose e Heparin-Sepharose. Il picco contenente Grp94 era eluito dalla colonna di Heparin-Sepharose con NaCl 0.5M e quindi nuovamente cromatografato su colonna FPLC-Superdex 200 (10mmx300mm), precedentemente equilibrata con un tampone A (Tris-HCl 20 mM, pH 7.5, magnesio acetato 5 mM, EGTA 1mM, β -mercaptoetanololo 10 mM, Triton X-100 0.1%, glicerolo 10%, PMSF 0.05 mM, NaN_3 0.02%) contenente NaCl 500 mM. Le frazioni (0.2 ml ciascuna) erano eluite alla velocità di flusso di 0.4ml/min. Le frazioni contenenti Grp94 erano quindi raccolte e passate su una colonna di Con A-Sepharose (5 ml), precedentemente equilibrata con tampone B (Tris-HCl 20 mM, pH 7.5, magnesio cloruro 1 mM, calcio cloruro 1 mM, β -mercaptoetanololo 10 mM, glicerolo 10%, PMSF 0.05 mM). La Grp94 era successivamente eluita con tampone B addizionato di α -D- metilmannoside e la sua purezza testata in Western "blotting" con anticorpi specifici.

Le frazioni di Grp94 erano successivamente dializzate su membrane di dialisi Spectrapor con taglio molecolare di 3,500 Da e la dialisi era condotta per tutta la notte a 4°C contro tampone (Tris-HCl 20 mM, pH 7.5). Le soluzioni erano concentrate mediante ultrafiltrazione e le proteine erano misurate con il metodo di Bradford (Bradford M.M. Anal. Biochem, 1976; 72:248-254). Aliquote da 50µl erano conservate pronte per l'uso a -20°C.

Le IgG utilizzate sono di provenienza commerciale e la loro purezza è stata controllata mediante Western "blotting" usando sia Ac policlonali contro IgG umane intere, Ac policlonali anti-Fab e Ac monoclonali specifici per la catena γ di topo.

I complessi tra Grp94 ed IgG umane non-immuni erano preparati incubando le due sostanze ad un rapporto molare di 1:1 a 37°C per un'ora, usando come solvente acqua bidistillata (pH 6.5, volume finale di incubazione di 100 µl).

B- Caratterizzazione dei complessi Grp94-IgG umane: analisi "dot-blot", SDS PAGE e Western blotting, velocità di sedimentazione su gradiente di glicerolo

1. analisi "dot-blot": di seguito è descritta in dettaglio la metodica per la caratterizzazione dei complessi Grp94-IgG umane preparati *in vitro* come sopra descritto ed i risultati ottenuti con riferimento alla fig. 1(A).

Grp94 nativa (2 µg, 10 µl) era posta su membrane di Immobilon precedentemente immerse in metanolo (1 min), risciacquate in acqua bi-distillata (1 min) e lasciate asciugare (3 min). La soluzione di Grp94 era usata come tale, senza trattamento, come pure dopo bollitura per 2 min,

in doppio: per ogni tipo di soluzione, uno “spot” di Grp94 serviva da controllo mentre l'altro veniva incubato con IgG (trattamento). In particolare, dopo l'asciugatura delle gocce di Grp94, le membrane erano lasciate in soluzione di BSA (1%) e Tween (0.2%) per tutta la notte, lavate al mattino ripetutamente con soluzione di TBS (per 1h). Le membrane con lo “spot” di controllo erano messe nel solo tampone (TBS) mentre quelle destinate al trattamento erano immerse in una soluzione di IgG umane non immuni (4 μ g/ml) per 8 h. Le membrane erano poi lavate con TBS (per 1 h) e incubate con l'Ac primario (2.5 μ g/ml di IgG da pecora dirette contro IgG umane) per tutta la notte. Dopo i lavaggi con TBS (per 1 h), le membrane erano messe nella soluzione di Ac secondari (IgG da asino dirette contro IgG di pecora) per 1 h e, dopo ripetuti lavaggi in TBS per 1 h, saggate con la soluzione di sviluppo. Nella figura 1(A) si vedono gli “spot” di Grp94 che risultano positivi per IgG, ad indicare la presenza di un legame stabile che si forma soprattutto con Grp94 non sottoposta a bollitura, mentre i controlli relativi (di Grp94 trattata con soli Ac primari e secondari) rivelano una debolissima o nulla positività. Si nota anche che Grp94 bollita non reagisce più significativamente con le IgG umane; tale risultato dimostra che la formazione del complesso con le IgG può avvenire solo quando la Grp94 mantiene la sua conformazione nativa.

2. SDS-PAGE e Western “blotting”: di seguito è descritta in dettaglio la metodica per la caratterizzazione dei complessi Grp94-IgG umane preparati *in vitro* come sopra descritto ed i risultati ottenuti con riferimento alla fig.1(B).

Nell'elettroforesi (gel al 10 % di acrilamide) sono stati caricati in ogni corsia 2.5 μ g di Grp94 nativa senza trattamento riducente e bollitura. Si nota che Grp94 è presente in due bande a 105 e 92 kDa che rappresentano le specie di Grp94 a diverso grado di glicosilazione. Infatti, sottoponendo la Grp94 al trattamento con N-glicosidasi F (che rimuove i residui saccaridici legati ai residui di asparagina della glicoproteina) si nota che la banda a 105 kDa ha una mobilità maggiore e si focalizza a 104 kDa, massa compatibile con la rimozione di sei residui di mannosio (dati non mostrati). Dopo incubazione, la Grp94 mantiene la stessa mobilità della soluzione fresca, mentre dopo incubazione con IgG si nota che sia la banda principale a 105 kDa, e soprattutto quella a 92 kDa, sono notevolmente ridotte di intensità. Tale effetto è ancor più evidente nel "blotting" con Ac anti-Grp94 e suggerisce il possibile coinvolgimento del monomero di Grp94 (soprattutto quello con minor grado di glicosilazione) nel legame con le IgG. Il corrispondente "blotting" con Ac anti-IgG dimostra in effetti che nella soluzione di Grp94 con IgG compare una banda a circa 100 kDa che non è presente nel controllo di sole IgG incubate (freccia).

