



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

UIBM

DOMANDA NUMERO	101994900351383
Data Deposito	01/03/1994
Data Pubblicazione	01/09/1995

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	B		

Titolo

METODO IMMUNOCITOMETRICO PER IL RILEVAMENTO DI LINFOCITI APOPTOTICI.

DESCRIZIONE

RM94 A 000109

a corredo di una domanda di brevetto di invenzione dal titolo:

"Metodo immunocitometrico per il rilevamento di linfociti apoptotici"

a nome: Carbonari Maurizio, Fiorilli Massimo

Inventore: Carbonari Maurizio, Fiorilli Massimo

La presente invenzione concerne un metodo immunocitometrico per il rilevamento di linfociti apoptotici.

Più in particolare l'invenzione concerne un metodo per il rilevamento di linfociti apoptotici a mezzo di misurazione della densità di recettori di membrana dei linfociti, in particolare di una diminuzione della densità del CD45, ligandi specifici per il recettore CD45, anche in fase solida, traccianti coniugati a detti ligandi e kit per la realizzazione del metodo. Il metodo può essere anche associato ad una misurazione di altri parametri indicativi dell'apoptosi.

L'apoptosi, o "morte cellulare programmata", é una forma di suicidio delle cellule che si realizza sia durante la morfogenesi ed il normale ricambio cellulare (1-3), che in alcune condizioni patologiche (4-5). L'apoptosi é un processo biochimico attivo consistente nella perdita d'acqua con condensazione nucleare e citoplasmatica, seguita dalla produzione di enzimi in grado di tagliare il DNA nei siti internucleosomici (attività endonucleasica) (6) e di enzimi che

Ing. Barzani & Zanardo
Roma s.p.a.

fissano la membrana cellulare (attività transglutaminasica tissutale) (7). L'apoptosi é distinta da un altro tipo di morte cellulare, la necrosi, che é un fenomeno passivo causato dalla perdita di omeostasi ed é caratterizzato da danno mitocondriale, seguito dal rigonfiamento e dalla lisi della cellula con perdita del suo contenuto nello spazio extracellulare (2).

Il metodo più ampiamente usato per verificare l'apoptosi é l'analisi qualitativa della frammentazione del DNA nei siti internucleosomici per mezzo di elettroforesi su gel, in combinazione con un rilevamento di DNA a basso peso molecolare, estraibile dalle cellule dopo lisi moderata (8). Tuttavia, questo approccio soffre di importanti limitazioni, come una relativa scarsa sensibilità e l'impossibilità di definire quale tipo cellulare subisca apoptosi in popolazioni miste. Diversi metodi alternativi (9) sono fondati sull'analisi citometrica a flusso dello scatter luminoso cellulare e dell'uptake' di coloranti fluorescenti leganti il DNA, come il propidio ioduro (10), Hoechst 33342 (11-12), l'etidio bromuro (13-14), 7-ammino-actinomicina D (7-AAD) (15), o altri coloranti (16). Tuttavia, questi metodi non possono identificare il fenotipo delle cellule morte e non possono distinguere tra apoptosi e necrosi. Inoltre, la permeabilità allo ioduro di propidio e alla 7-AAD varia tra fasi precoci e tardive della morte cellulare (9,12).

Ing. Barzani G. Barzani
Roma s.p.a.

Il recente interesse per il ruolo patogenetico della apoptosi nella sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS) (5) e nel cancro ha dato impeto alla sua valutazione nella ricerca clinica (4,17). Tuttavia, le limitazioni riguardanti i metodi di analisi disponibili, che richiedono esperimenti specificamente dedicati e relativamente complessi, ha limitato il loro uso negli studi clinici.

Risulta pertanto evidente l'esigenza di fornire un metodo semplice e veloce per il rilevamento dei linfociti apoptotici nel sangue umano periferico, che possa essere impiegato per studi clinici su larga scala.

Gli autori della presente invenzione hanno sviluppato un metodo che si basa sulle caratteristiche della superficie cellulare, per mezzo della identificazione di specifici cambiamenti della densità apparente di alcuni antigeni di superficie, identificati con ligandi specifici, quali ad esempio anticorpi monoclonali (MoAbs). Il metodo consente la discriminazione tra linfociti vitali, apoptotici e necrotici, e la determinazione del loro fenotipo; è quantitativo e sensibile; e può essere realizzato con MoAbs comunemente usati direttamente nel contesto dell'immunofenotipizzazione linfocitaria per scopi clinici. Il metodo citometrico a flusso per il rilevamento dei linfociti apoptotici umani, al contrario dei già descritti saggi, consente la identificazione e l'immunofenotipizzazione delle cellule apoptotiche all'interno di

Ing. Barzani G. Riccardo
Roma s.p.a.

popolazioni miste di leucociti del sangue periferico. I linfociti apoptotici sono identificati sulla base di una diminuita espressione delle molecole di superficie CD45. I linfociti apoptotici possono essere facilmente distinti da quelli vitali e da quelli resi necrotici dal trattamento con agenti necrotizzanti, quali anticorpo e complemento.

I linfociti di pazienti HIV, al contrario di quelli di soggetti normali HIV-negativi, vanno incontro ad apoptosi dopo semplice coltura in vitro. Con il presente metodo è stato rilevato che la percentuale dei linfociti che vanno in apoptosi è significativamente più alta nei pazienti con basso numero di cellule CD4 ($<400/\mu\text{l}$), che in quelli in stadio più precoce ($>400/\mu\text{l}$). Inoltre l'analisi fenotipica ha mostrato che i linfociti apoptotici generati in queste colture sono soprattutto cellule T CD8⁺ e cellule B CD19⁺. Quindi, in contrasto con quanto è stato previamente suggerito, il fenomeno dell'apoptosi in vitro dei linfociti può non essere patogeneticamente correlato alla deplezione delle cellule T CD4⁺ nella sindrome da immunodeficienza acquisita. Non di meno esso può rappresentare un utile indice della progressione della malattia.

Il metodo consente l'analisi di leucociti non separati del sangue periferico, e quindi l'identificazione di linfociti apoptotici circolanti in vivo. Sono stati rilevati infatti linfociti apoptotici nel sangue circolante di un paziente con cancro subito dopo chemioterapia citotossica ad alta dose. Al

Ing. Barrano & Tanardi
Roma s.p.a.

contrario, non sono stati rilevati in vivo linfociti apoptotici nei pazienti con precoce o avanzata infezione da HIV.

Forma pertanto oggetto della presente invenzione un metodo per la rivelazione di linfociti apoptotici in un campione biologico che comprende una misurazione quantitativa di recettori CD45 presenti sulla membrana di detti linfociti e sulla membrana di linfociti vitali, in cui detta misurazione avviene a mezzo di legame tra detti recettori CD45 e ligandi specifici per detti recettori, in cui detto legame è evidenziato a mezzo di traccianti. Preferibilmente detti ligandi comprendono anticorpi monoclonali anti-CD45 o frammenti di essi in grado di legare in maniera specifica il CD45; alternativamente detti ligandi comprendono peptidi sintetici in grado di legare in maniera specifica il CD45; alternativamente detti ligandi comprendono molecole ibride comprendenti anticorpi monoclonali e peptidi sintetici, o anticorpi monoclonali bivalenti in grado di legare in maniera specifica il CD45.

In una forma preferita di attuazione detti ligandi specifici per il CD45 sono coniugati con molecole traccianti in un rapporto tale da ottenere la migliore risoluzione dell'intensità di espressione del CD45. Preferibilmente detti traccianti comprendono molecole selezionate dal gruppo di: enzimi, fluocromi.

In una forma preferita di attuazione detti ligandi specifici o detti traccianti sono legati ad una fase solida, in maniera tale

Ing. Barzani & Zanardo
Roma s.p.a.

da non interferire con le caratteristiche di legame o di rivelazione, rispettivamente, di questi.

Costituiscono oggetto dell'invenzione ligandi specifici per CD45, preferibilmente detti ligandi comprendono anticorpi monoclonali anti-CD45 o frammenti di essi in grado di legare in maniera specifica il CD45; alternativamente detti ligandi comprendono peptidi sintetici in grado di legare in maniera specifica il CD45; alternativamente detti ligandi comprendono molecole ibride comprendenti anticorpi monoclonali e peptidi sintetici, o anticorpi monoclonali bivalenti in grado di legare in maniera specifica il CD45.

In una forma preferita di attuazione detti ligandi specifici per il CD45 sono coniugati con molecole traccianti in un rapporto tale da ottenere la migliore risoluzione dell'intensità di espressione del CD45. Preferibilmente detti traccianti comprendono molecole selezionate dal gruppo di: enzimi, fluocromi.

In una forma preferita di attuazione detti ligandi specifici o detti traccianti sono legati ad una fase solida, in maniera tale da non interferire con le caratteristiche di legame o di rivelazione, rispettivamente, di questi.

Ulteriore oggetto dell'invenzione è un kit diagnostico per la rivelazione di linfociti apoptotici in un campione biologico che comprende come reagenti specifici i ligandi per CD45 e i traccianti dell'invenzione.

Ing. Barrano & Ranardo
Roma s.p.a.

Il metodo, i ligandi e il kit secondo l'invenzione trovano una vasta applicazione nella ricerca di base, in tutte le condizioni in cui sia desiderabile un'analisi quantitativa e qualitativa dell'apoptosi, a carico di distinti citotipi leucocitari umani o animali, sia da sangue, che da tessuti, che linee cellulari. Il metodo presenta vantaggiose applicazioni cliniche, grazie ad una facile identificazione e caratterizzazione di linfociti apoptotici presenti in vivo in diverse condizioni patologiche, come malattie con immunodeficienza primaria e secondaria, compresa l'AIDS; immunopatie, comprese le malattie autoimmuni; infezioni virali; leucemie e linfomi; neoplasie. Il metodo dell'invenzione conduce anche ad una valutazione dell'apoptosi dei leucociti umani indotta da terapie citotossiche e immunosoppressive, così come quella indotta o soppressa a seguito di interventi chirurgici appropriati.

