



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

DOMANDA NUMERO	102001900948280
Data Deposito	31/07/2001
Data Pubblicazione	31/01/2003

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	N		

Titolo

ANTICORPI MONOCLONALI ANTI-SSRP-1 ED IBRIDOMI PRODUCENTI TALI ANTICORPI.

Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo:
"Anticorpi monoclonali anti-SSRP-1 ed ibridomi
producenti tali anticorpi"

di: Consiglio Nazionale delle Ricerche, nazionalità
italiana, Piazzale Aldo Moro 7, 00185, Roma
(Italia)

Inventori designati: Marisa GARIGLIO; Santo
LANDOLFO

Depositata il: 31 luglio 2001

TO 2001A 000 762

* * *

DESCRIZIONE

La presente invenzione si riferisce ad anticorpi monoclonali che reagiscono contro la proteina SSRP-1, ad ibridomi produttori tali anticorpi ed all'impiego diagnostico di tali anticorpi.

Le proteine cromosomiali, non istoniche HMG (High Mobility Group proteins) leganti il DNA comprendono la famiglia SSRP ("*structure specific recognition proteins*") presente in tutte le cellule eucariotiche (1, 2). Una caratteristica comune a molte delle proteine HMG, seppure non a tutte, è la presenza di un dominio legante il DNA chiamato *HMG box*, che differisce da altri domini eucariotici leganti il DNA sotto diversi aspetti - tra i quali la capacità di contattare il DNA attraverso il

solco minore, l'introduzione di ripiegamenti in seguito al legame con il DNA ed una specificità variabile per la sequenza di DNA - che forniscono un meccanismo unico di riconoscimento DNA-proteina (2).

La classificazione di 121 domini HMG sulla base di allineamenti strutturali ha permesso di raggruppare proteine di specie differenti in un sottogruppo, chiamato appunto famiglia SSRP (Structure Specific Recognition Protein) (3).

Solo recentemente i ricercatori del settore hanno iniziato ad indagare le diverse funzioni delle proteine appartenenti a questa famiglia.

Spencer et al. (4) hanno utilizzato un saggio di ibridazione singola in lievito per dimostrare che l'interazione del fattore di trascrizione SRF (fattore di risposta al siero) con la proteina SSRP-1 umana aumenta drammaticamente la sua attività di legame al DNA e conduce ad un'attivazione sinergica di promotori SRF-dipendenti nativi ed artificiali. E' stato trovato che l'omologo del lievito di SSRP-1, denominato Pob3, forma un complesso con un'altra proteina nucleare essenziale, Cdc68 (5). Tale complesso, denominato complesso CP, è un eterodimero che

regola l'attivazione trascrizionale del lievito e la repressione della cromatina (6).

Più recentemente, Orphanides et al. hanno trovato che il fattore FACT (da "Facilitates Chromatin Transcription"), un fattore di estensione cromatina-specifico necessario per la trascrizione di stampi di cromatina in vitro, comprende SSRP-1 (6).

Inoltre, Dyer et al. (7) hanno dimostrato che SSRP1/PREIIBF agisce come un fattore di trascrizione struttura-specifico che avvicina proteine legate in posizioni tra loro distanti a monte del gene della ^{beta}-globina umana.

Infine, Xiang et al. (8) hanno dimostrato che l'mRNA di SSRP1 è specificamente espresso in rene fetale di ratto e nel carcinoma delle cellule renali indotto con Fe-nitritotriacetato, ma non nel rene adulto.

I presenti inventori in studi precedenti hanno dimostrato che SSRP1 lega il DNA (sia cruciforme che lineare a doppia elica) senza apparente specificità di sequenza, e che inoltre ripiega il DNA, una caratteristica generale delle proteine HMG box (9). Studi funzionali hanno rivelato che una diminuita espressione di SSRP1 pregiudica la

crescita di fibroblasti in coltura causando apoptosi (10), e regola in modo negativo la replicazione di un virus a DNA, il citomegalovirus, che è strettamente dipendente dall'apparato di sintesi del DNA della cellula ospite (11). Inoltre, i presenti inventori hanno osservato che la proteina SSRP-1 è una fosfoproteina nucleare la cui espressione è strettamente correlata con lo stato proliferativo della cellula, essendo elevata nel corso della divisione cellulare e diminuendo drammaticamente quando le cellule iniziano a differenziarsi. Mediante la microscopia laser confocale è stato dimostrato che vi è un coallineamento quasi perfetto tra la localizzazione nucleare di SSRP1 e BrdU (5'-bromodeossiuridina) nella fase S, e ciò ha fornito la prima evidenza del fatto che SSRP1 nelle cellule eucariotiche è localizzata in corrispondenza dei siti in cui il DNA genomico si replica (12).

Nell'insieme, tali osservazioni indicano quindi una generica correlazione tra espressione di SSRP-1, trascrizione del DNA, crescita e differenziazione cellulare.

Tuttavia, lo specifico ruolo biologico delle proteine SSRP non era stato finora compreso.

Per sopperire a tale lacuna, i presenti inventori hanno prodotto anticorpi monoclonali che reagiscono contro la proteina SSRP-1 ed hanno utilizzato tali anticorpi per lo studio dell'espressione di questa proteina in diversi tessuti normali e patologici.

Nella tecnica nota non sono descritti anticorpi monoclonali diretti contro la proteina SSRP-1.

Dagli studi condotti facendo uso di tali anticorpi è emerso che il livello di espressione della proteina SSRP-1 non soltanto è correlato con lo stato di proliferazione cellulare all'interno un tessuto, ma esso risulta alterato nei tessuti neoplastici, se confrontato con il livello di espressione nei corrispondenti tessuti normali.

Gli anticorpi monoclonali anti-SSRP-1 della presente invenzione si sono quindi inaspettatamente rivelati utili strumenti per la diagnosi e lo studio di diversi tipi di neoplasie.

Di conseguenza, un primo oggetto dell'invenzione è un anticorpo monoclonale che reagisce contro la proteina SSRP-1.

Nella presente descrizione, tale anticorpo sarà indicato come "anticorpo monoclonale anti-SSRP-1" o, talvolta, più semplicemente, come "anticorpo

anti-SSRP-1".

Con il termine "proteina SSRP-1" si indica la proteina Structure Specific Recognition Protein 1.

Come verrà illustrato in maggiore dettaglio nella sezione relativa agli esempi, gli anticorpi monoclonali anti-SSRP-1 della presente invenzione sono stati prodotti mediante la tecnica della fusione cellulare, anche denominata ibridizzazione cellulare somatica, descritta per la prima volta da Georges Kohler e Cesar Milstein nel 1975.

Le linee cellulari di ibridoma produttori anticorpi anti-SSRP-1 sono state ottenute fondendo cellule spleniche produttori anticorpi con cellule di mieloma, utilizzando polietilenglicole come agente di fusione.

Tali cellule sono state ottenute da topi immunizzati con il frammento N-terminale (amminoacidi 60-467) della proteina murina ricombinante SSRP-1 (precedentemente definita in letteratura come T160, rif. 13), che presenta il 98% di identità con la proteina umana SSRP-1.

La sequenza amminoacidica riportata nella fig. 1 è la sequenza del frammento N-terminale della proteina SSRP-1 murina utilizzato come immunogeno.