3. velocità di sedimentazione su gradiente di glicerolo: di seguito è descritta in dettaglio la metodica per la caratterizzazione dei complessi Grp94-IgG umane preparati *in vitro*, come sopra descritto, ed i risultati ottenuti con riferimento alla fig.1(C).

L'esperimento di analisi della velocità di sedimentazione è stato condotto su soluzioni di Grp94 da sola e in presenza di IgG (al rapporto molare di 1:1) incubate a 37°C per 1h. Le soluzioni sono state poi sottoposte a

centrifugazione in gradiente di glicerolo (10-40%) in soluzione tampone Hepes (pH 7.4) con EDTA 1 mM e ditiotreitolo 1 mM. Specificamente, un'aliquota di 240 μ l di soluzione (di Grp94 sola, Grp94 con IgG e di IgG sole) contenente 100 μ g proteine è stata aggiunta alla superficie della soluzione di glicerolo (900 μ l di glicerolo per ogni percentuale di gradiente), messa in tubi da ultracentrifuga in volume finale di 3600 μ l. Dopo centrifugazione a 100,000xg per 18h in un rotore Beckman (SW 60Ti) a +4°C, il gradiente è stato separato in 18 frazioni da 200 μ l ciascuna, analizzate in elettroforesi (10% gel di acrilamide) dopo trattamento riducente e bollitura, seguita poi da Western "blotting" con Ac anti-Grp94 e Ac policlonali anti-IgG. In un esperimento separato, sempre su gradiente di glicerolo, sono state sottoposte a centrifugazione anche le soluzioni delle proteine standard usate per calcolare la massa del complesso (proteine a 62 kDa, 150 kDa, 443 kDa e 669 kDa). La metodica dell'analisi della velocità di sedimentazione viene correntemente usata per la determinazione della massa di complessi proteici diversi (Tanahashi N., et al. J. Biol. Chem., 2000; 275:14336-345; Tibaldi E., et al. Cell. Mol. Life Sci. 2006; 63:378-389; Hirano Y., et al. Nature, 2005; 437:1381-85) analogamente alla gel filtrazione.

L'analisi dell'"immunoblotting" con Ac anti-Grp94 sulle singole frazioni ha rivelato che la Grp94 incubata da sola forma dei complessi sopramolecolari che hanno il loro picco nella frazione n°6 che, sulla base delle proteine di calibrazione, corrisponde a circa 200-300 kDa. Questo è in linea con il dato, già noto, della tendenza a formare dimeri e complessi ancor più grossi da parte della Grp94 da sola. Come si può notare dalla

figura 1(C), comunque, il monomero di Grp94 risulta facilmente staccabile dai complessi e lo si vede nella forma di 2 bande principali, a 104 e 95 kDa circa (dopo trattamento con β -mercaptoetanololo), corrispondenti a quelle della forma nativa, e relative ad un diverso grado di glicosilazione in cui si trova la molecola al momento della purificazione dagli epatociti (vedi sopra). In presenza di IgG, invece, il picco dei complessi di Grp94 corrisponde alla frazione n°7 che sedimenta ad un gradiente maggiore e quindi dimostra la presenza nella frazione di complessi ad una massa maggiore di quella riscontrata con Grp94 da sola (massa > 300 kDa). Inoltre, a differenza di quanto osservato con Grp94 sola, il "blotting" sulle frazioni di Grp94+IgG rivela la presenza di Grp94 ad una massa elevata, giustificabili solo dalla presenza di un complesso con IgG che risulta anche irreversibile (la banda a circa 210 kDa si nota in presenza di β -mercaptoetanololo e bollitura). E' da notare anche che la banda a circa 94 kDa della Grp94 scompare dopo incubazione con IgG come se fosse la specie responsabile del legame con IgG. Tale dato è anche confermato dalla elettroforesi (gel al 10% di acrilamide ed in assenza di β -mercaptoetanololo) dei campioni incubati e non sottoposti a centrifugazione in gradiente. Dalla figura relativa infatti si può notare che mentre le bande della Grp94 a peso molecolare inferiore sono presenti nella soluzione fresca e, seppur con intensità minore, anche dopo incubazione in assenza di IgG, dopo incubazione con IgG invece le bande scompaiono e rimane visibile solo la specie di Grp94 a circa 104 kDa.

I numeri sotto i “blotting” corrispondono alle frazioni raccolte, mentre quelli al di sopra rappresentano le masse delle proteine standard usate per stabilire la massa del complesso sedimentato. A destra dei “blotting” sono riportate le masse delle bande di Grp94 positive con Ac anti-Grp94. Si nota che in ogni frazione della soluzione di controllo di Grp94 da sola sono presenti sempre le due bande di Grp94 (come visto per la soluzione incubata ed analizzata come tale prima del frazionamento su gradiente di glicerolo), mentre dopo incubazione con IgG scompare la banda a 92 kDa. Inoltre, il picco della densità ottica delle bande di Grp94, misurata su ogni frazione, risulta sfasato verso le masse più elevate per la soluzione di Grp94 dopo incubazione con IgG (frazione n°7 del grafico riportato sotto i “blotting”) rispetto a quello misurato su soluzione di Grp94 sola (frazione n°6), a testimoniare che fra Grp94 ed IgG si è formato un complesso che sedimenta ad un gradiente di glicerolo maggiore di quello cui sedimenta la Grp94 sola. Si può anche notare che dal complesso la Grp94 si può staccare ed evidenziare come monomero a 105 kDa sotto azione del trattamento riducente e bollitura, ma in parte rimane anche stabilmente legata alle IgG come dimostrato dalla banda ad altissimo peso molecolare (> di 200 kDa) presente nelle frazioni che sedimentano più velocemente, assente invece nella soluzione di Grp94 di controllo.