La validità del metodo per lo studio delle condizioni patologiche umane è evidenziata dai seguenti risultati in pazienti con infezione da HIV e in pazienti sottoposti ad alte dosi di chemioterapia citotossica. In tale descrizione si farà riferimento alle seguenti figure, in cui:

- la Figura 1, pannelli a-f, mostra scatters differenziali (citogrammi a sinistra di ciascun pannello), colorazione con propidio ioduro e CD45 (istogrammi a destra) di linfociti vitali apoptotici e necrotici. Pannello a: a sinistra, regolazione per l'analisi degli scatters delle regioni A (linfociti vitali) e C

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

(linfociti morti); a destra, scattergramma di cellule non trattate dopo 24 ore di coltura. Pannello b: linfociti gamma-irradiati: il citogramma di sinistra mostra l'accumulo di cellule nella regione C; l'istogramma di destra mostra la permeabilità al propidio ioduro delle cellule nelle regioni A e C analizzate separatamente. Pannello c: linfociti gamma-irradiati: il citogramma di sinistra come sopra; l'istogramma di destra mostra l'espressione del CD45 di una regione comprendente le regioni A e C. Pannello d: come in c, eccetto che la regione A e C sono analizzate separatamente per l'espressione del CD45. Pannello e: cellule trattate con NaN_3 , come in d. Pannello f: cellule trattate con anticorpo e complemento C' , come in d. I dati mostrano che l'apoptosi indotta da gamma-irradiazione e da NaN_3 é accompagnata da un'apparente riduzione del CD45 sulla superficie cellulare, al contrario della necrosi indotta dal C' .

- la Figura 2 mostra un'elettroforesi su gel del DNA estratto dai linfociti non trattati (linee 1 e 5); trattati con anticorpo + C' (linee 2 e 6); trattati con NaN_3 (linee 3 e 7); trattati con gamma-irradiazione (linee 4 e 8). Linea 9: DNA da timociti di ratto gamma-irradiati. Per ciascun trattamento sono stati usati linfociti da due donatori normali. Nelle cellule gamma-irradiate e trattate con NaN_3 si genera una frammentazione del DNA indicativa dell'apoptosi, ma non in quelle trattate con C' .

Ing. Barzani & Zanardo
Roma s.p.a.

- la Figura 3 mostra che i linfociti nella regione C degli scatters con un fenotipo CD45 debole hanno la caratteristica frammentazione del DNA e gli aspetti morfologici delle cellule apoptotiche. I linfociti del sangue periferico irradiati sono stati coltivati per 24 ore e poi separati su un gradiente standard di Ficoll-Hypaque. Cellule non separate (1), cellule meno dense recuperate sopra il gradiente (2), e dense recuperate sotto il gradiente (3) sono state analizzate in citometria a flusso per scatters di luce ed espressione del CD45 (pannello A) e in elettroforesi su gel per la frammentazione del DNA (pannello B).

- la Figura 4 mostra che i linfociti morti (scatter-selezionati nella regione C) esprimono significativamente meno determinanti antigenici CD45 delle cellule vitali (selezionate nella regione A), se la morte é causata da apoptosi indotta da gamma-irradiazione (A) o sodio azide (B), ma non se causata da necrosi indotta da anticorpi e C' (C). Sono riportati i dati ottenuti con cellule di 6 (A), 4 (B), e 6(C) diversi donatori normali. L'analisi statistica della comparazione delle intensità lineari di fluorescenza nelle regioni A e C sono state realizzate con il T test di Student per dati appaiati.

- la Figura 5 mostra che l'apoptosi spontanea dei linfociti di pazienti HIV-infettati dopo 24 ore di coltura in vitro genera una frammentazione organizzata del DNA (linee 2, 4, 6 e 8). I DNA delle colture di controllo dei linfociti di individui normali HIV

negativi (3, 5, 7 e 9) non mostrano frammentazione. Linea 1: marcatori di peso molecolare (ϕ X174 RE/HaeIII digerito); linea 10: DNA di timociti di ratto gamma-irradiati.

- la Figura 6 mostra una quantificazione dei linfociti CD3⁺ apoptotici generati in colture non stimulate di linfociti da sangue periferico provenienti da un soggetto normale HIV-negativo (pannelli di sinistra) e da un paziente con infezione da HIV (pannelli di destra). Analisi dei dati da un esperimento rappresentativo. Pannelli A: citogrammi degli scatter luminosi e regioni di analisi per le cellule presunte vitali ed apoptotiche. Pannelli B: doppia colorazione per CD45 e CD3: aspetti di fluorescenza delle cellule nelle regioni A e C, e delimitazione elettronica di analisi delle cellule CD45⁺/CD3⁺. Pannelli C: la soglia CD45 debole/CD45 intenso è stabilita mediante statistica di Kolmogorov-Smirnov come il canale che presenta la più grande differenza tra gli istogrammi delle cellule CD45⁺/CD3⁺ nelle regioni A e C ('gating' logico). Le percentuali di cellule apoptotiche sono calcolate applicando la soglia così definita agli istogrammi sovrapposti, secondo la seguente formula:

$$(\text{numero di cellule a CD45 debole in regione C}) / (\text{numero totale di cellule CD45}^+ (\text{debole} + \text{intenso}) \text{ nelle regioni A e C}) \times 100.$$

- la Figura 7 mostra che linfociti apoptotici circolanti in vivo dopo alte dosi di chemioterapia (a) possono essere evidenziati da uno scatter luminoso (sinistra) e dall'analisi dell'espressione

Ing. Barrano & Barardo
Roma s.p.a.

di CD45 (destra) di leucociti da sangue intero, isolati. Le cellule apoptotiche (principalmente linfociti T $CD3^+$) sono circa il 25% dei linfociti totali. In un paziente con SCID (b) circa il 50% dei linfociti circolanti (virtualmente tutte cellule B) hanno scatter luminosi anormali e ricadono nella regione C, ma esprimono CD45 in maniera simile alle cellule vitali della regione A. Un'elettroforesi su gel del DNA da cellule mononucleate purificate su gradiente, mostra una degradazione del DNA nelle cellule dal paziente sottoposto a chemioterapia (colonna 3), ma non in quelle dal paziente affetto da SCID (colonna 2). Colonna 1: marcatori di peso molecolare; colonna 4: DNA da timociti di ratto irradiati con raggi gamma.

PAZIENTI

Sono stati studiati 13 individui con infezione da HIV, 10 maschi e 3 femmine con età compresa tra 21 e 36 anni (mediana, 28), clinicamente classificati come stadio CDC III. Il numero assoluto di cellule T $CD4^+$ è risultato maggiore di 400 cellule/ μl in 9 pazienti e minore negli altri 4. Un paziente è stato esaminato due volte: quando aveva più di 400 cellule $CD4^+$ / μl e due settimane dopo, quando aveva meno di questo valore. Nessuno dei pazienti aveva ricevuto farmaci antiretrovirali o era affetto da infezioni opportunistiche sistemiche.

Sono stati studiati tre pazienti trattati con farmaci citotossici ad alte dosi. Tutti questi pazienti avevano un cancro

Ing. Barrano G. Riccardo
Roma s.p.a.

del tratto gastrointestinale ed erano stati trattati con mitomicina (20 mg/m^2) e carmustina (600 mg/m^2), somministrati per infusione endovenosa rapida. I campioni di sangue sono stati raccolti prima del trattamento chemioterapico e 16 ore dopo il suo termine, ed immediatamente esaminati. E' stato inoltre esaminato un bambino di quattro mesi, con una diagnosi di immunodeficienza combinata grave (SCID), variante con cellule B (18).

Campioni di sangue da soggetti sani sono stati usati per gli esperimenti in vitro con gli agenti inducenti apoptosi e necrosi, e come controlli negli esperimenti con cellule coltivate da pazienti HIV.

PREPARAZIONE E TRATTAMENTO DELLE CELLULE

Per l'analisi immunocitometrica dei linfociti non separati, campioni di sangue periferico trattati con EDTA sono stati privati degli eritrociti con una soluzione lisante (Ortho Diagnostic Systems, Raritan NJ), secondo le istruzioni del produttore, e le cellule nucleate sono state evidenziate con anticorpi monoclonali o con coloranti del DNA, come descritto di seguito.

Per le colture cellulari, le cellule mononucleate dei campioni di sangue sono state isolate per mezzo di centrifugazione (400 g per $30'$ a 18°C) su un gradiente di densità (Lymphoprep, Nicomed AS Oslo, Norvegia) di

Ing. Parrano & Ranerda
Roma s.p.a.

Ficoll-Hypaque (1.077 mg/ml), lavate e sospese a 1-5 milioni/ml in RPMI-1640 (GIBCO, Grand Island, NY) con il 10% di siero di vitello fetale (FCS) (Biochron KG, Berlino, Germania) e antibiotici (medium completo). Cellule irradiate (6 Gy, con una sorgente di ^{60}Co) e non irradiate sono state coltivate per 24 ore in piastre da 24 pozzetti a 37°C in 5% di CO_2 . La morte indotta con sodio azide (NaN_3) è stata ottenuta incubando le cellule in medium completo contenente 0.2% NaN_3 , da 30' a 16 ore a 37°C in 5% di CO_2 .

La lisi mediata da complemento (C') è stata ottenuta trattando 2-5 milioni di cellule/ml con MoAb anti-CD3 (OKT3, Ortho Diagnostic Systems, Raritan NJ) senza NaN_3 , alla concentrazione di 5 mg/ml, e siero autologo fresco al 20% come fonte di C' , per 30'-90' a 37°C. Dopo i trattamenti le cellule sono state divise e, o colorate e analizzate in citometria a flusso, o lisate per un'elettroforesi su gel del DNA.

COLORAZIONI CON MoAb, COLORANTI SOPRAVITALI, E CITOMETRIA A FLUSSO

Per ogni determinazione, 5×10^5 cellule in 50 μl di medium completo, sono state colorate in doppia marcatura con differenti misture di MoAb, coniugati con isotiocianato di fluoresceina (FITC) o con ficoeritrina (PE), per le seguenti molecole di superficie dei linfociti: CD3 (Leu4), CD4 (Leu3a), CD8 (Leu2a), CD19 (Leu12), CD45 (Anti-leukocyte), CD56 (Leu19), TcR α/β , HLA-DR (tutti forniti dalla Becton Dickinson,

Ing. Barriano & Barriano
Roma s.p.a.