Le cellule ottenute in seguito alla fusione sono

state selezionate in terreno selettivo HAT e gli ibridomi sono stati clonati e ne è stata verificata la capacità di produrre anticorpi anti-SSRP-1. La verifica è stata condotta mediante saggio ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) sui sovranatanti delle cellule di ibridoma in coltura.

Due dei cloni positivi sono stati selezionati e sono stati ulteriormente clonati mediante la tecnica delle diluizioni limite.

Tali ibridomi, denominati R6G10 ed R2H2, sono stati depositati dalla Richiedente - ai sensi del Trattato di Budapest sul riconoscimento internazionale del deposito di microrganismi ai fini della procedura in materia di brevetti - presso l'Interlab Cell Line Collection (ICLC), Centro di Biotecnologie Avanzate, L.go R. Benzi 10, 16132 Genova, rispettivamente in data 8 maggio 2001 (R6G10, numero di accesso PD01003) e in data 4 aprile 2001 (R2H2, numero di accesso PD01002).

Nell'ambito dell'invenzione rientra pertanto un ibridoma in grado di produrre anticorpi monoclonali che reagiscono contro la proteina SSRP-1; tale ibridoma è preferibilmente scelto tra l'ibridoma R6G10 (PD01003) e l'ibridoma R2H2 (PD01002).

Per produrre gli anticorpi monoclonali in

quantità sufficienti per l'impiego negli studi successivi, gli ibridomi R6G10 e R2H2 sono stati fatti crescere come tumori in forma ascitica in topi sensibilizzati con pristano. Gli anticorpi prodotti sono infine stati purificati dai fluidi ascitici mediante precipitazione con solfato di ammonio e cromatografia di affinità con proteina A.

Tali anticorpi rappresentano una forma di realizzazione preferita degli anticorpi anti-SSRP1 della presente invenzione; essi verranno d'ora in avanti indicati rispettivamente come "anticorpi R6G10" ed "anticorpi R2H2".

Gli anticorpi R6G10 ed R2H2 sono stati caratterizzati mediante la tecnica di Outcherlony per la determinazione dell'isotipo; la procedura utilizzata verrà descritta in maggiore dettaglio nella sezione relativa agli esempi.

Da tali studi di caratterizzazione è risultato che gli anticorpi R6G10 ed R2H2 appartengono a sottoclassi di IgG differenti.

L'anticorpo R6G10 appartiene infatti all'isotipo IgG2a, mentre l'anticorpo R2H2 appartiene all'isotipo IgG2b.

Per stabilire se i vari anticorpi prodotti contro l'N-terminale di SSRP-1 riconoscano epitopi

uguali o differenti, sono stati effettuati esperimenti di competizione di legame dell'N-terminale utilizzando anticorpi radiomarcati.

Tale tecnica viene indicata come "epitope mapping".

In breve, il fondo di pozzetti di micropiastre di polivinilcloruro (PVC) è stato ricoperto con quantità saturanti di antigene (frammento N-terminale di SSRP1, fig. 1) e quindi è stato aggiunto l'anticorpo R6G10 oppure l'anticorpo R2H2 radiomarcato con I^{125} .

Sono state quindi aggiunte quantità crescenti (variabili da 100 ng/ml a 10 microgrammi/ml) dello stesso anticorpo non radiomarcato o di altri anticorpi anti-SSRP-1 non radiomarcati come competitori per il legame all'N-terminale.

La quantità di radioattività (I^{125}) presente sul fondo del pozzetto era elevata se i due anticorpi non riconoscevano lo stesso epitopo (non competevano quindi tra loro), mentre era a bassi livelli se gli anticorpi riconoscevano lo stesso epitopo e quindi l'anticorpo non marcato spiazzava quello marcato.

I risultati ottenuti (fig. 2) indicano chiaramente che gli anticorpi R6G10 ed R2H2, pur

essendo entrambi diretti contro l'N-terminale di SSRP-1, riconoscono epitopi differenti.

Il profilo di reattività degli anticorpi R6G10 ed R2H2 è stato studiato mediante la tecnica Western blotting su estratti di proteine totali ottenuti da linee cellulari murine (NIH3T3) ed umane (HeLa).

Le proteine contenute negli estratti sono state separate mediante elettroforesi e utilizzando l'anticorpo R6G10 è stata evidenziata una banda migrante con un peso molecolare apparente di 86 kDa, che corrisponde ad SSRP-1 (fig. 3, pannello A).

Tale banda è inoltre riconosciuta da anticorpi policlonali di coniglio monospecifici per l'N-terminale di SSRP-1.

Lo stesso pattern di reattività è stato ottenuto con l'anticorpo R2H2 (dati non mostrati).

Gli anticorpi monoclonali R6G10 ed R2H2 sono inoltre stati utilizzati per analizzare l'espressione di SSRP-1 in estratti da diversi tessuti murini (fig.3, pannello B).

Il timo, l'intestino e l'ovaio mostravano elevati livelli di proteina SSRP-1; il cervello mostrava livelli intermedi; il rene ed il muscolo scheletrico mostravano livelli nulli.

Mediante l'impiego di tali anticorpi è stato pertanto possibile stabilire che vi è una stretta correlazione tra l'espressione della proteina SSRP-1 e la percentuale di cellule proliferanti in un dato tessuto.

L'espressione in vivo della proteina SSRP-1 è stata quindi analizzata mediante analisi immunoistochimica di sezioni di tessuto umano normale fissate in formalina e incluse in paraffina (figure 4-6).

Coerentemente con quanto stabilito mediante l'analisi Western blotting, è stata rilevata una forte colorazione di SSRP-1 nucleare in tessuti contenenti cellule in corso di proliferazione.

Nel tessuto epiteliale di cute normale (figura 4A), la reattività più intensa è stata osservata nello strato basale dell'epitelio, dove si verifica un'attiva sintesi di DNA. Man mano che le cellule migrano verso gli strati superiori e maturano, la reattività diventa più debole, il che indica una regolazione negativa dell'espressione di SSRP-1 in fase con la maturazione cellulare e la cessazione della sintesi di DNA.

In sezioni di mucosa del colon è stato osservato un profilo simile: una intensa colorazione al fondo

della cripta, che diminuisce gradualmente man mano che le cellule migrano verso gli strati superiori (figura 4C).

Le sezioni di corteccia cerebrale umana normale hanno mostrato un numero limitato di grossi neuroni con positività nucleare (figura 5A). Inoltre, nello strato granulare interno dei fogli del cervelletto non è stata osservata nessuna reazione, mentre le cellule di Purkinje presentavano una colorazione sia nucleare che citoplasmatica (figura 6A).

Un quadro completamente differente è invece emerso dalla colorazione immunoistochimica di tessuti neoplastici.

L'adenoma e l'adenocarcinoma dell'intestino crasso mostravano un numero elevato di cellule SSRP-1 positive, mentre le aree residue di mucosa normale erano meno positive oppure negative (figura 4D). In alcuni campioni di adenocarcinoma, la positività era sia nucleare che citoplasmatica, particolarmente sul fronte di invasione del tessuto normale. Risultarono colorati anche numerosi linfociti infiltranti la massa tumorale.