C- Caratterizzazione dell'attività biologica dei complessi Grp94-IgG umane: effetti su cellule endoteliali HUVEC e su linfociti

1. effetti di stimolazione della crescita e differenziazione cellulare su HUVEC

Di seguito sono descritti in dettaglio la metodica seguita per la caratterizzazione biologica dei complessi Grp94-IgG umane preparati *in vitro* ed i risultati ottenuti con riferimento alla fig. 2.

Le cellule sono state fatte crescere in terreno addizionato di siero bovino fetale al 10% e dopo un periodo di quiescenza di 8-10 ore in assenza di siero è stato sostituito il terreno con un'aliquota di terreno fresco (2 ml) cui sono state aggiunte le soluzioni di Grp94 (concentrazione finale di 1 e 10 ng/ml) da sola ed in complesso con IgG (rapporto molare di 1:1). Dopo incubazione a 37 °C per 20 h, il terreno è stato aspirato e le cellule staccate dai pozzetti di controllo e con trattamento (ognuno in doppio) sono state contate nella camera di Bürker. La vitalità cellulare è stata valutata mediante il metodo di esclusione del colorante "trypan blue" che penetra nelle cellule con alterata permeabilità della membrana mentre le cellule vive lo escludono.

Con riferimento alla fig. 2 i risultati ottenuti sono qui di seguito riportati. Gli istogrammi di fig. 2(A) mostrano la stimolazione della crescita cellulare rispetto alle cellule di controllo senza IgG ($97.38 \pm 5.9 \times 10^3$), non sostanzialmente diverse per numero da quelle con aggiunta di sole IgG ($96.33 \pm 5.43 \times 10^3$). Gli istogrammi di fig. 2(B) mostrano la crescita cellulare nelle colture in cui è stato aggiunto l'inibitore U0126 (10 μ M, concentrazione finale); le cellule di controllo sono state trattate con il solo solvente in cui è stato diluito l'inibitore (DMSO 0.1%) mentre negli altri pozzetti l'inibitore è stato aggiunto 30 min prima dell'aggiunta di Grp94 sola (10 ng/ml) e in complessi con IgG. Il numero delle cellule di controllo in assenza e presenza dell'inibitore era di $98.01 \pm 5.4 \times 10^3$ e $80.38 \pm$

4.02×10^3 , rispettivamente. Gli asterischi sugli istogrammi vuoti e con griglia indicano le differenze statisticamente significative (*, $p < 0.05$) e molto significative (**, $p < 0.01$) rispetto ai corrispondenti controlli.

La rilevazione al microscopio ottico (fig.2(C)) della trasformazione angiogenetica delle HUVEC dopo trattamento con Grp94 (10 ng/ml), da sola ed in complessi con IgG, in assenza e presenza dell'inibitore U0126, mostra che le strutture simil-tubulari indotte dalla Grp94 sola (pannello **b**) ed in complessi con IgG (pannello **c**) non sono significativamente modificate dalla presenza dell'inibitore (pannelli **e**, **f**), mentre sono significativamente differenti dalla morfologia normale, a ciottolato, delle HUVEC di controllo (pannello **a**). Si nota anche che l'inibitore da solo provoca una modificazione della normale morfologia delle HUVEC, che assumono un aspetto di trasformazione pre-angiogenetica (pannello **d**).

2. effetti di induzione dell'espressione di HSP70 e HSP90 nelle HUVEC

Di seguito è descritta in dettaglio la metodica ed i risultati ottenuti con riferimento alla fig. 3(A) dopo l'incubazione di 20h a 37°C in presenza di Grp94 (10 ng/ml) da sola e in complessi con IgG, con e senza inibitore U0126 (10 μ M, concentrazione finale). Allo scopo le cellule sono state staccate dai pozzetti e trattate con la soluzione lisante (Tris-HCl 50 mM, pH 8.9, EDTA 5 mM, glicina 380 mM, SDS 2%, β -mercaptoetanololo 7 mM). Il lisato cellulare intero è stato analizzato in SDS-PAGE (gel di acrilamide al 10%) seguito da Western "blotting" con Ac anti-HSP90, anti-HSP70 e anti-IgG umane. Nei pozzetti del gel è stata caricata la

stessa quantità di proteine, stabilita sulla base dell'analisi densitometrica delle bande principali comuni a tutti i lisati nell'elettroforesi. Le frecce a sinistra dei tracciati indicano le bande che sono presenti alla stessa altezza anche nei tracciati a destra. Si nota che, mentre HSP90 non compare nei lisati di controllo ma solo in quelli di cellule stimulate con Grp94, da sola e in complesso con IgG, HSP70 è presente in una forma costitutiva a circa 100 kDa in ogni lisato, ma solo in quelli trattati si osserva la presenza aggiuntiva di bande riferibili alle forme inducibili dell'HSP70. E' da sottolineare il fatto che le bande positive per IgG si riscontrano per la maggior parte alla stessa altezza di quelle positive per HSP70 e che, analogamente a quanto visto per HSP70 sotto stimolazione di Grp94, soprattutto in complessi con IgG, compaiono delle bande addizionali ad elevato peso molecolare. In presenza dell'inibitore, il dato più importante da rilevare è che l'espressione dell'HSP90 viene completamente bloccata, mentre HSP70 ed IgG rimangono presenti nei lisati in presenza di trattamento, e quasi esclusivamente nelle bande ad alto peso molecolare. I "blotting" mostrati sono rappresentativi di tre esperimenti differenti fatti sugli stessi campioni in tempi diversi.

Analoga analisi è stata eseguita sui terreni delle colture di cellule sottoposte poi a lisi (vedi esperimenti riportati sopra). I terreni dei pozzetti sono stati raccolti, centrifugati per rimuovere i detriti cellulari, dializzati estesamente, liofilizzati ed analizzati in SDS-PAGE (gel di acrilamide al 10%) seguita poi da Western "blotting" con Ac anti-HSP90, anti-HSP70 ed anti-IgG umane (come sopra, per i lisati cellulari). Come si può osservare dalla fig. 3(B), nei terreni dei controlli non vi è alcuna

positività per le proteine saggiate, mentre dopo stimolazione con Grp94, soprattutto in complessi con IgG, si nota la maggior positività per tutte e tre le proteine, in bande che corrispondono in parte a quelle presenti nei corrispondenti lisati. In particolare, si deve rilevare che le forme secrete di HSP90, HSP70 ed IgG sono solo quelle indotte dal trattamento con Grp94, soprattutto in complessi con IgG.