Mountain View, California), LFA-1 e ICAM-1 (Immunotech, Marsiglia, Francia). Le colorazioni sono state realizzate a 4°C per 30', usando quantità saturanti di anticorpo (determinate sperimentalmente per ciascun monoclonale). Dopo un lavaggio, le cellule sono state sospese in medium completo e analizzate in citometria a flusso.

La permeabilità di membrana, come indicatore della fase tardiva di apoptosi e della morte cellulare, è stata valutata colorando con propidio ioduro (PI) o con 7-AAD (Sigma Chemicals Co., St Louis, MO), alla concentrazione di 1 mg/ml, per 30' a 4°C. Le cellule colorate sono state analizzate in citometria a flusso senza ulteriori lavaggi.

Le analisi citometriche e a flusso sono state realizzate usando sia uno strumento Cytoron absolute (Ortho Diagnostic Systems, Raritan NJ), con 256 canali di risoluzione, che un FACScan (Becton-Dickinson, Mountain View, California) con 1024 canali di risoluzione. I parametri di rilevamento degli scatter differenziali della luce sono stati regolati per focalizzare specificamente la regione dei linfociti vitali, sacrificando parzialmente la visione contemporanea di granulociti e monociti. Ciò é stato ottenuto incrementando il guadagno dell'amplificatore del fotodiodo dello scatter anteriore (FW-SC) e sia il guadagno dell'amplificatore che il voltaggio di eccitazione del fotomoltiplicatore dello scatter laterale (RT-SC),

Ing. Barrano & Barardo
Roma s.p.a.

in modo da definire la regione dei linfociti (regione A), come mostrato in fig. 1a.

ANALISI DELLA FRAMMENTAZIONE DEL DNA

L'analisi della frammentazione del DNA è stata realizzata con una lieve modificazione del metodo di Sellins e Cohen (8). Due milioni di cellule isolate, sia fresche che dopo coltura, sono state lavate una volta in RPMI-1640 e raccolte in tubo da microcentrifuga. Le cellule sono state gentilmente risospese in 400 μ l di tampone lisante ipotonico (10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA, pH 7.5, 0.2% Triton X-100) e agitati delicatamente per 30' a 4°C. Successivamente, i nuclei erano raccolti mediante centrifugazione a 12.000 g per 15', e i sopranatanti erano trasferiti in una nuova provetta da microcentrifuga. Il DNA veniva precipitato dai sopranatanti con 50% isopropanolo e 0.5 mmol/L NaCl a -20°C per 16 ore, seguita da centrifugazione a 12.000 g per 15', essiccati e risospesi in 100 μ l di tampone di caricamento (3 mmol/L EDTA, 0.4% SDS, 10% glicerolo, 0.1% blu di bromofenolo) contenente 100 μ g/ml di RNAsi (Sigma Chemical Co.). I campioni sono stati riscaldati a 37°C per 30', e poi a 63°C per 10', caricati su un gel di agarosio all'1.5%, e corsi a 30 V per 16 ore. Il DNA è stato visualizzato con etidio bromuro.

RISULTATI

DISCRIMINAZIONE TRA LINFOCITI UMANI VITALI, APOPTOTICI E NECROTICI

Ing. Barzani & Zanardo
Roma s.p.a.

Una parte dei linfociti del sangue periferico umano irradiati con raggi gamma (6 Gy) ha mostrato, dopo 24 ore di coltura in vitro, modificazioni caratteristiche degli scatter differenziali della luce, e si è accumulata in una ristretta regione dello 'scattergramma' (regione C della Fig. 1A). La dose di radiazioni usata è ottimale per l'induzione dell'apoptosi nei linfociti, che è mostrata in questi esperimenti dalla massiva frammentazione internucleosomica del DNA (Fig. 2). Le cellule irradiate presenti nella regione C hanno un più basso scatter anteriore ed un più alto scatter laterale delle cellule vitali nella regione A, che riflettono una dimensione minore ed una differente organizzazione nucleo-citoplasmatica tipica delle cellule apoptotiche (9). Queste variazioni sono state evidenti chiaramente solo quando il rilevamento della luce di scatter è stato specificamente regolato per focalizzarsi sulla regione dei linfociti (vedi Pazienti e Metodi). Nella regione C il 60-70 % delle cellule erano colorabili con il propidio ioduro. Viceversa, meno del 2% delle cellule in regione A risultavano permeabili a questo colorante (Fig. 1B); circa il 40% delle cellule in regione C erano colorabili dalla 7-AAD (dati non mostrati). L'assetto dell'espressione degli antigeni di superficie delle cellule vitali (delimitate in regione A) e di quelle apoptotiche (delimitate in regione C) è stato esaminato per mezzo di una doppia colorazione con anti-CD45 e MoAbs coniugati con fluocromo, diretti verso le molecole elencate in 'Pazienti e Metodi'. Le

cellule nella regione C risultavano essere soprattutto linfociti T, come determinato dalla colorazione con il MoAb anti-CD3. Le percentuali delle cellule positive per il CD4 ed il CD8, e per gli altri marcatori di superficie esaminati, risultavano approssimativamente confrontabili con quelle dei linfociti vitali in regione A, con l'eccezione dello HLA-DR. Infatti, i determinanti HLA-DR risultavano espressi da una maggiore proporzione di cellule T apoptotiche (circa 30% positive) che non di quelle vitali (<2% positive) (dati non mostrati). Questi risultati sono in accordo con quelli riportati da Malinowski et al. (20) sulla aumentata espressione di HLA-DR da parte di linfociti gamma-irradiati.

L'apparente densità per cellula di tutti gli antigeni di superficie testati, con l'eccezione di HLA-DR, era più bassa sulle cellule apoptotiche che non sui linfociti vitali (dati non mostrati). Tra questi antigeni, la più stringente differenza era osservata per il CD45, l'antigene comune dei leucociti, espresso da tutte le cellule di origine ematopoietica. La considerevole omogeneità di espressione del CD45 sui linfociti vitali ha consentito di distinguere chiaramente due picchi di fluorescenza, uno 'debole' ed uno 'intenso', quando la delimitazione degli scatter di analisi includeva sia la regione C apoptotica che quella A vitale (Fig. 1C); la popolazione CD45 'debole' era costituita esclusivamente dalle cellule nella regione C (Fig. 1D). Per confermare che la ridotta espressione di CD45

Ing. Barano & Barano
Roma s.p.a.

e delle altre molecole di superficie fosse un indicatore specifico di apoptosi, abbiamo trattato i linfociti con agenti presumibilmente in grado di indurre necrosi, quali anticorpo + complemento e NaN_3 . Ambedue i tipi di trattamento comportavano il reclutamento di una notevole frazione di linfociti nella regione 'apoptotica' di scatter (Fig. 1E,F). Nel caso dell'anticorpo + complemento, l'accumulo in questa regione avveniva entro 30' di trattamento, ed era rapidamente seguita da un'ampia dispersione dei 'dot-plots' nell'ambito dello scattergramma. Per contrasto, la maggior parte delle cellule trattate con NaN_3 che entravano nella regione apoptotica vi permanevano per almeno 24 ore. L'espressione del CD45 sulle cellule della regione apoptotica, comparata con quella delle cellule nella regione vitale, diminuiva nei campioni trattati con NaN_3 in una maniera simile a quella osservata dopo gamma-irradiazione (Fig. 1E); al contrario, risultava imm modificata nelle cellule uccise da anticorpo + complemento (Fig. 1F). Questi dati suggerisco che l'anticorpo + complemento uccida realmente le cellule per necrosi, mentre che NaN_3 induca apoptosi. Ciò è stato confermato dall'analisi del DNA, che ha mostrato una tipica frammentazione internucleosomica nei linfociti trattati con NaN_3 , ma non in quelli trattati con anticorpo + complemento (Fig. 2).

Ing. Barrano & Barando
Roma s.p.a.

Per confermare che i linfociti nella regione di scatter C, mostranti un CD45 'debole', fossero effettivamente apoptotici, sono state arricchite queste cellule per mezzo di centrifugazione su gradiente di densità. I linfociti irradiati sono stati coltivati per 24 ore, e poi centrifugati su gradiente di Ficoll-Hypaque. Le cellule dense, che si accumulavano sotto il gradiente, appartenevano alla regione C dello scattergramma, e avevano un fenotipo CD45 'debole' (Fig. 3A). Queste cellule mostravano la degradazione internucleosomica del DNA tipica dei linfociti apoptotici (Fig. 3B). Per contrasto, le cellule meno dense che restavano sopra il gradiente, occupavano la regione A dello scattergramma, ed avevano le caratteristiche di linfociti vitali in base ai criteri sopradetti (Fig. 3).

I risultati di numerosi esperimenti consecutivi con irradiazione gamma, NaN_3 o complemento (Fig. 4) indicano chiaramente che la combinazione di peculiari scatter della luce a di un fenotipo CD45 'debole' è strettamente distintiva dei linfociti apoptotici, e permette la discriminazione di queste cellule dai linfociti vitali e necrotici. La variazione della intensità media di fluorescenza tra le cellule vitali ed apoptotiche corrisponde ad una riduzione apparente della densità di determinanti CD45 di superficie di circa il 50% (Fig.4).

La apparente riduzione della densità di CD45 e di altri antigeni di superficie sui linfociti apoptotici potrebbe essere causata dalla soppressione della loro espressione a livello

Ing. Barrano & Ranardo
Roma s.p.a.

trascrizionale o post-trascrizionale o, forse più probabilmente, alla loro modificazione chimica. infatti, le molecole di superficie delle cellule apoptotiche sono 'fissate' dall'enzima 'transglutaminasi tissutale' (7); pertanto, poiché queste molecole sono almeno parzialmente denaturate dalla fissazione enzimatica, vi potrebbe essere una ridotta disponibilità di determinanti antigenici riconosciuti da MoAb diretti verso epitopi nativi.

RILEVAMENTO E CARATTERIZZAZIONE DI LINFOCITI APOPTOTICI IN COLTURE DI CELLULE MONONUCLEATE DA SANGUE PERIFERICO DI PAZIENTI CON INFEZIONE DA HIV

E' stato riportato che i linfociti da sangue periferico da soggetti HIV infetti vanno incontro ad apoptosi quando coltivati in vitro sia in assenza che in presenza di stimoli attivatori (22,23,24). Queste osservazioni hanno sollevato interesse sul possibile ruolo dell'apoptosi nella patogenesi dell'AIDS (5). E' stato impiegato il saggio descritto precedentemente per ottenere ulteriori informazioni sulla apoptosi linfocitaria nell'infezione da HIV.