Un notevole numero di cellule positive fu anche osservato nel melanoma maligno, nel carcinoma basocellulare e nel carcinoma epidermoide (figura

4B); in alcuni casi, la positività era estesa al citoplasma delle cellule neoplastiche e ai linfociti dello stroma.

Nel medulloblastoma più dell'85% dei nuclei era positivo.

Nei tumori gliali i risultati furono meno uniformi: la positività era minore nei tumori a basso grado di malignità ("low grade") rispetto ai tumori ad elevato grado di malignità ("high grade") (quali glioblastoma e astrocitoma anaplastico) (figura 6B); in una singola neoplasia, le cellule di grandi dimensioni erano più positive delle cellule piccole.

Gli anticorpi R6G10 ed R2H2 furono poi fatti reagire con sezioni da tessuti completamente differenziati, quali ad esempio muscolo scheletrico e rene, nei quali la componente di cellule proliferanti è solamente marginale. In questi esperimenti, i miotubi erano negativi, mentre i nuclei delle cellule satellite erano debolmente positivi (figura 5B). La proteina SSRP-1 non era inoltre espressa dalle cellule renali umane normali (figura 6C), mentre una intensa colorazione era osservabile nelle sezioni di tessuto derivato da carcinoma renale (figura 6D).

Il confronto dei risultati ottenuti su cellule normali e tumorali dimostra chiaramente e per la prima volta che l'espressione della proteina SSRP-1 è elevata ed aberrante in certi tipi di cellule tumorali.

L'analisi immunoistochimica condotta su tessuto epiteliale e sezioni di intestino crasso normali ha messo in evidenza una forte correlazione tra l'espressione di SSRP-1 ed il programma di differenziazione delle cellule epiteliali. La colorazione di SSRP-1 è molto elevata negli strati basali, mentre diminuisce gradualmente man mano che le cellule migrano verso gli strati superiori e si differenziano. In contrasto, è stata osservata una forte positività uniforme nelle cellule neoplastiche dell'adenocarcinoma del colon (soprattutto vicino al fronte di invasione), oltre a numerose cellule positive nei tumori della cute, quali il melanoma maligno, il carcinoma epidermoide e il carcinoma basocellulare. Il profilo di espressione è pertanto completamente sovvertito nei campioni neoplastici: la distribuzione di SSRP-1 è uniforme in tutto il tessuto tumorale, l'intensità della colorazione è significativamente maggiore e la proteina SSRP-1 è in alcuni casi presente anche

nel citoplasma delle cellule tumorali, a differenza delle cellule epiteliali proliferanti normali che mostrano una precisa localizzazione nucleare di tale proteina.

Il profilo di colorazione ottenuto nelle sezioni di cervello e cervelletto risulta particolarmente interessante poiché questi tessuti contengono cellule in cui non vi è una sintesi di DNA rivelabile, ma che sono molto attive sotto l'aspetto della trascrizione. Pertanto, gli elevati livelli di SSRP-1 osservati negli estratti proteici da questi tessuti possono essere correlati con la sintesi di RNA e quindi con l'attività di regolazione della trascrizione. Nei tessuti cerebrali i cambiamenti nell'espressione della proteina SSRP-1 sono anche più drammatici. Nella corteccia cerebrale normale solo pochi grossi neuroni sono positivi, mentre il resto della corteccia è assolutamente negativa. Invece, nella massa tumorale la maggior parte dei nuclei cellulari diventa positiva e la proteina SSRP-1 diviene rivelabile anche nel citoplasma. Nei tessuti gliali, inoltre, la positività dei nuclei sembra correlare con il grado di malignità, poiché essa è significativamente minore nei tumori a basso

grado di malignità. Per quanto riguarda il rene ed il muscolo scheletrico sezioni di tessuto normale appaiono negative con entrambi gli anticorpi indicando che in condizioni di differenziamento l'espressione di SSRP1 non è rilevabile. Al contrario le sezioni derivate da carcinomi renali o fibrosarcomi appaiono intensamente colorate quando fatte reagire con uno dei due anticorpi, indicando che in seguito a trasformazione neoplastica tessuti che normalmente non esprimono la SSRP-1, quali muscolo e rene diventano intensamente positivi.

Tali risultati indicano chiaramente che gli anticorpi anti-SSRP-1 della presente invenzione sono particolarmente utili per l'impiego come strumenti diagnostici, in particolare per la diagnosi di patologie tumorali.

Nell'ambito della presente invenzione rientrano pertanto gli anticorpi monoclonali anti-SSRP1 sopra descritti per l'impiego diagnostico, in particolare per la diagnosi di tumori. Particolarmente preferiti a tale scopo sono gli anticorpi prodotti dagli ibridomi R6G10 (PD01003) e R2H2 (PD01002).

Come è stato descritto in precedenza, l'identificazione di cellule e/o tessuti tumorali viene effettuata studiando l'espressione della

proteina SSRP1 nel campione biologico di interesse. A questo scopo, gli anticorpi anti-SSRP1 vengono utilizzati come reagenti specifici in immunosaggi, quali ad esempio saggi immunofluorescenti, immunochemiluminescenti, immunoistochimici o qualsiasi altra tecnica basata sul riconoscimento antigene-anticorpo ed in cui l'anticorpo è marcato con una molecola rivelabile o con qualsiasi altro mezzo indicatore; tali saggi includono anche quelli in cui la rivelazione del legame tra proteina SSRP1 (antigene) ed anticorpo anti-SSRP1 viene ottenuta mediante l'uso di un anticorpo secondario.

Rientra pertanto nell'ambito della presente invenzione un procedimento per la diagnosi in vitro di una patologia tumorale, comprendente rivelare l'espressione della proteina SSRP1 in un campione biologico prelevato da un paziente, detta espressione della proteina SSRP-1 essendo rivelata mediante l'impiego di un anticorpo monoclonale anti-SSRP1 secondo la presente invenzione.

Tra le patologie tumorali che possono essere rivelate col procedimento dell'invenzione, vi sono ad esempio tumori del sistema nervoso centrale, della cute, del muscolo e del rene.

Gli esempi che seguono sono forniti a scopo

illustrativo e non vanno intesi a limitare in alcun modo la portata della presente invenzione.

Esempio 1: ottenimento di anticorpi monoclonali anti-SSRP-1

Un panel di anticorpi monoclonali venne prodotto utilizzando come antigene la proteina murina SSRP-1 ricombinante, che presenta il 98% di identità con la proteina SSRP-1 umana.

Il frammento N-terminale della proteina murina SSRP-1 (amminoacidi 60-467, fig.1), prodotto in E. coli come descritto da Gariglio et al. (9) e risospeso in PBS, fu iniettato nella milza di 10 topi BALB/c anestetizzati (200 ug/200 μ l/topo), attraverso un'apertura diretta del peritoneo in condizioni chirurgiche.

A questi topi furono somministrati richiami (200 mg/200 μ l/topo) iniettando lo stesso antigene per via intraperitoneale ad intervalli di circa 15 giorni per 2 mesi.

Quattro giorni dopo l'ultima iniezione, la milza fu rimossa per la fusione con la linea cellulare standard di mieloma X63.Ag8.653 utilizzando PEG 1500-1700 (Sigma, Germania) come agente di fusione.