4. effetti morfologici secondari alla stimolazione dell'espressione di HSP70 e HSP90 in HUVEC: di seguito è descritta in dettaglio la metodica ed i risultati ottenuti con riferimento alla fig. 4.

Le cellule sono state coltivate in terreno privo di siero e lasciate senza trattamento (controllo, pannelli **a**) o trattate con Grp94 da sola (10 ng/ml) (pannelli **b**) e con Grp94 in complessi con IgG (pannelli **c**), secondo le modalità specificate sopra. In fig. 4(A) si vede la fluorescenza (verde) evidenziata al microscopio confocale prodotta dalla reazione degli Ac diretti contro HSP90 nei controlli e nei trattati (pannelli a,b,c a sinistra); l'espressione dell'HSP90 è notevolmente aumentata nelle cellule trattate con Grp94, specialmente in complessi con IgG, in cui si nota anche la comparsa di un maggior numero di podosomi (indicati nei pannelli di fusione della fluorescenza con le frecce) ed un incremento drammatico dei filamenti di actina (pannelli centrali, blu). E' evidente la co-localizzazione intra-cellulare e soprattutto nei podosomi dei filamenti di actina con HSP90 che dà luogo ad un colore azzurro della fluorescenza di fusione fra il verde (della sola HSP90) ed il blu (della sola actina) (pannelli di destra). In fig. 4(B) si vede la fluorescenza relativa ad HSP70 in seguito alla reazione con Ac specifici anti-HSP70, analogamente a

quanto rilevato in (A) per HSP90. Anche per HSP70 si nota un incremento della fluorescenza dovuta al trattamento (pannelli **b** e **c**) anche se la sua localizzazione intra-cellulare non è così diffusa come quella dell'HSP90 e si trova prevalentemente concentrata lungo il bordo cellulare ed al polo di trascinamento. Le punte delle frecce sia in (A) che (B) indicano la zona che è stata ingrandita per sottolineare le modificazioni strutturali (inserti nei pannelli a destra).

Anche se il risultato di stimolazione della proliferazione delle HUVEC e la loro marcata differenziazione verso il fenotipo angiogenico (formazione di nuovi vasi) può essere interpretata come un effetto negativo ai fini di un possibile sviluppo di alterazioni vasali che nel tempo si traducono in patologia conclamata, tale effetto, se esteso ad altri distretti e su altri tipi cellulari, può avere un significato opposto. Considerando, infatti, che le cellule endoteliali vasali, e soprattutto quelle di origine ombelicale, hanno caratteristiche proprie delle cellule dell'immunità nativa (hanno origine da un comune precursore midollare) (Wallin RPA et al. Trends Immunol. 2002; 23:130-135), si può ragionevolmente pensare che gli effetti evidenziati sulle HUVEC possano essere estesi anche alle cellule dell'immunità, in particolar modo ai linfociti, sui quali l'effetto proliferativo e differenziativo potrebbe essere sfruttato nel senso di determinarne la differenziazione a plasmacellule ed alla produzione di immunoglobuline, quindi ad incrementare la risposta immunitaria.

Allo scopo di valutare questo effetto sono stati condotti degli esperimenti su linfociti umani di seguito descritti.

5. effetti di stimolazione della proliferazione di linfociti umani:

La separazione di linfociti umani era effettuata mediante gradiente di Ficoll-Paque. Da un prelievo di sangue di 250 ml si ottengono per centrifugazione 25 ml (circa) di “buffy coat” (concentrato di globuli rossi, bianchi e piastrine) corrispondenti a 300-600 milioni di PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) (1 milione/ml di sangue).

Il “buffy coat” si versa in una provetta Falcon da 50 ml e si aggiunge terreno RPMI per un volume pari alla metà del volume del “buffy coat”.

La separazione di PBMC su Ficoll prevede la preparazione (sotto cappa) della soluzione di Ficoll in aliquote conservate a +4 C° ed al buio. In provette Falcon da 14 ml si versano 4 ml di Ficoll a temperatura ambiente su cui si stratificano goccia a goccia 5 ml di “buffy coat”. Si centrifuga a 600xg per 30 min in centrifuga con braccio oscillante (decelerazione della centrifuga senza freno). Si recupera con una pipetta Pasteur l'anello formatosi all'interfaccia Ficoll/plasma che contiene i PBMC (i globuli rossi precipitano al fondo). Le frazioni così raccolte vengono messe in una provetta Falcon da 50 ml cui si aggiunge terreno RPMI fino a 50 ml. Si centrifuga a 600xg per 15 min, si elimina il supernatante e si lava il “pellet” per altre 2 volte con RPMI fino a 50 ml, centrifugando a 300xg per 10 min. Si risospende il pellet con RPMI a 50 ml.

La conta dei linfociti e cellule mononucleate si effettua diluendo (in diluizioni progressive a partire da quella di partenza) 50 µl della soluzione cellulare in 250 (finali) di colorante di Türk (in acido acetico).

La conta delle cellule si fa in una camera conta-globuli comune.

Si seminano 2×10^6 PBMC/ml (1ml/well) in piastra a fondo piatto da 24 o 48 pozzetti (rispettivamente, da 2 e 1ml/pozzetto).

Si aggiunge un controllo con 100 μ g/ml (concentrazione finale) di puromicina (per il blocco della sintesi proteica) utile per evidenziare il background di Ac serici presenti e rimasti adesi aspecificamente alle cellule circolanti. Si allestisce anche un pozzetto in cui si aggiunge uno stimolo mitogenico standard (PWM della Sigma, diluire 1:50, v:v, diluizione finale nel pozzetto).