E' stato osservato che i linfociti da pazienti HIV, ma non quelli da soggetti normali sieronegativi, quando coltivati in vitro per 24 ore in assenza di stimoli esogeni generano un 'ladder' di DNA caratteristico dell'apoptosi (Fig. 5).

Inoltre, nelle colture di soggetti HIV-infetti, ma non in quelle da soggetti non infetti, venivano generate significative

*Ing. Barzani G. Barzani
Roma S.p.A.*

popolazioni di cellule con le caratteristiche di scatter della luce proprie dei linfociti apoptotici (cellule residenti in regione C); queste cellule erano più dense in un gradiente standard di Ficoll Hypaque ed erano permeabili al propidio ioduro (dati non mostrati).

Nei campioni di linfociti dei pazienti immediatamente dopo la separazione su Ficoll-Hypaque non erano evidenziabili né frammentazione organizzata del DNA, né cellule con scatter tipici della regione C.

Le cellule coltivate sono state analizzate con il saggio per l'apoptosi in base al protocollo illustrato, nell'esperimento rappresentativo mostrato in Fig. 6, che mostra la valutazione quantitativa dei linfociti apoptotici appartenenti alla sottopopolazione $CD3^+$. Le cellule sono state analizzate in immunocitometria in tripla fluorescenza, usando un anti-CD45 in combinazione con anticorpi anti-sottopopolazione, e selezionando elettronicamente quelle cellule delle regioni di scatter A e C, coesprimenti CD45 ed un determinato marcatore di sottopopolazione (CD3 nel caso della figura 6). Le percentuali di cellule apoptotiche sono state calcolate sulla base del numero di cellule CD45 'deboli' esprimenti un dato marcatore di sottopopolazione presenti nella regione C, in rapporto al numero totale delle cellule $CD45^+$ esprimenti quel marcatore presenti in ambedue le regioni. Una oggettiva soglia tra cellule con CD45 'debole' e CD45 'intenso' è stata stabilita

Ing. Barrano & Tanardo
Roma s.p.a.

usando la statistica di Kolmogorov Smirnov per comparare l'intensità di fluorescenza per il CD45 delle cellule esprimenti un dato fenotipo nelle regioni A e C, e prendendo come punto di soglia il canale di fluorescenza con la massima differenza tra le due regioni. Questo approccio consente l'identificazione delle cellule a CD45 'debole' e CD45 'intenso' appartenenti a definite sottopopolazioni; la sua sensibilità è evidenziata dai dati riportati in tabella 1, che mostrano le percentuali medie delle cellule CD3⁺/CD45 'debole' o CD19⁺/CD45 'debole' nelle regioni A e C in differenti popolazioni di pazienti.

Tabella 1

Apoptosi spontanea in vitro dei linfociti da pazienti HIV-infetti: analisi quantitativa e fenotipica delle cellule apoptotiche.

	HIV-	HIV +	
	(n = 5)	> 400 CD4/mmc (n = 9)	< 400 CD4/mmc (n = 4)
CD3			
% CD45 debole*:			
regione A	6.5 ± 2.5 p=NS	7 ± 5	p=NS 10 ± 2
regione C	79 ± 2.3 p=NS	69 ± 9.8	p=NS 79 ± 2.7
% Apoptosi**	2.1 ± 0.5 p=0.0022	5.5 ± 2.7	p=0.0037 15 ± 7.1
CD19			
% CD45debole*:			
regione A	4 ± 2.9 p=NS	7.1 ± 2.2	p=NS 7 ± 3.5
regione C	94 ± 1.4 p=NS	91 ± 4.3	p=NS 99 ± 1
% Apoptosi**	9 ± 2 p=0.0071	27 ± 9.8	p=NS 23 ± 4.7
Rapporto CD4/CD8			
Vitali	1.7 ± 0.98	1.8 ± 0.3	0.58 ± 0.2
	p=NS	p=0.0001	p=0.0023
Apoptotici	2.9 ± 3.27	0.4 ± 0.1	0.19 ± 0.14

Ing. Barrano & Barardo
Roma s.p.a.

Tutti i dati sono espressi come media $\pm$ DS nelle popolazioni esaminate.

* La soglia tra CD45 'debole' e CD45 'intenso' (per le cellule CD3⁺ o CD19⁺) è stata calcolata come descritto in Fig. 6; questi dati forniscono informazioni sulla sensibilità del saggio e sulla sua riproducibilità in differenti popolazioni di soggetti.

** Calcolata per le cellule CD3⁺ o CD19⁺ come descritto in Fig. 6.

§Rapporti tra le percentuali di cellule CD4⁺ e CD8⁺ nell'ambito delle popolazioni cellulari CD45 'intenso'/regione A (vitali) e CD45 'debole'/regione C (apoptotiche). Le analisi statistiche sono state effettuate con il test t di Student.

Questi dati illustrano che le contaminazioni di cellule CD45 'debole' e di cellule CD45 'intenso' nella regione C non sono significativamente diverse nelle popolazioni di individui studiati. I risultati confermano che le variazioni osservate nei parametri citometrici riflettono realmente un fenomeno biologico riproducibile. Inoltre, l'osservazione di un numero relativamente elevato di cellule a CD45 'intenso' nella regione C suggerisce che la perdita d'acqua e la coartazione della cellula precedono la soppressione delle molecole di superficie. La Tabella 1 mostra che le colture da pazienti HIV-infetti con numero di cellule CD4⁺ maggiore di 400/ μ l contenevano un numero significativamente più grande di cellule CD3⁺ apoptotiche che non le colture da soggetti normali. Inoltre, i pazienti con meno di 400 cellule CD4⁺/ μ l avevano una proporzione di linfociti CD3 apoptotici dei pazienti con più di

Ing. Parrano & Ranardo
Roma s.p.a.

400 CD4/ μ l. Anche i livelli di apoptosi delle cellule CD19⁺ sono stati trovati significativamente aumentati nei soggetti infettati da HIV che nei controlli, ma non vi erano differenze tra i pazienti in stadio precoce o avanzato di malattia (Tab.1). Una correlazione tra la quantità dell'apoptosi delle cellule T in vitro e la progressione della malattia è suggerita dall'osservazione che, tra i pazienti infettati da HIV con cellule CD4 maggiori di 400/ μ l, quello con il più alto livello di apoptosi in vitro ha mostrato un drammaticamente rapido declino delle cellule CD4. Infatti, in questo paziente la conta delle cellule CD4 è diminuita da 492/ μ l al momento del primo studio, quando la percentuale di apoptosi delle cellule CD3 era 12.3%, fino al valore di 324 CD4/ μ l osservato solo due settimane dopo, momento in cui l'apoptosi delle cellule T ha raggiunto il 20%. Il declino delle cellule CD4 in questo paziente è stato particolarmente impressionante in considerazione del fatto che esse erano rimaste al disopra di 700/ μ l per più di due anni.

I rapporti CD4/CD8 nelle regioni A e C sono stati utilizzati come misura del coinvolgimento relativo di queste sottopopolazioni T nel processo apoptotico. Per questa analisi sono state considerate solo le cellule a CD45 'debole' in regione C e le cellule a CD45 'intenso' in regione A, in accordo al protocollo illustrato nel paragrafo precedente per la definizione di cellule vitali e apoptotiche all'interno di una data sottopopolazione. Nei soggetti normali, i rapporti CD4/CD8

Ing. Barrano & Tanardo
Roma spa

erano simili nell'ambito delle cellule vitali ed apoptotiche, ad indicare un'assenza di selettività riguardo la morte cellulare. Per contrasto, la significativa differenza tra i rapporti CD4/CD8 nelle popolazioni apoptotiche e vitali dei pazienti, indipendentemente dallo stadio di malattia, dimostrano il sorprendente fatto che il fenomeno dell'apoptosi delle cellule T in vitro nell'infezione da HIV non è né casuale né CD4-specifico, ma piuttosto coinvolge cellule CD8⁺ con una sostanziale selettività.

IDENTIFICAZIONE DI LINFOCITI APOPTOTICI CIRCOLANTI IN VIVO

E' stata valutata la possibilità di utilizzare il saggio per identificare linfociti apoptotici circolanti in vivo in pazienti con infezione da HIV. A questo fine, i leucociti sono stati esaminati immediatamente dopo il prelievo di sangue, e le analisi immunocitometriche sono state eseguite con il metodo della lisi eritrocitaria, evitando quindi il passaggio di separazione cellulare su gradiente di densità che avrebbe rimosso le cellule apoptotiche dal campione. Non abbiamo potuto riscontrare, in questo modo, linfociti apoptotici circolanti né in pazienti con più ($n=6$) o meno ($n=4$) di 400 cellule CD4/ μ l.

Molti farmaci citotossici inducono morte cellulare per apoptosi (25,26). Pertanto, abbiamo seguito lo stesso approccio utilizzando leucociti di sangue periferico non frazionati per ricercare linfociti apoptotici circolanti nel sangue periferico di

Ing. Baranò & Baranò
Roma s.p.a.

tre pazienti con tumori del tratto gastrointestinale dopo breve tempo dal trattamento con farmaci citotossici ad alto dosaggio. I leucociti sono stati esaminati immediatamente dopo la raccolta del sangue, prelevato prima e 16 ore dopo la terapia. In un paziente abbiamo potuto evidenziare, nel campione post-terapia, un quadro citofluorimetrico che suggeriva la presenza di linfociti apoptotici. Infatti, circa il 25% dei linfociti T di questo paziente, identificati mediante doppia colorazione con anti-CD3 ed anti-CD45, risiedevano nella regione di scatter C ed avevano un fenotipo CD45 'debole' (Fig. 7a). La gel elettroforesi del DNA da cellule mononucleate, isolate su gradiente di densità dallo stesso campione di sangue, ha dimostrato una significativa quantità di degradazione internucleosomica (Fig. 7). Questi risultati dimostrano che linfociti apoptotici possono essere rivelati in vivo ed enumerati sulla base del loro fenotipo.