Le cellule ibride ottenute in seguito a fusione furono fatte crescere su terreno RPMI-1640 (Gibco)

contenente HAT (ipoxantina, aminopterina, timidina) arricchito con 5% siero di cavallo (Hyclone) per la selezione degli ibridomi.

Esempio 2: selezione degli ibridomi mediante saggio ELISA

Fu quindi verificata la capacità di produrre anticorpi anti-SSRP-1 da parte di tutti gli ibridomi cresciuti in terreno selettivo.

Tale verifica venne condotta mediante saggio ELISA ("enzyme-linked immunosorbent assay") sui surnatanti delle cellule di ibridoma in coltura.

A questo scopo venne impiegato lo stesso antigene utilizzato per l'immunizzazione, che fu immobilizzato su piastre da microtitolazione a 96 pozzetti (Nunc). A questo scopo il frammento N-terminale della proteina SSRP-1 ricombinante (2 mg/ml) fu fatto assorbire sul fondo dei pozzetti di piastre per microtitolazione in 0,004 M di una soluzione di bicarbonato, pH 9,6, ed incubato a 4°C per 18 ore. Dopo aver bloccato i siti aspecifici di assorbimento tramite una soluzione di albumina bovina (BSA) al 2% in H₂O bidistillata, le piastre furono lavate con una soluzione 0,1 M di Tris-HCl, pH 7,5 contenente 0,05% Tween 20 (Tris-Tween).

Cento microlitri di surnatante proveniente dalle

colture di fusione positive per crescita di ibridomi furono aggiunti a ciascun pozzetto e le piastre furono incubate per 2 ore a 37°C.

Le piastre furono quindi lavate con Tris-Tween e 100 ml di anticorpi polivalenti anti-Ig di topo marcati con fosfatasi alcalina (Pharmacia-Amersham) furono aggiunti a ciascun pozzetto per 2 ore a temperatura ambiente.

Le piastre furono quindi lavate 6 volte con Tris-Tween e furono quindi aggiunti 100 ml di una soluzione contenente il substrato (1 mg/ml p-nitrofenilfosfato in dietanolamina, pH 9,8).

Infine fu misurata la densità ottica (OD) di ciascun pozzetto a 405 nm. Furono considerati positivi per la produzione di anticorpi tutti quegli ibridomi il cui sovrinatante generava valori di O.D. più elevati di 2SD rispetto al cut-off ottenuto con sovrinatanti di colture negative per crescita di ibridomi (media di 10 colture negative per crescita di ibridomi).

I sovrinatanti selezionati furono derivati da due colture di ibridomi denominate quindi R6G10 ed R2H2 poiché generavano i valori di O.D. più elevati. I suddetti ibridomi furono quindi riclonati con 3 cicli successivi tramite la tecnica

di diluizione al limite. Questa tecnica consiste nel depositare una cellula di ibridoma in ciascun pozzetto di una piastra a 96 pozzetti, che vengono poi saggiati per la capacità di produrre anticorpi anti-SSRP1 con la stessa tecnica sopradescritta. Cicli ripetuti di clonaggio permettono di stabilizzare gli ibridomi, che mantengono così la loro capacità di produrre nel tempo anticorpi.

Esempio 3: determinazione dell'isotipo

L'isotipo dei due anticorpi R6G10 e R2H2 fu determinato tramite immunodiffusione radiale di Outcherlony.

In breve, questa tecnica prevede la diffusione radiale dell'antigene (ossia l'anticorpo da esaminare) in gel di agaroso con anticorpi reattivi contro differenti isotipi dello stesso antigene.

Per la determinazione dell'isotipo degli anticorpi murini R6G10 e R2H2 furono utilizzati anticorpi di pecora anti-anticorpi murini, specifici per i differenti isotipi di anticorpi murini (kit commerciale The Binding Site, Birmingham, UK, commercializzato in Italia da Bioline, Torino).

Gli anticorpi di pecora, reagendo con gli anticorpi murini, formano un anello di

precipitazione nel gel di agaroso, il cui diametro permette di stabilire la concentrazione dell'antigene usato (anticorpi di topo) ed il tipo di antigene (isotipo degli anticorpi).

Per la procedura furono utilizzate micropiastre ricoperte di gel di agaroso con inclusi gli anticorpi di pecora anti-Ig di topo.

In ciascun pozzetto preformato nel gel furono depositati 5 μ l di surnatante di coltura dell'ibridoma R6G10 o dell'ibridoma R2H2. I surnatanti erano stati precedentemente concentrati 10 volte tramite membrana di dialisi su strato di saccarosio.

Dopo 72 ore, fu valutato il diametro dell'anello di precipitazione, il che permise di stabilire che l'isotipo di appartenenza è IgG2a per l'anticorpo R6G10 e IgG2b per l'anticorpo R2H2.

Esempio 4: Produzione degli anticorpi monoclonali da tumori in forma ascitica e loro purificazione

Al fine di produrre quantità di anticorpi utili per il loro impiego, gli ibridomi selezionati furono fatti crescere come tumori in forma ascitica in topi sensibilizzati con pristano al fine di indurre un versamento ascitico peritoneale e favorire la produzione di anticorpi. A questo scopo

topi BALB/c di 6 settimane di età furono inoculati per via intraperitoneale con 0,3 ml di pristano. Cinque-sette giorni dopo 1×10^6 cellule di ibridoma furono inoculate in peritoneo. Il liquido ascitico fu quindi prelevato 15-18 giorni dall'inoculo, centrifugato per eliminare le cellule ed il surnatante fu utilizzato per la purificazione degli anticorpi.

Gli anticorpi furono poi purificati dal liquido ascitico tramite precipitazione in solfato d'ammonio (NH_4SO_4) (50% di saturazione) e cromatografia di affinità tramite colonnina di proteina A-Sefaroso (HiTrap, Amersham-Pharmacia Biotech).

In breve, gli anticorpi dei due ibridomi, precipitati in NH_4SO_4 , furono dializzati in un tampone contenente 0,05M Tris-HCl, 2M NaCl, pH 7,8. Un volume di 5 ml contenente una concentrazione finale di 10 mg di anticorpo fu quindi caricato su una colonnina di Prot-A Sefaroso ad una velocità di flusso di 60 cm/ora. La colonnina fu quindi lavata esaustivamente fino alla scomparsa di proteine dal liquido di lavaggio monitorata con spettrofotometro ad UV (280 nm). Le IgG trattenute dalla proteina A-Sefaroso furono quindi eluite con una soluzione di

0,1 M citrato (pH 4,5 per le IgG2a, pH 3,5 per le IgG2b), ed immediatamente tamponate con una soluzione di Tris-HCl (pH 8,8).

Gli anticorpi monoclonali così purificati furono quindi dializzati contro PBS a pH 7,4.

Esempio 5: epitope mapping

Per stabilire se gli anticorpi prodotti contro l'N-terminale di SSRP-1 riconoscessero epitopi uguali o differenti, sono stati svolti esperimenti di competizione di legame dell'N-terminale ("epitope mapping") utilizzando anticorpi radiomarcati con IODO-GEN (Pierce).