Si mantengono in coltura i linfociti per 2 settimane a 37°C, al 5% CO₂. Al termine, si verifica al microscopio che la coltura si sia mantenuta sterile. Si raccolgono le cellule dai pozzetti, e si effettua una conta del numero di cellule prelevando un'aliquota della sospensione cellulare, quindi si centrifuga per 10 min a 300xg. Dopo aver scartato il pellet, si conserva il supernatante di coltura a -20 °C fino al momento del test per la valutazione degli Ac prodotti dalle cellule.

I linfociti erano lasciati in coltura in assenza (controllo) e presenza di Grp94 da sola (1, 10 e 100 ng/ml), Grp94 in complessi con IgG e con IgG sole (alla concentrazione corrispondente al rapporto molare di 1:1 con Grp94), dopo incubazione per 1 h a 37°C. Dopo 14 giorni di incubazione della coltura cellulare, è stato prelevato il terreno e le cellule sono state contate. Nella figura 5 gli istogrammi rappresentano il numero delle cellule di controllo (con siero al 10%) ed in presenza delle sostanze indicate. Si nota che la stimolazione prodotta da Grp94 sola è dose-dipendente fino a 10 ng/ml (5% e 63% di stimolazione rispetto al valore del controllo per 1 e 10 ng/ml, rispettivamente), mentre a 100 ng/ml la

stimolazione sembra ridursi (47% rispetto al valore di controllo). Il dato significativo è che la maggior stimolazione si ottiene alla concentrazione più bassa di Grp94 in complessi con IgG (23% sul valore del controllo), mentre la stimolazione si riduce alle concentrazioni maggiori (22.4% e 6% a 10 e 100 ng/ml). Tale andamento richiama quello prodotto da fattori di crescita per i quali si individua un intervallo molto stretto di concentrazione in cui vi è l'attivazione mitogenica, mentre al di sotto e al di sopra di questo intervallo non si registra alcun effetto o un effetto molto debole. Le sole IgG non producevano alcun effetto proliferativo sui linfociti che, anzi, ad ogni concentrazione di IgG erano ridotti di numero rispetto al controllo.

6. effetti di produzione di IgG da linfociti umani:

Su piastra Optiplate (Packard) a fondo piatto (96 pzt da 200 µl ciascuno) si mettono 50 µl di soluzione di Ac anti-IgG (5µg/ml in tampone $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ pH 9.6) lasciando dei pozzetti con solo tampone di controllo. Si lascia seccare sotto cappa per tutta la notte e poi in ogni pozzetto si mettono 200 µl di PBS con BSA 3% e NaN_3 0.02% per la saturazione dei siti aspecifici degli Ac. Si lavano i pozzetti con PBS e poi si aggiunge il supernatante di ogni coltura di PBMC (come detto sopra nella coltura dei linfociti) dopo aver proceduto alla diluizione progressiva in PBS/BSA/ NaN_3 . Per la retta di taratura si usa una soluzione di IgG umane standard (sol. madre 2 mg/ml) da cui si fanno diluizioni progressive fino ad arrivare a conc. di 0.4 µg/ml. Come controlli si utilizzano pozzetti in cui vi è solo tampone senza Ac, mentre in altri si mette tampone con Ac. Dopo lavaggio dei pozzetti con 200 µl di PBS si

aggiungono 50 μ l di anti-human Ig-I¹²⁵ (radioattivo diluito 1 μ Ci/ml in PBS/BSA/NaN₃) e si lascia per 2 h. Dopo altri lavaggi con PBS, si asciuga la piastra e si distribuiscono 30 μ l di Microscint 20 per pozzetto. Poi si procede alla conta. I risultati della misurazione delle IgG su terreni da colture di linfociti dopo incubazione di 14 giorni a 37°C, sono mostrati in fig. 6. Si nota come l'andamento nella stimolazione della produzione di IgG con Grp94 sola ed in complessi con IgG sia analogo, raggiungendo il massimo di stimolazione in entrambi i casi a 10 ng/ml, mentre l'entità della stimolazione è significativamente maggiore per la Grp94 in complessi con IgG (659 cpm vs 316 cpm in presenza di Grp94 da sola).

RIVENDICAZIONI

1. Complessi Grp94-IgG umane non immuni caratterizzati dal fatto di:
 - presentare un legame stabile tra la Grp94 e le IgG non mediato dal sito di legame antigenico sulle IgG;
 - essere resistenti a processi di denaturazione;
 - avere una massa superiore a 300 kDa misurata su un gradiente di glicerolo tra il 10% ed il 40%.
2. Complessi Grp94-IgG umane non immuni, in cui la massa è compresa tra 300 e 350 kDa.
3. Complessi Grp94-IgG umane non immuni secondo la rivendicazione 1, in cui il rapporto molare tra Grp94 e IgG umane è compreso tra 0.5 e 1.
4. Complessi Grp94-IgG umane non immuni secondo la rivendicazione 1, in cui tali complessi sono ottenuti dall'incubazione di Grp94 con IgG umane non immuni in rapporti molarali compresi tra 0.5 e 1 alla temperatura compresa tra 30°C e 40°C per almeno un'ora in un solvente acquoso opzionalmente tamponato ad un pH compreso tra 6.5 e 7.4.
5. Complessi Grp94-IgG umane non immuni secondo la rivendicazione 4, in cui tali complessi sono ottenuti dall'incubazione di Grp94 nativa con IgG umane non immuni in rapporti molarali di 1:1 alla temperatura di 37°C.