La conferma della specificità del nostro saggio è stata fornita dalle osservazioni in un bambino con SCID. Nel corso di una caratterizzazione fenotipica standard dei linfociti, è stato osservato che una parte dei linfociti di sangue periferico di questo paziente aveva scatter differenziali della luce simili a quelli dei linfociti apoptotici, sebbene essi apparissero leggermente più grandi sulla base dello scatter anteriore (Fig. 7b). tuttavia, queste cellule esprimevano la stessa densità di CD45 dei linfociti residenti in regione A dello scattergramma

Ing. Barzanò & Barzanò
Roma s.p.a.

(Fig. 7b). Il fatto che queste cellule non fossero apoptotiche è stato confermato dalla assenza di degradazione internucleosomica del DNA (Fig. 7). Una ulteriore caratterizzazione ha dimostrato che questi linfociti erano costituiti da una sottopopolazione di cellule B vitali, che sono generalmente più piccole delle cellule T in base allo scatter anteriore della luce.

DISCUSSIONE

Il metodo della presente invenzione permette la identificazione non ambigua e la caratterizzazione di linfociti apoptotici nell'ambito di popolazioni eterogenee di leucociti umani da sangue periferico. I linfociti apoptotici sono identificabili sulla base dei loro tipici scatters della luce e della bassa espressione di determinanti antigenici CD45, e possono essere caratterizzati mediante contemporanea colorazione con altri MoAb. Oltre alla sua semplicità, il metodo offre due vantaggi principali rispetto alle tecniche correntemente usate. Primo, la sottopopolazione di linfociti apoptotici può essere caratterizzata con precisione. Secondo, i linfociti apoptotici possono essere identificati anche in presenza di altre cellule apoptotiche contaminanti, come i granulociti (27), permettendo quindi di evitare passaggi di frazionamento cellulare che possono alterare i risultati.

Per quanto riguarda il primo punto, il fenotipo dei linfociti apoptotici in popolazioni cellulari miste non può essere

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

determinato né con il saggio di frammentazione del DNA (6,8), né con la marcatura contemporanea con coloranti sopravitali e MoAb coniugati con fluocromi (9,12-16). Infatti, il primo approccio non fornisce alcuna indicazione sul tipo cellulare che subisce l'apoptosi, mentre il secondo non discrimina i linfociti apoptotici da quelli necrotici. Inoltre, la permeabilità al propidio ioduro ed alla 7-AAD sopravviene solo nelle fasi tardive dell'apoptosi (12,15). La diretta determinazione del fenotipo dei linfociti che subiscono apoptosi è di particolare importanza per lo studio di condizioni patologiche in cui si presume muoiano specifiche sottopopolazioni linfocitarie, come è il caso delle cellule T CD4⁺ nell'infezione da HIV (5,22-24). Il secondo vantaggio del nostro metodo è che i linfociti apoptotici possono essere identificati in vivo, superando la necessità di procedimenti di separazione cellulare. La classica metodica per il rilevamento dell'apoptosi mediante gel elettroforesi del DNA richiede la separazione dei linfociti dai granulociti per mezzo di centrifugazione su gradiente di densità, poiché il DNA degradato dei granulociti che subiscono l'apoptosi (27), interferisce con il saggio. Tuttavia, questo fatto preclude la quantificazione dei linfociti apoptotici in campioni di sangue freschi, poiché molte di queste cellule scendono al fondo di un gradiente standard di Ficoll Hypaque a causa della loro aumentata densità. I nostri risultati illustrano la validità del nostro saggio nello studio dell'apoptosi in condizioni

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

patologiche umane, con particolare riferimento all'infezione da HIV.

Sulla base dell'osservazione che i linfociti da pazienti HIV-infetti muoiono spontaneamente quando posti in coltura in vitro (22,23), è stato suggerito che l'apoptosi possa costituire un importante meccanismo patogenetico nell'AIDS. Studi precedenti hanno dimostrato che, oltre alle cellule CD4, anche significative quantità di linfociti CD8 subiscono apoptosi in vitro (22,23). Queste osservazioni sono state estese, dimostrando che la morte delle cellule CD8⁺ non solo avviene, ma piuttosto predomina su quella delle cellule CD4⁺. Infatti, le popolazioni di linfociti apoptotici nelle colture da soggetti HIV-infetti contenevano un grande eccesso di cellule T CD8⁺ in confronto alle popolazioni di linfociti T che rimanevano vitali. Inoltre, nei soggetti HIV-infetti, anche le cellule B appaiono programmate ad una esagerata apoptosi indotta dalla coltivazione in vitro, fatto che suggerisce un processo di 'uccisione di spettatori'. Queste osservazioni non sono facilmente conciliabili con la deplezione selettiva delle cellule CD4 che avviene nell'AIDS. Tuttavia, si può ipotizzare che un elemento(i) nocivo(i) coinvolga preferenzialmente, ma non esclusivamente, le cellule CD4 e le programmi all'apoptosi. L'apparente rarità della morte di queste cellule nelle colture di linfociti da sangue periferico potrebbe dipendere dal fatto che, in vitro, le cellule CD4 subiscono un processo apoptotico

Ing. Baranov G. Baranov
Roma s.p.a.

accelerato, e sono pertanto rapidamente rimosse dai monociti oppure divengono non identificabili per mezzo dei marcatori immunofenotipici. Alternativamente, le cellule CD4 programmate in vivo all'apoptosi potrebbero venire sequestrate e morire nell'ambito di specifici microambienti come i linfonodi, dove si verifica un accumulo massivo di HIV (28). Tuttavia, la rilevanza della apoptosi linfocitaria 'spontanea' in vitro rispetto alla patogenesi dell'AIDS è ulteriormente posta in discussione dal fatto che lo stesso fenomeno si osserva nella mononucleosi infettiva indotta dal virus di Epstein-Barr (29). Nonostante queste perplessità, la nostra osservazione di una quantità di morte cellulare più elevata nei pazienti con meno di 400 cellule CD4/mm³ indica che l'apoptosi è associata al progredire della malattia. Questo suggerimento è rafforzato ed esteso dalla nostra osservazione che un paziente con un livello di apoptosi in vitro delle cellule T particolarmente elevato abbia presentato un declino molto rapido delle cellule CD4. sebbene preliminari, questi dati suggeriscono che un alto livello di apoptosi linfocitaria in vitro possa rappresentare un marcatore di malattia a progressione accelerata.

Le osservazioni in un paziente trattato con farmaci citostatici ad alte dosi dimostrano come la tecnica possa essere impiegata per rivelare e caratterizzare linfociti apoptotici presenti in vivo nel sangue periferico. Il fatto che linfociti apoptotici circolanti sono stati evidenziati in uno di tre pazienti

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

trattati con lo stesso protocollo terapeutico è probabilmente dovuto a differenze nella cinetica di generazione e di rimozione delle cellule apoptotiche. Sono necessari studi più estesi per chiarire se il nostro saggio possa essere impiegato per monitorizzare gli effetti di terapie citotossiche.

Anche le tecniche per la rilevazione dell'apoptosi descritte più recentemente soffrono di alcune intrinseche limitazioni: non consentono la determinazione del fenotipo delle cellule apoptotiche, oppure, non discriminano tra cellule apoptotiche e necrotiche o, infine, non identificano le fasi precoci di apoptosi (9, 13-15). Inoltre, queste tecniche sono state finora impiegate solo con timociti o con linee cellulari (9), e richiedono esperimenti specificamente dedicati e spesso complessi. Al contrario, il nostro saggio è molto semplice, si applica bene ai linfociti umani da sangue periferico, ed è basato su un reagente immunologico, l'anticorpo anti-CD45, che è largamente usato nelle indagini immunocitometriche abituali. Infatti, il cosiddetto 'immunogating' dei linfociti con una combinazione di anticorpi anti-CD45 ed anti-CD14 è raccomandata da Ault et al. (30) e da industrie produttrici (Leuko-GATE; Monoclonal Antibody Source Book; Becton-Dickinson). La metodologia qui descritta è, pertanto, potenzialmente utilizzabile in studi clinici su larga scala relativi alla apoptosi linfocitaria nell'AIDS, in oncologia ed in altre malattie umane. A questo scopo, è sufficiente adottare nelle

Ing. Barrano & Barardo
Roma s.p.a.

immunofenotipizzazioni routinarie, appropriati assetti di rilevamento degli scatter differenziali della luce, che includano le regioni A e C come definite dai nostri parametri, e includere nelle analisi sia i linfociti a CD45 'debole' che quelli a CD45 'intenso'. E', chiaramente, essenziale confermare, in questo tipo di studi, che le cellule presenti nelle regioni 'apoptotiche' di scatter luminosi esprimenti fluorescenza CD45 'debole' siano in effetti linfociti, in quanto altre cellule, come i granulociti degranulati ed i leucociti immaturi, possono avere queste caratteristiche. Questo può essere facilmente realizzato utilizzando una doppia colorazione con anti CD45 in combinazione con anticorpi diretti verso specifici marcatori linfocitari.

BIBLIOGRAFIA

1. Ellis RE, Yuan J, Horvitz HR. Annu Rev Cell Biol 7:663, 1991.
2. Raff MC. Nature 356:397, 1992.
3. Cohen JJ. Adv Immunol 50:55, 1991.
4. Korsmeyer SJ. Blood 80:879, 1992.
5. Ameisen JC. Immunol Today 13:388, 1992.
6. Wyllie AH. Nature 284:555, 1980.
7. Piacentini M, Fesus L, Farace MG. Eur J Cell Biol 54:246, 1991.
8. Sellins KS, Cohen JJ. J Immunol 139:3199, 1987.

Ing. Barrano & Tanardo
Roma spa

RIVENDICAZIONI

RM 94 A 000109

1. Metodo per la rivelazione di linfociti apoptotici in un campione biologico comprendente una misurazione quantitativa di recettori CD45 presenti sulla membrana di detti linfociti e sulla membrana di linfociti vitali, in cui detta misurazione avviene a mezzo di legame tra detti recettori CD45 e ligandi specifici per detti recettori, in cui detto legame è evidenziato a mezzo di traccianti.