A questo scopo, 10 mg di anticorpo monoclonale R6G10 o R2H2 (purificato su proteina A come descritto nell'esempio 4) in 200 ml di PBS (pH 7,4) furono trasferiti in provette ricoperte con IODO-GEN (50 mg/ml), dove furono iodinati per 5 minuti a 4°C con I125 (1 mCi/ml) (Amersham).

La reazione fu quindi bloccata con l'aggiunta di BSA (2% in PBS) e gli anticorpi iodinati furono separati tramite cromatografia d'esclusione. Su di una colonnina preimpaccata con Sephadex G-10 (3 ml peso/vol di resina) (PD10, Amersham-Pharmacia Biotech), lavata precedentemente con 10 ml di PBS, furono aggiunti gli anticorpi iodinati (200 µl),

che furono quindi separati dallo I^{125} libero tramite cromatografia d'esclusione sulla resina Sephadex G-10. Le frazioni contenenti gli anticorpi marcati furono rivelate tramite lettura diretta con gamma-counter e gli anticorpi furono mantenuti a 4°C dopo aggiunta di glicerolo (5%) al fine di stabilizzarne l'attività. Per stabilire se i due anticorpi riconoscessero epitopi uguali o differenti, il fondo di pozzetti di micropiastre in PVC è stato inizialmente ricoperto con quantità saturanti di SSRP-1 (N-terminale) (2 $\mu\text{g/ml}$) utilizzando le stesse condizioni già descritte nell'esempio 2 per la selezione iniziale degli anticorpi.

Furono quindi aggiunti prima gli anticorpi R6G10 o R2H2 radiomarcati con I^{125} (1 x 10⁵ cpm/pozzetto) quindi quantità dell'anticorpo corrispondente (R6G10 o R2H2) o di altri anticorpi non radiomarcati, indicati nella figura 2, come competitori per il legame all'N-terminale, ad una concentrazione capace di generare il 50% di spiazzamento dell'anticorpo radiomarcato (250 ng/ml).

La quantità di radioattività (I^{125}) presente sul fondo del pozzetto era elevata se gli anticorpi non riconoscevano lo stesso epitopo (non competevano

quindi tra loro), mentre era a bassi livelli se gli anticorpi riconoscevano lo stesso epitopo e quindi l'anticorpo non marcato spiazzava quello marcato.

I risultati ottenuti indicano chiaramente che R6G10 ed R2H2 riconoscono epitopi differenti poiché non competono tra loro per il legame all'N-terminale di SSRP1 (fig. 2).

Esempio 6: determinazione della reattività di R6G10 e R2H2 tramite Western blotting

La reattività dei due anticorpi R6G10 e R2H2 contro la proteina SSRP-1 nativa è stata determinata mediante la tecnica di Western blotting.

In breve, estratti totali proteici (30 µg) da cellule umane o murine (indicate nella figura 3) sono stati separati su gel di poliacrilamide in sodio dodecilsolfato (SDS) (8% PAGE) tramite elettroforesi e quindi trasferiti su carta di nitrocellulosa.

Sono stati quindi aggiunti gli anticorpi R6G10 o R2H2, diluiti 1: 1000 in "blocking solution" (10mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,1M NaCl, 0,1% Tween-20, 5% [peso/vol] latte scremato), il cui legame alla SSRP-1 è stato quindi evidenziato tramite anticorpi di coniglio anti-Ig murine, coniugati con

perossidasi.

La perossidasi è stata infine evidenziata con reazione di chemiluminescenza (Super Signal, Pierce). I risultati ottenuti dimostrano chiaramente che gli anticorpi R6G10 riconoscono negli estratti di cellule umane e murine un'unica proteina che migra con un peso molecolare apparente di circa 86 kDa, simile a quello atteso per la proteina SSRP1. Inoltre una banda simile è riconosciuta da un antisiero di coniglio precedentemente prodotto nel laboratorio degli inventori contro il frammento N-terminale di SSRP1, confermando che gli anticorpi R6G10 reagiscono con la proteina SSRP1 sia di uomo che di topo. Identici risultati in Western blotting sono stati ottenuti con gli anticorpi R2H2, dimostrando che anche questi ultimi riconoscono la stessa proteina SSRP-1.

Esempio 7: studi di espressione in vivo della proteina SSRP-1

Al fine di verificare la distribuzione tissutale in vivo di SSRP1 in tessuti umani normali o tumorali, gli anticorpi R6G10 ed R2H2 sono stati utilizzati in analisi di tipo immunohistochimico.

Sezioni tissutali (5 micron) di campioni da

biopsie furono deparaffinate con xilene a temperatura ambiente per 5 minuti e quindi lavate dapprima in sequenza con soluzioni contenenti concentrazioni decrescenti di etanolo in H₂O (99, 75, 50% etanolo) ed infine con H₂O bidistillata. I campioni furono successivamente trattati con H₂O₂ (3%) per 5 minuti, lavati come sopradescritto, e quindi trattati in forno a microonde con soluzione di citrato. Dopo lavaggio con PBS per 3 volte, le sezioni furono quindi fatte reagire con gli anticorpi R6G10 o R2H2 per 60 minuti a temperatura ambiente (diluiti 1:200 in PBS e BSA 1%). Dopo lavaggio con PBS alle sezioni furono aggiunti anticorpi di coniglio biotinilati anti-Ig murine per 15 minuti. Gli anticorpi di coniglio legata quelli murini furono quindi incubati con un complesso di streptavidina/perossidasi (15 min) e decorati con una soluzione di DAB. Infine le sezioni furono lavate, deidratate ed incubate con liquido permanente di montaggio per l'osservazione al microscopio.

RIVENDICAZIONI

1. Anticorpo monoclonale che reagisce contro la proteina SSRP-1.
2. Anticorpo secondo la rivendicazione 1, ottenibile dall'ibridoma R6G10 (PD01003).
3. Anticorpo secondo la rivendicazione 1, ottenibile dall'ibridoma R2H2 (PD01002).
4. Ibridoma in grado di produrre un anticorpo monoclonale secondo la rivendicazione 1.
5. Ibridoma secondo la rivendicazione 4, che è l'ibridoma R6G10 (PD01003).
6. Ibridoma secondo la rivendicazione 4, che è l'ibridoma R2H2 (PD01002).
7. Anticorpo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1a 3 per uso diagnostico.
8. Anticorpo secondo la rivendicazione 7 per la diagnosi di patologie tumorali.
9. Anticorpo secondo la rivendicazione 8 per la diagnosi di patologie tumorali scelte dal gruppo che consiste di tumori del sistema nervoso centrale, della cute, del muscolo e del rene.
10. Procedimento per la diagnosi in vitro di una patologia tumorale, comprendente rivelare l'espressione della proteina SSRP-1 in un campione biologico prelevato da un paziente, detta

espressione della proteina SSRP-1 essendo rivelata
mediante l'impiego di un anticorpo monoclonale
anti-SSRP1 secondo una qualsiasi delle
rivendicazioni 1 a 3.

PER INCARICO

Edgardo Deambrogi

EDGARDO DEAMBROGI

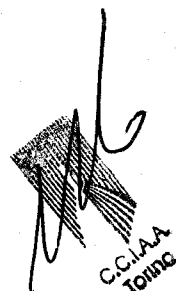
(iscr. No. 931B)


C.C.I.A.A.
Torino

JACOBACCI & PARTNERS S.p.A.