6. Complessi Grp94-IgG umane, non immuni, secondo ciascuna delle rivendicazioni 1-5 per uso come immunostimolanti e/o immunoadiuvanti.
7. Complessi Grp94-IgG umane non immuni secondo la rivendicazione 6, per uso come immunostimolanti in patologie tumorali, infettive e causate da depressione immunitaria di varia origine.
8. Complessi Grp94-IgG umane non immuni secondo la rivendicazione 6, per uso come immunoadiuvanti in malattie autoimmuni.
9. Composizioni farmaceutiche contenenti come principio attivo complessi Grp94-IgG umane non immuni secondo ciascuna delle rivendicazioni 1-5 in combinazione con eccipienti e veicoli farmaceuticamente accettabili adatti per la somministrazione parenterale e/o enterale, sistemica e/o locale, a rilascio immediato o controllato anche in adatti dispositivi.
10. Metodo per l'immunostimolazione *ex vivo* di cellule isolate del sistema immunitario (linfociti, cellule dendritiche, cellule presentanti l'antigene) che comprende una co-incubazione *in vitro* tra tali cellule ed i complessi secondo le rivendicazioni 1-5 per almeno un'ora.
11. Metodo secondo la rivendicazione 10, in cui tali cellule isolate sono pre-selezionate per specificità di bersaglio e/o per la presenza di specifici marcatori di membrana prima della co-incubazione con i complessi.
12. Metodo secondo la rivendicazione 10, in cui tali cellule (alla concentrazione di 2 milioni/ml) sono co-incubate con i complessi a concentrazioni comprese fra 10 ng/ ml e 10 µg/ml.

13. Metodo per rivelare la presenza e/o la quantità di anticorpi anti-Grp94 e/o anti-complesso Grp94-IgG caratterizzato dal fatto di utilizzare i complessi secondo le rivendicazioni 1-5.
14. Metodo diagnostico secondo la rivendicazione precedente dove la presenza di tali anticorpi è indice di uno stato infiammatorio e/o di un danno tissutale correlati con uno scompenso della risposta immunitaria.
15. Metodo secondo le rivendicazioni 13-14 dove i complessi Grp94-IgG sono immobilizzati su resina ed anticorpi contro tali complessi sono separati da campioni di siero o di plasma ottenuti da sangue mediante affinità su fase solida.
16. Metodo secondo la rivendicazione 15 dove gli anticorpi anti-complesso immune Grp94-IgG sono inoltre eluiti e dosati.
17. Metodo secondo ciascuna delle rivendicazioni 13-16 dove gli anticorpi anti-complesso Grp94-IgG sono anti-idiotipici.
18. Metodo secondo ciascuna delle rivendicazioni 13-16 dove gli anticorpi anti-Grp94 sono idiotipici.
19. Kit diagnostico per la determinazione della presenza e/o della concentrazione di anticorpi anti-complessi Grp94-IgG e/o anticorpi anti-Grp94 per attuare il metodo secondo le rivendicazioni 13-18 comprendente almeno: un contenitore contenente complessi Grp94-IgG, opzionalmente marcati, immobilizzati su resina, e/o un contenitore contenente Grp94 denaturata, opzionalmente marcata, in combinazione con un contenitore contenente un plasma e/o siero di controllo, ed un foglietto illustrativo.

(pd/SL/EM)