2. Metodo per la rivelazione di linfociti apoptotici in un campione biologico secondo la rivendicazione 1 in cui detti ligandi comprendono anticorpi monoclonali anti-CD45 o frammenti di essi in grado di legare in maniera specifica il CD45.

3. Metodo per la rivelazione di linfociti apoptotici in un campione biologico secondo la rivendicazione 1 in cui detti ligandi comprendono peptidi sintetici in grado di legare in maniera specifica il CD45.

4. Metodo per la rivelazione di linfociti apoptotici in un campione biologico secondo la rivendicazione 1 in cui detti ligandi comprendono molecole ibride comprendenti anticorpi monoclonali e peptidi sintetici, o anticorpi monoclonali bivalenti in grado di legare in maniera specifica il CD45.

5. Metodo per la rivelazione di linfociti apoptotici in un campione biologico secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti in cui detti ligandi specifici per il CD45 sono

Ing. Barrano & Barardo
Roma s.p.a.

coniugati con molecole traccianti in un rapporto tale da ottenere la migliore risoluzione dell'intensità di espressione del CD45.

6. Metodo per la rivelazione di linfociti apoptotici in un campione biologico secondo la rivendicazione 5 in cui detti traccianti comprendono molecole selezionate dal gruppo di: enzimi, fluocromi.

7. Metodo per la rivelazione di linfociti apoptotici in un campione biologico secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 5 o 6 in cui detti ligandi specifici o detti traccianti sono legati ad una fase solida, in maniera tale da non interferire con le caratteristiche di legame o di rivelazione, rispettivamente, di questi.

8. Ligandi specifici per CD45 per la rivelazione di linfociti apoptotici in un campione biologico comprendenti almeno una delle seguenti molecole: anticorpi monoclonali anti-CD45 o frammenti di essi in grado di legare in maniera specifica il CD45; peptidi sintetici in grado di legare in maniera specifica il CD45; molecole ibride comprendenti anticorpi monoclonali e peptidi sintetici, o anticorpi monoclonali bivalenti in grado di legare in maniera specifica il CD45.

9. Ligandi specifici per CD45 per la rivelazione di linfociti apoptotici in un campione biologico secondo la rivendicazione 8 coniugati con molecole traccianti in un

Ing. Barrano & Ranaldo
Roma s.p.a.

rapporto tale da ottenere la migliore risoluzione dell'intensità di espressione del CD45.

10. Ligandi specifici per CD45 per la rivelazione di linfociti apoptotici in un campione biologico secondo la rivendicazione 9 in cui detti traccianti comprendono molecole selezionate dal gruppo di: enzimi, fluocromi.

11. Ligandi specifici per CD45 per la rivelazione di linfociti apoptotici in un campione biologico secondo la rivendicazione 9 o 10 in cui detti ligandi specifici o detti traccianti sono legati ad una fase solida, in maniera tale da non interferire con le caratteristiche di legame o di rivelazione, rispettivamente, di questi.

12. Kit diagnostico per la rivelazione di linfociti apoptotici in un campione biologico che comprende, come reagenti specifici, un ligando per CD45 secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 8 a 11.

Roma, - 1 MAR. 1994

p.p.: Carbonari Maurizio, Fiorilli Massimo

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

OC

UN MANDATARIO
per sé e per gli altri
Antonio Taliervo
(N° d'iscr. 171)

Taliervo



*Ing. Barzano' & Zanardo
Roma s.p.a.*

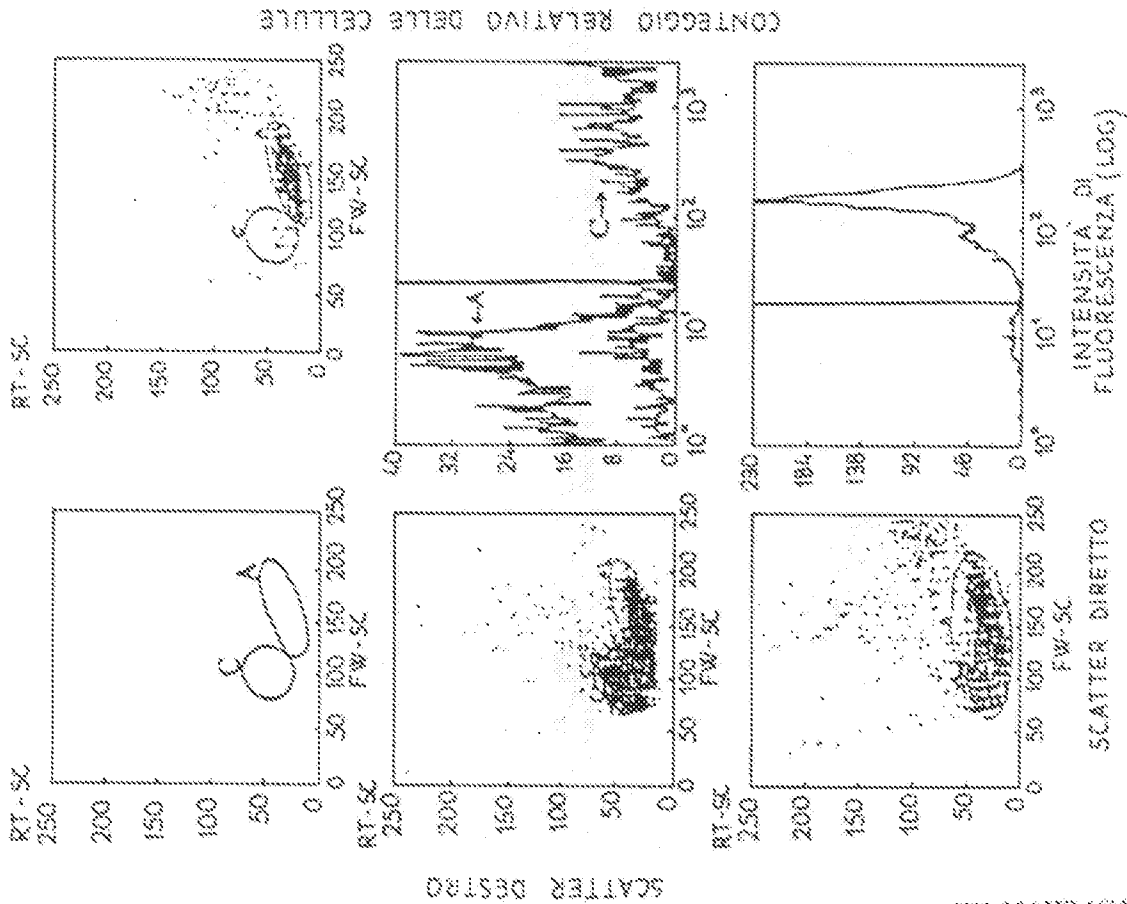
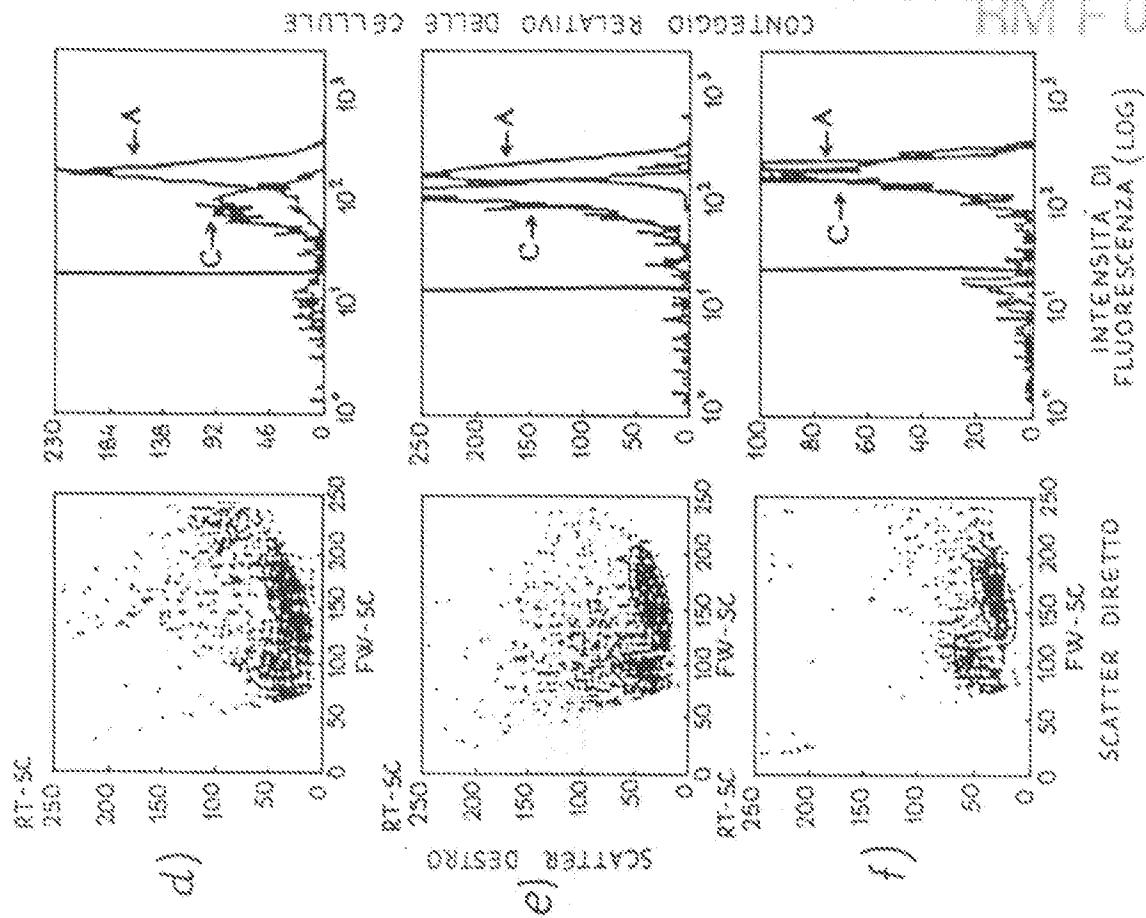


FIG. 1

p.p.: CARBONARI Maurizio, FIORILLI Massimo
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Antonio Talierno
(N° d'iscr. 371)