60 hglkl1tkng hvykydgre sefeklsdff kthyrlelme
100 kdlcvkgwnw gtvkfggqll sfdigdqpvf eiplsnvssv
140 pparievtle fhqnddpevs lmevrfyvpp tqedgvdvpe
180 afaqnvlska dviqatgdai cifrelqclt prgrydiriy
220 ptflhlhgkt fdykipyttv lrlfillphkd grqmffvisl
260 dppikqgqtr yhflillfsk dedisltnm neeevekrfe
300 grltnmsgs lyemvsrvmk alvnrkitvp gnfqghsgaq
340 citcsykass gllyplergf iyvhkppvhi rfdeisfvnf
380 argttttrsf dfeietkqgt qytfssiere eygklfdvfn
420 akklniknrg lkeginpgyd dyadsdedqh daylermkee
460 gkireena

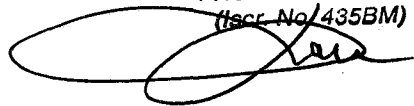
FIGURA 1



C.C.I.A.A.
TOMO

Per incarico di CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE

PAOLO RAMBELLI
(iscr. No. 435BM)



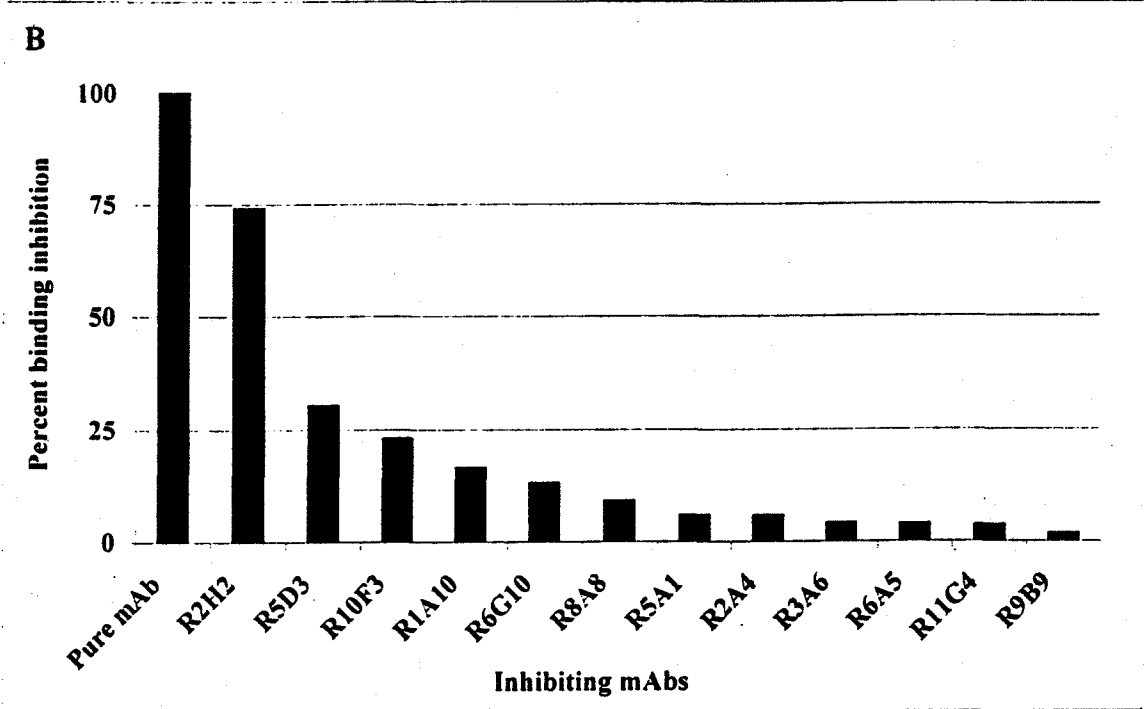
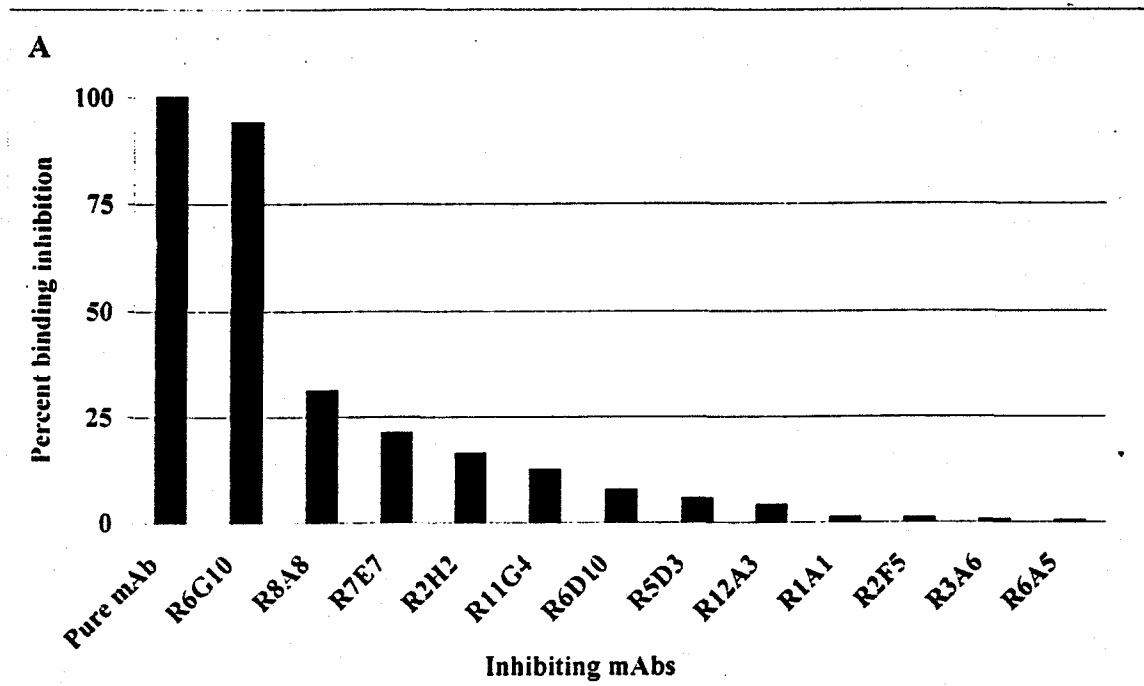


FIGURA 2

[Handwritten signature]
 C.C.I.A.A.
 1987/88

Per incarico di CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE

[Handwritten signature]
 PAOLO FAMBELLI
 (Iscr. No. 40031)