8150PTIT

Notarbartolo & Gervasi S.p.A

Padova, 24 luglio 2007

p. PRIMIERO Paolo

Il mandatario

Silvana Lorenzi

Notarbartolo & Gervasi Spa

FIGURA 1

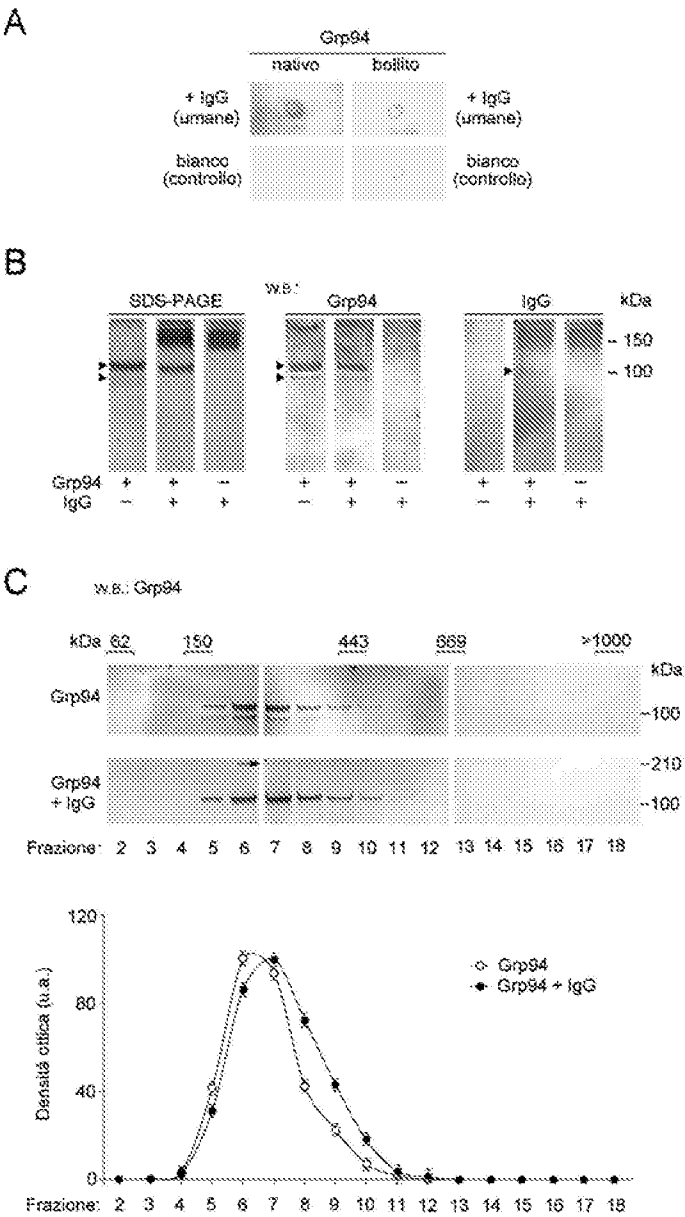


FIGURA 2

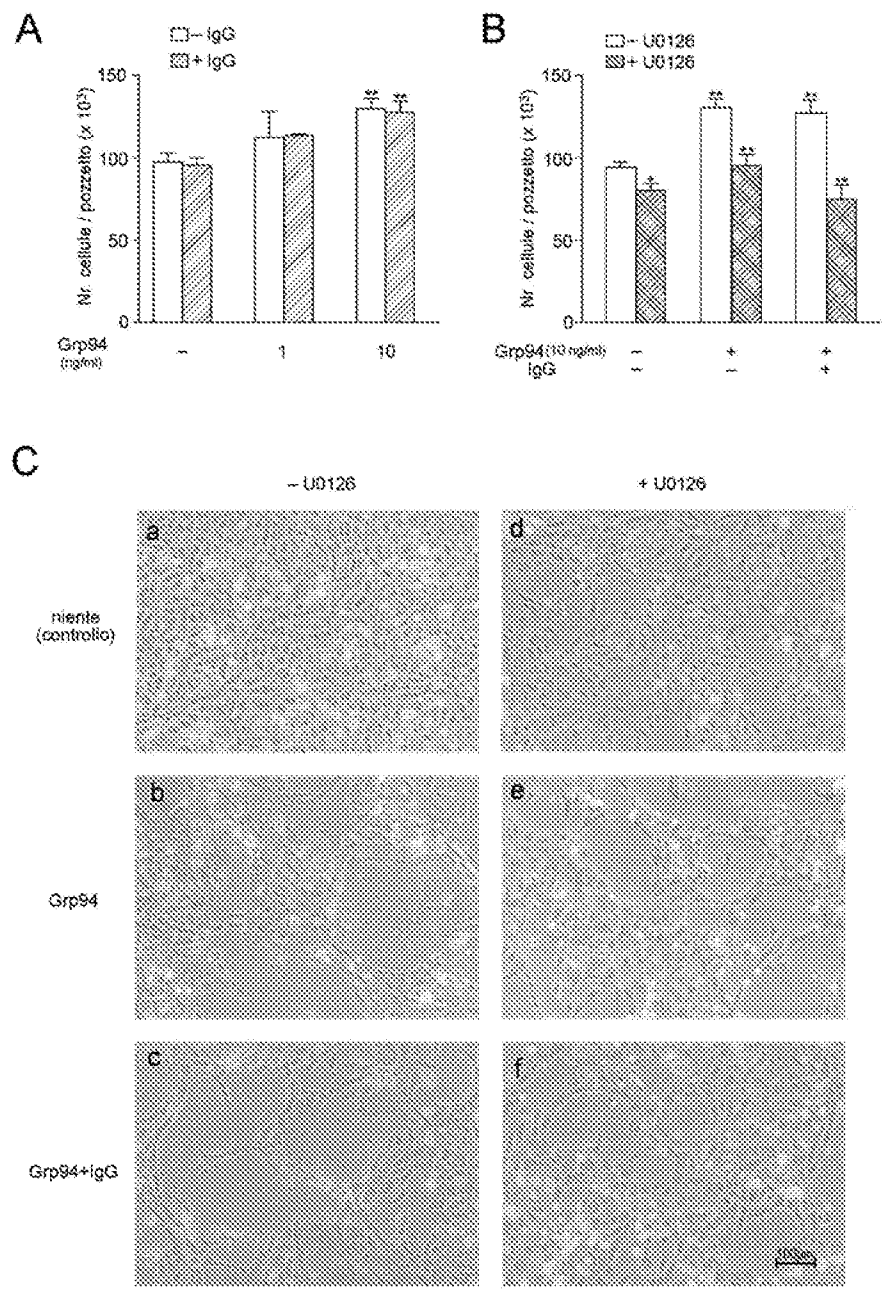
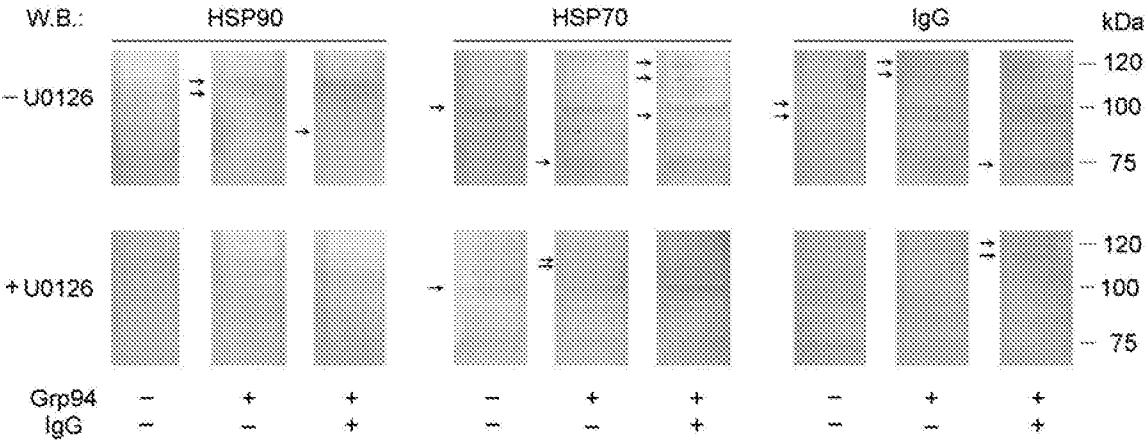