Talierno

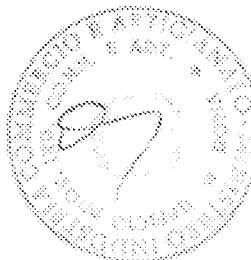
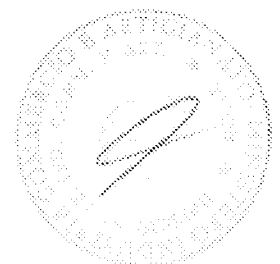
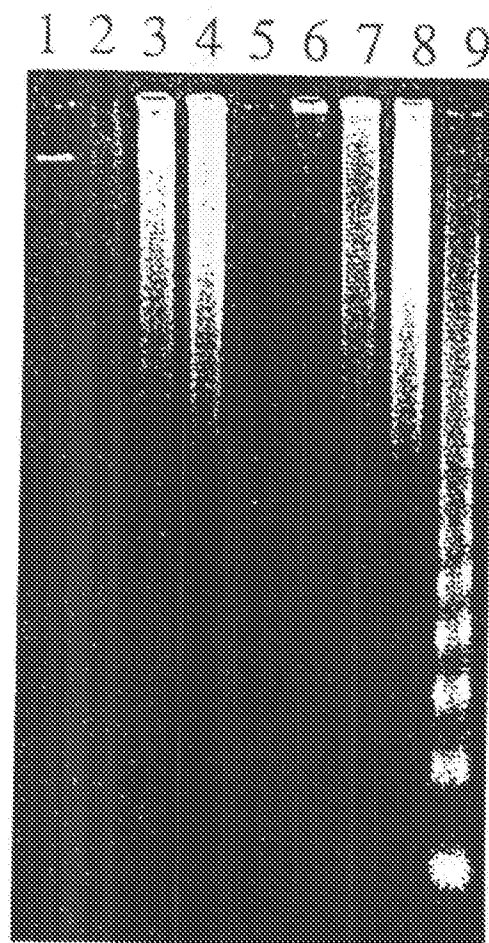


FIG. 2

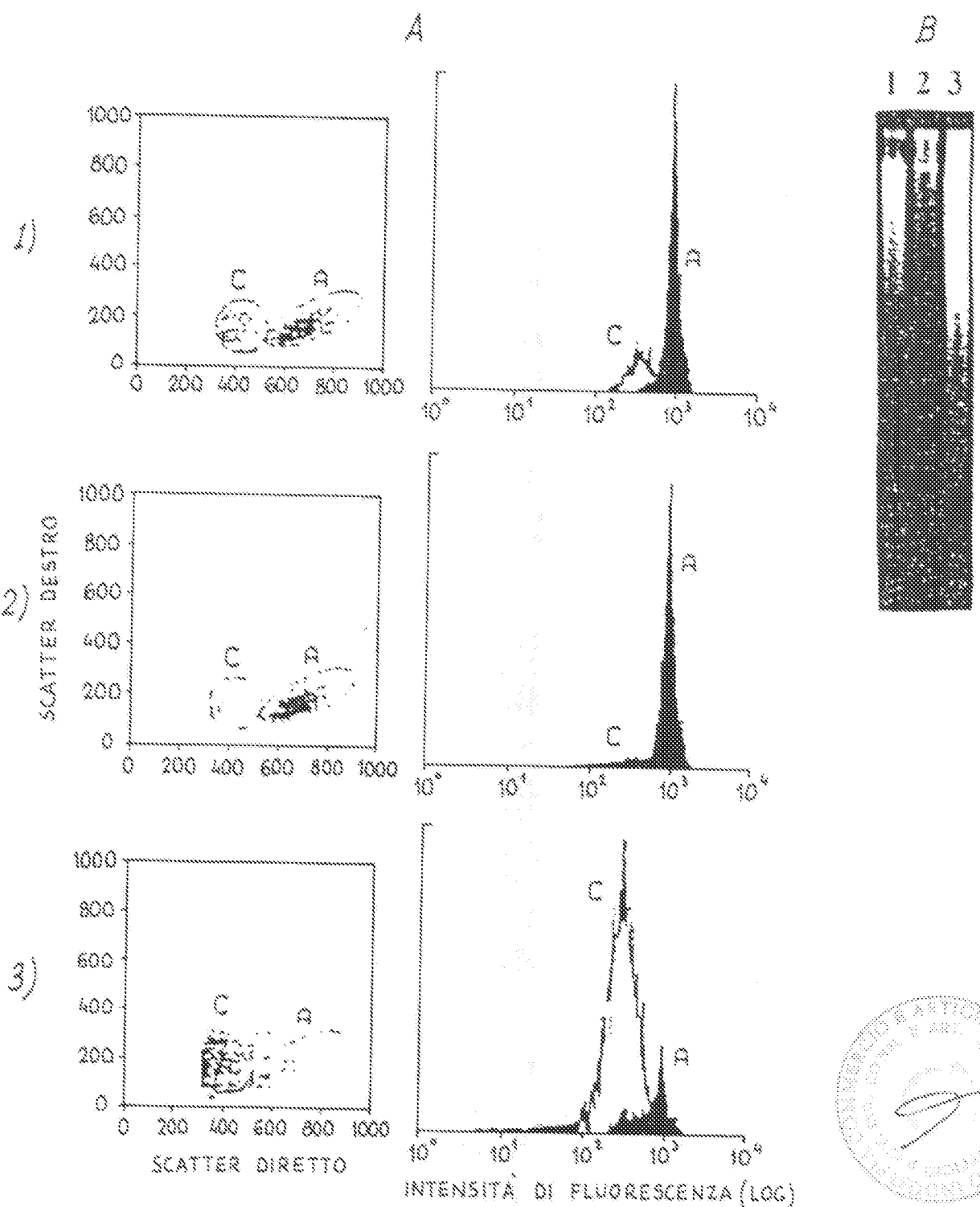


p.p.: CARBONARI Maurizio, FIORILLI Massimo
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

(IL MANDATARIO
per se e per gli altri
Antonio Tallero
(n° d'iscr. 371)

Tallero

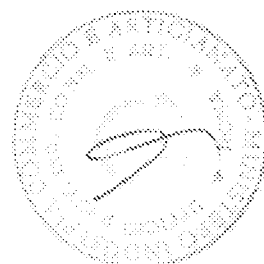
FIG. 3



p.p.: CARBONARI Maurizio, FIORILLI Massimo
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

UN MANDATARIO
per es e per gli altri
Antonio Tallero
(N° d'iscr. 371)

Tallero



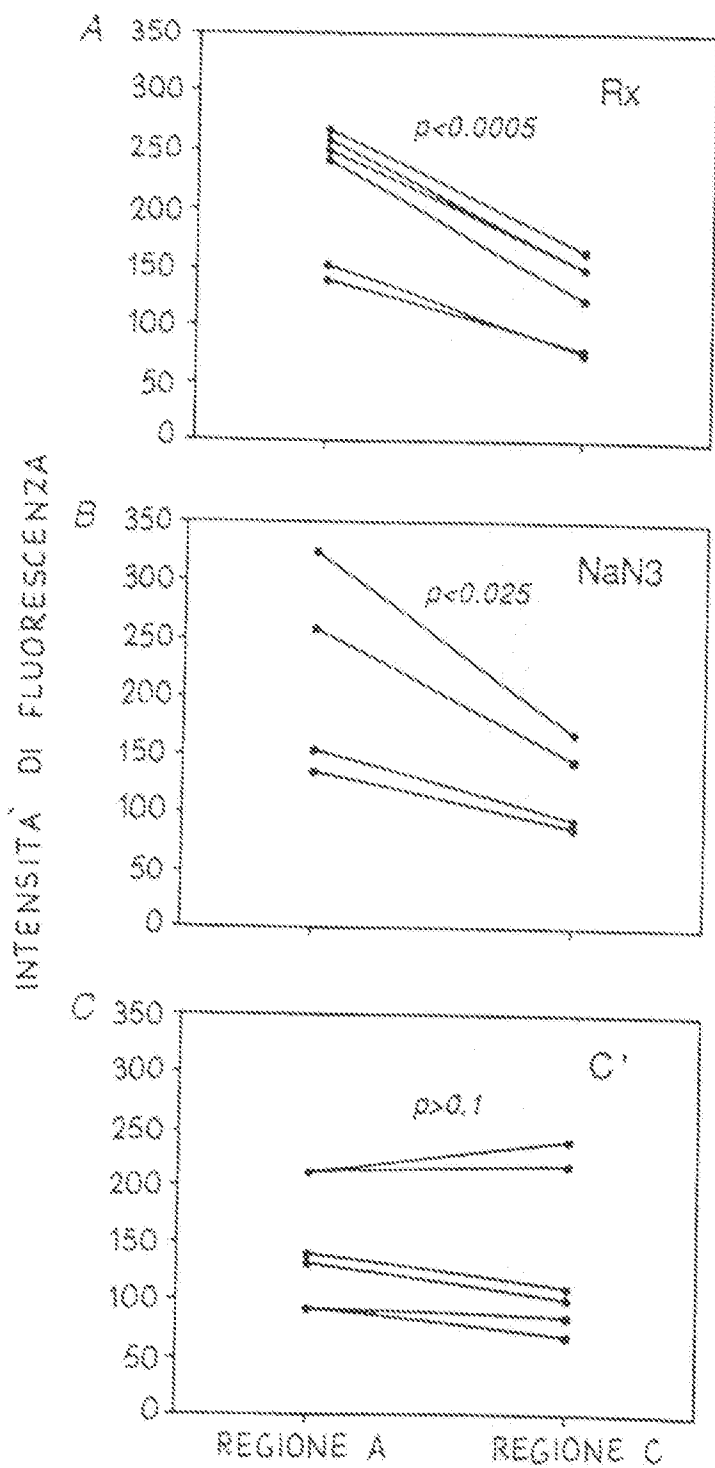


FIG. 4

p.p.: CARBONARI Maurizio, FIORILLI Massimo
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

UN MANDATARIO
per te e per gli altri
Antonio Taliercio
(N° d'iscr. 171)