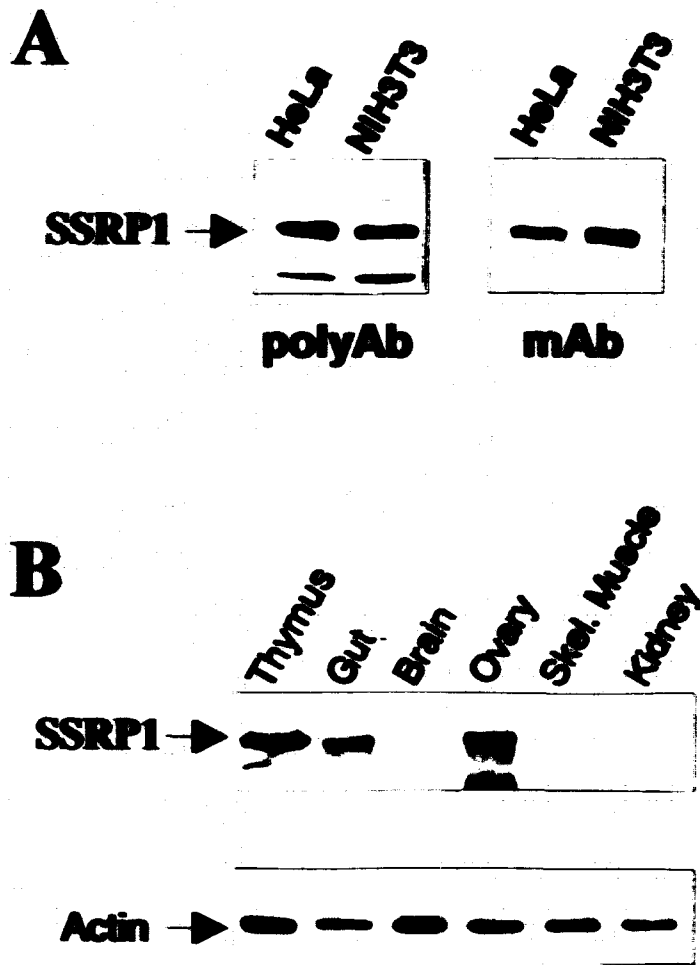


FIGURA 3

[Handwritten signature]
C. C. I. A. P.
Roma

[Handwritten signature]

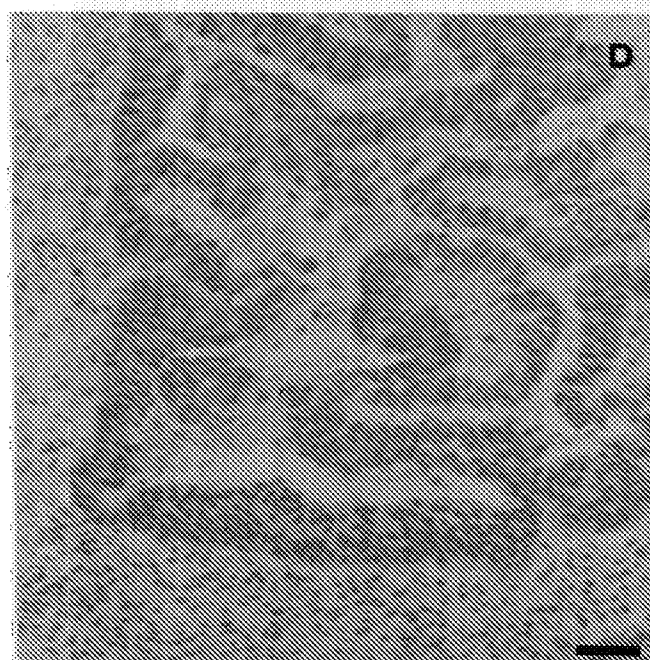
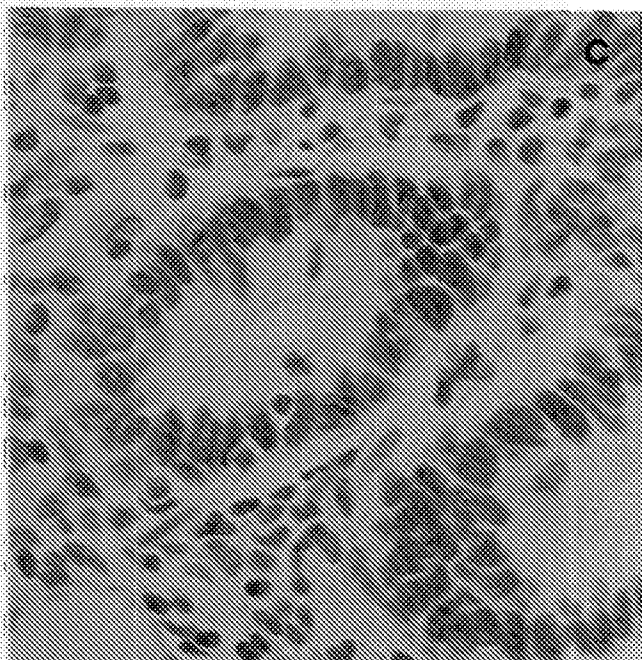
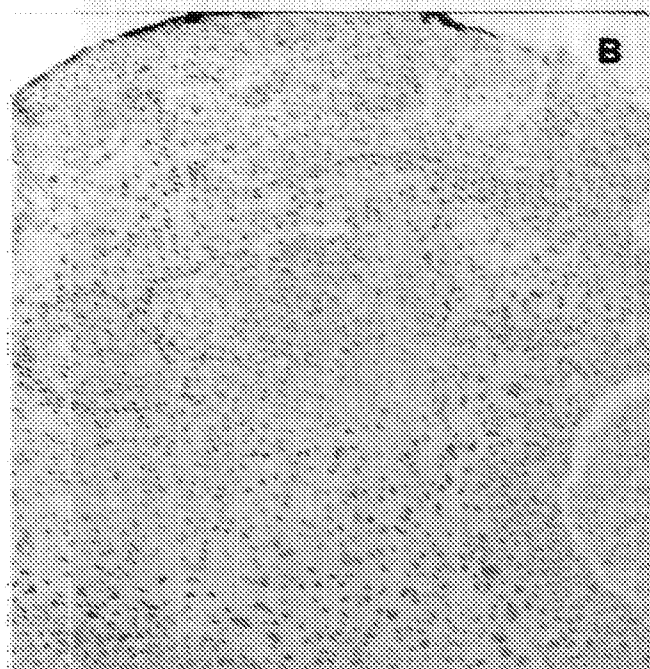
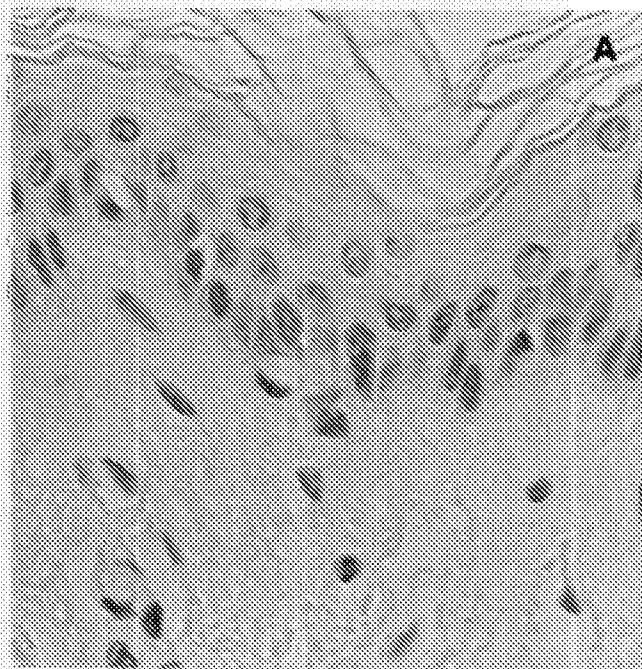