FIGURA 3

A



B

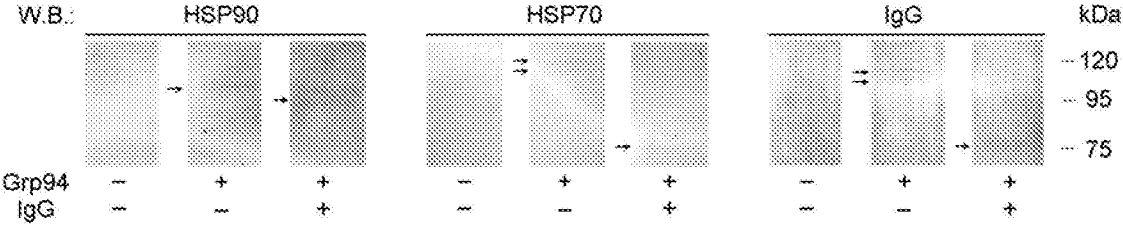


FIGURA 4

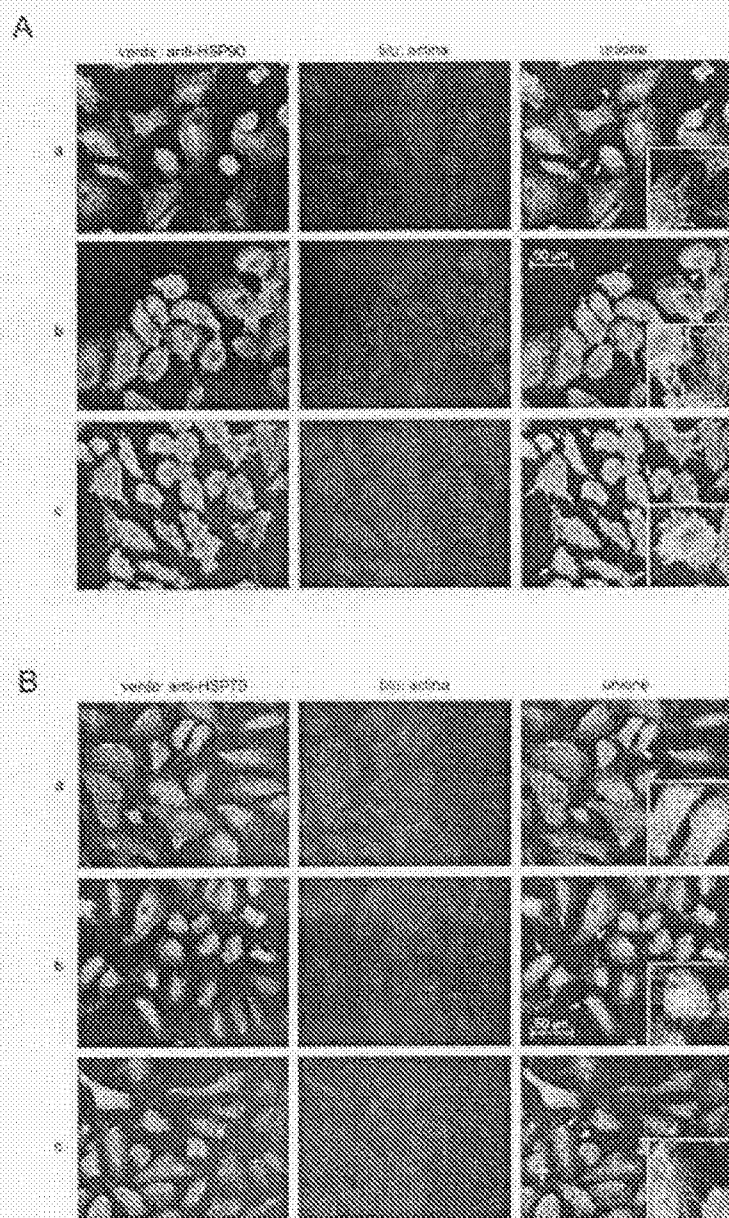


Figura 5

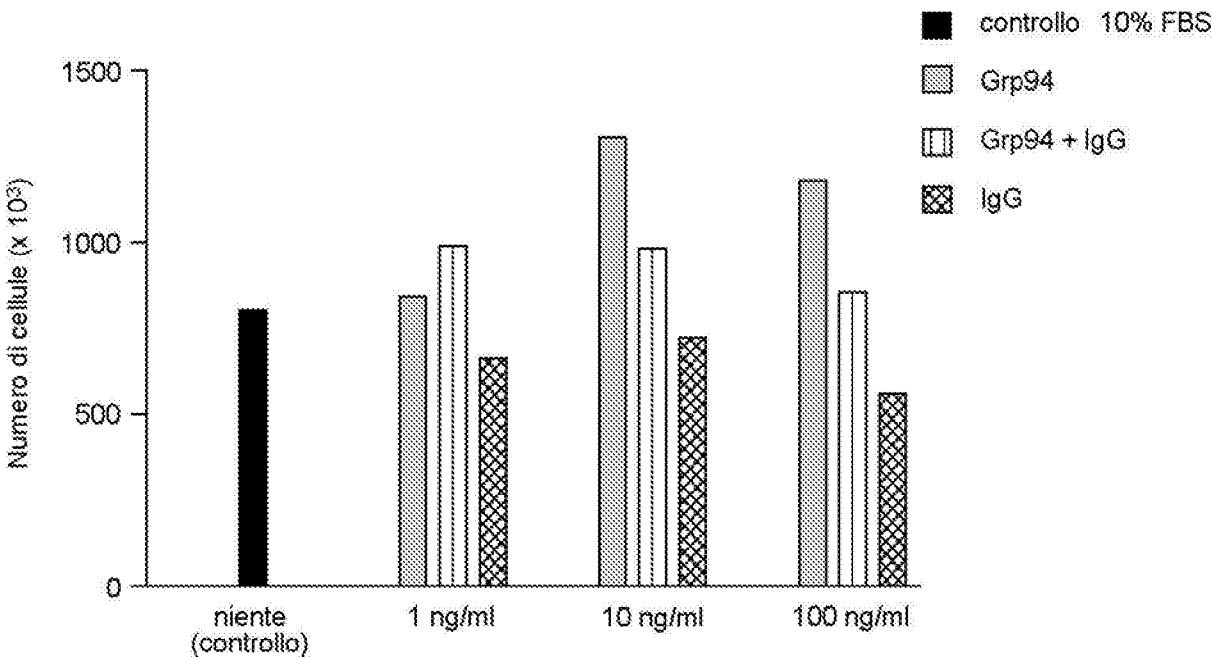


Figura 6