Taliercio

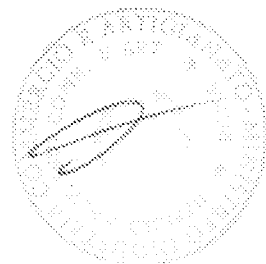
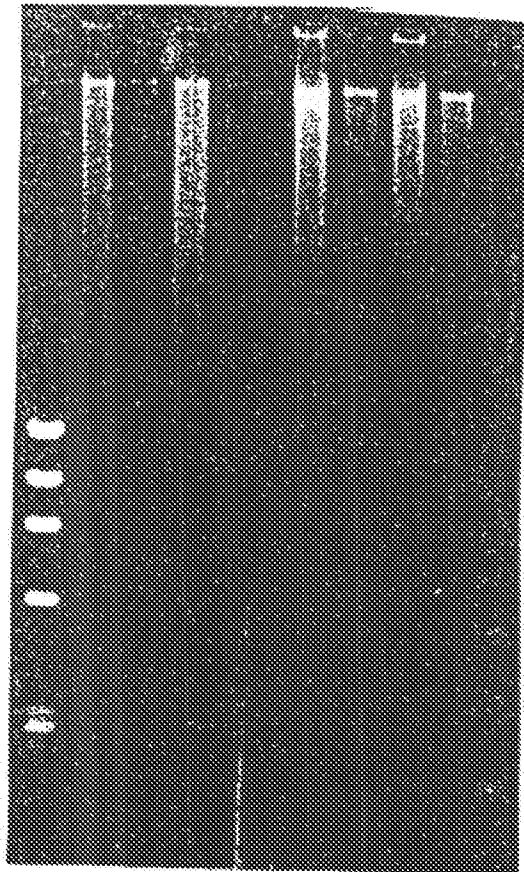


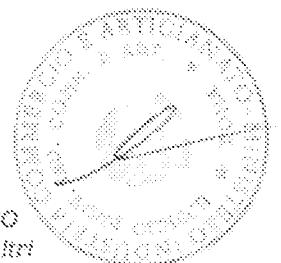
FIG. 5

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



p.p.: CARBONARI Maurizio, FIORILLI Massimo
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

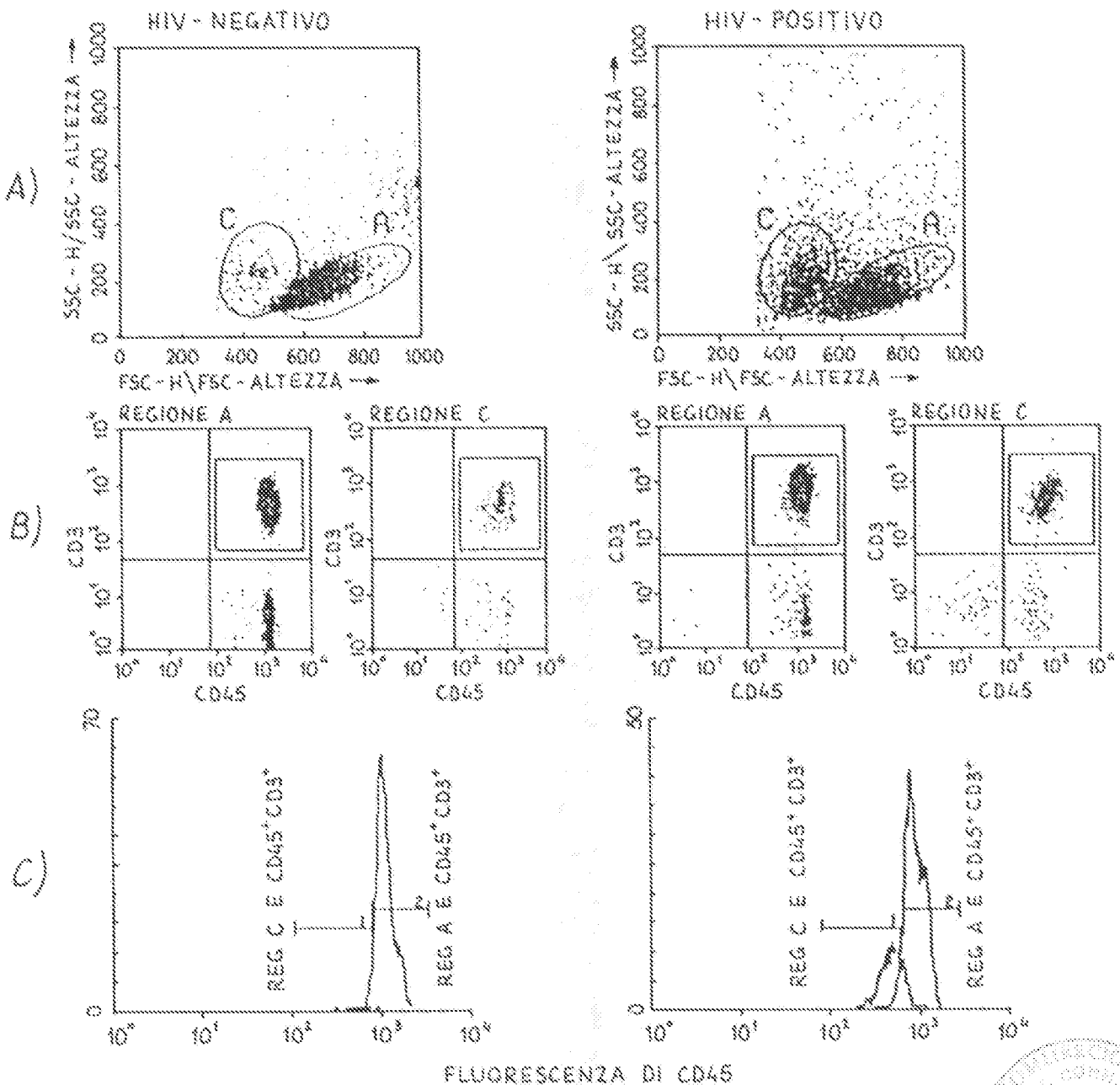
UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Antonio Taliercio
(N° d'iscr. 171)



Taliercio

6/7

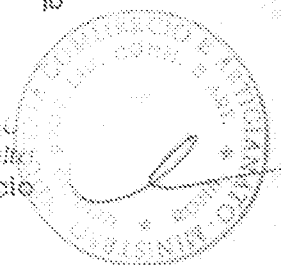
FIG. 6



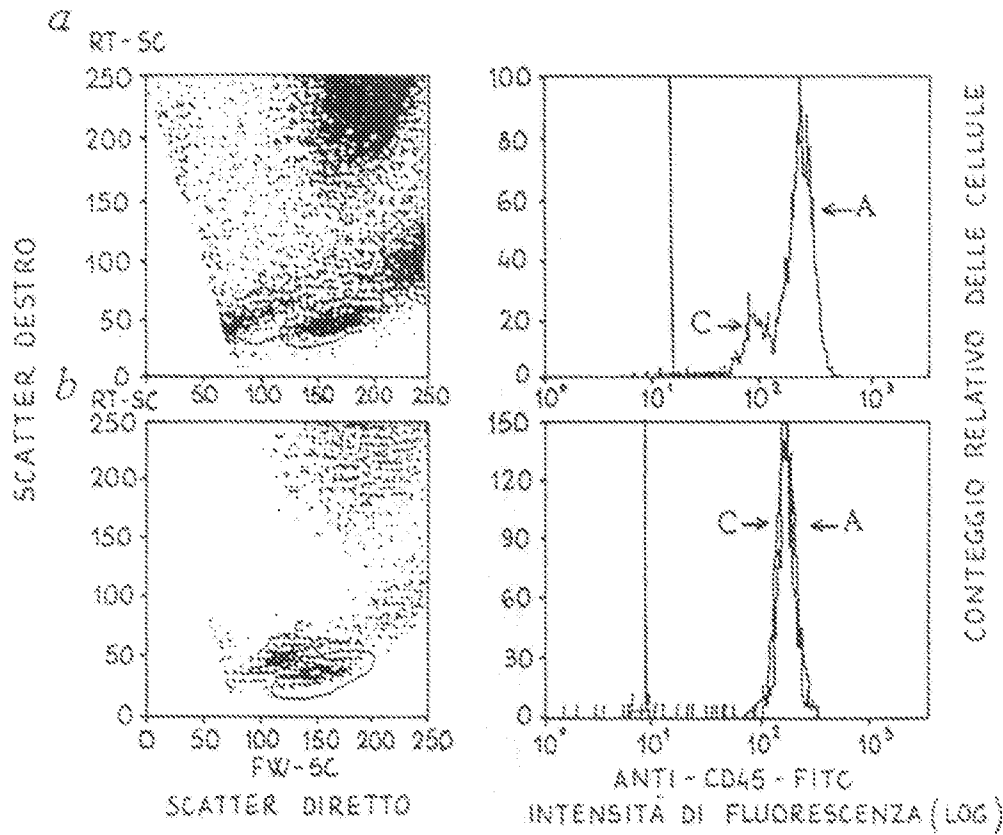
p.p.: CARBONARI Maurizio, FIORILLI Massimo
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

UN MANDATO
per te e per gli altri
Antonio Talerio
(N° d'iscr. 371)

Talerio

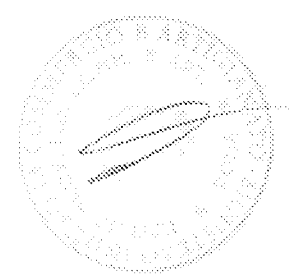
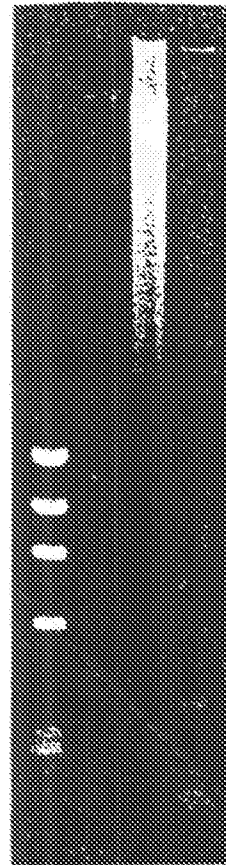


7/7



1 2 3 4

FIG. 7



p.p.: CARBONARI Maurizio, FIORILLI Massimo
ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

UN MANDATARIO
per me e per gli altri
Antonio Tallero
(n° d'iscr. 171)

Tallero