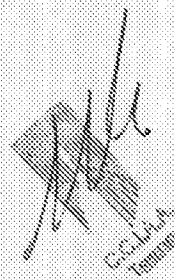


FIGURA 4

Per incarico di CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE

PAOLO RANSELLI
No. 455210



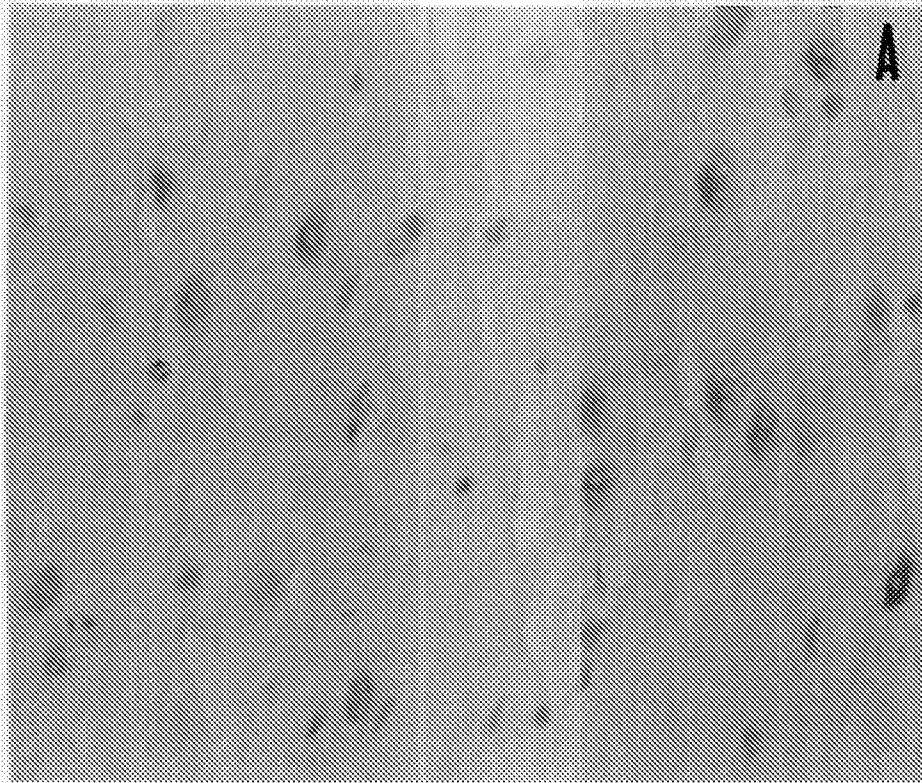


FIGURA 5

Per incarico di CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE

~~PABLO PANSALLI~~
(ISCF No. 2000000000)

[Handwritten signature]
C.C. L. A. J.
Pensiero

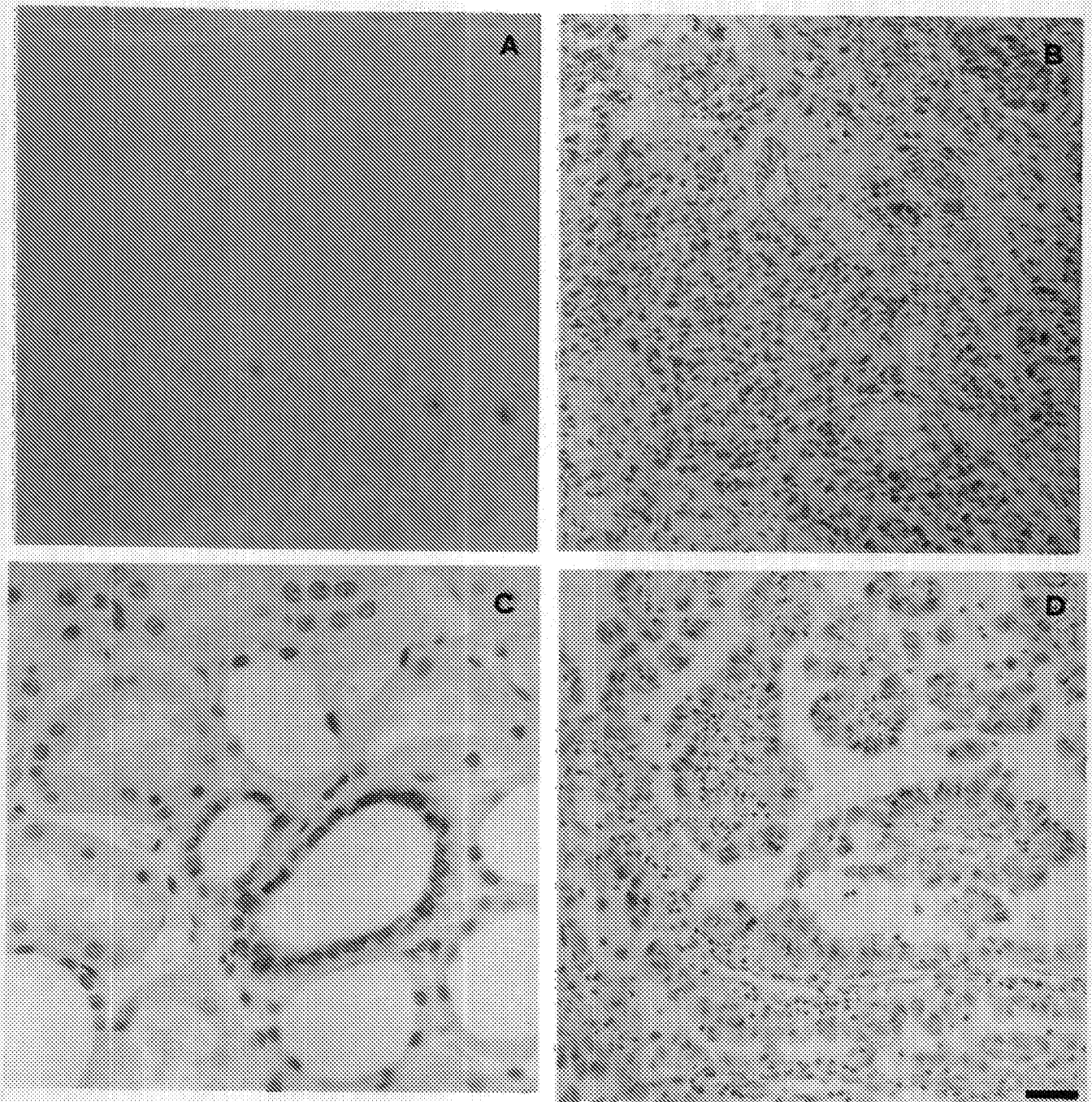
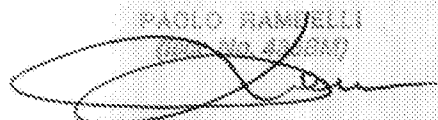



FIGURA 6

Per incarico di CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE

PAGLO RAMPELLI
(02) 49 45187



C.C.I.A.A.
Lombardia