



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

## FLORE

# Repository istituzionale dell'Università degli Studi di Firenze

### **Ibridoma capace di produrre un anticorpo monoclonale anti-HERG1, anticorpo monoclonale così prodotto, metodo per la determinazione**

Questa è la Versione finale referata (Post print/Accepted manuscript) della seguente pubblicazione:

*Original Citation:*

Ibridoma capace di produrre un anticorpo monoclonale anti-HERG1, anticorpo monoclonale così prodotto, metodo per la determinazione dei livelli di proteina HERG1, e kit per tale determinazione / ANNAROSA ARCANGELI; O. CROCIANI. - (2006).

*Availability:*

The webpage <https://hdl.handle.net/2158/261992> of the repository was last updated on 2018-03-19T12:21:58Z

*Terms of use:*

Open Access

La pubblicazione è resa disponibile sotto le norme e i termini della licenza di deposito, secondo quanto stabilito dalla Policy per l'accesso aperto dell'Università degli Studi di Firenze (<https://www.sba.unifi.it/upload/policy-oa-2016-1.pdf>)

*Publisher copyright claim:*

La data sopra indicata si riferisce all'ultimo aggiornamento della scheda del Repository FloRe - The above-mentioned date refers to the last update of the record in the Institutional Repository FloRe

(Article begins on next page)

## TITOLO

“Ibridoma capace di produrre un anticorpo monoclonale anti-HERG1, anticorpo monoclonale così prodotto, metodo per la determinazione dei livelli di proteina HERG1, e kit per tale determinazione“

## RIASSUNTO

La presente invenzione riguarda un anticorpo monoclonale specifico, in grado di riconoscere la proteina HERG1 (Human Ether-a-Gogo-Related Gene-1), l'ibridoma per produrre tale anticorpo monoclonale, un metodo per la determinazione della proteina HERG1 in un campione istologico, ed il relativo kit per la realizzazione di tale metodo, utile nella diagnosi delle patologie a cui è associata una sovraespressione della proteina HERG1.

Classificazione Internazionale: A 61 K 39/00

G 01 N 33/53

Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo:

“Ibridoma capace di produrre un anticorpo monoclonale anti-HERG1, anticorpo monoclonale così prodotto, metodo per la determinazione dei livelli di proteina HERG1, e kit per tale determinazione“

Titolare: UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FIRENZE

con sede in: FIRENZE

Inventori designati: Annarosa ARCANGELI, Olivia CROCIANI

Depositata il 10 Gennaio 2006 con il n° FI2006A000008

\* \* \* \* \*

#### CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione riguarda un anticorpo monoclonale specifico anti-HERG1, l'ibridoma che lo produce, il metodo per la determinazione della proteina HERG1, ed il relativo kit utile per la diagnosi di patologie a cui è associata una sovraespressione della proteina HERG1.

#### STATO DELL'ARTE

E' stato dimostrato già da diversi anni che in presenza di varie patologie neoplastiche cellule tumorali di diversa origine istologica, al contrario delle cellule normali corrispondenti, presentano una sovraespressione del gene *herg1* (Human Ether-a-Gogo-Related Gene-1), che codifica per un canale di K<sup>+</sup>, detto canale HERG.

La struttura del canale HERG è caratterizzata dalla presenza di quattro subunità proteiche disposte simmetricamente attorno ad un poro centrale P, in modo che ciascuna subunità, con la propria regione centrale idrofobica, delimiti tale poro P; il canale presenta una porzione

non citoplasmatica, detta “porzione extra-cellulare” del canale HERG e identificata come porzione S5-poro.

La sovraespressione del gene *herg1* e del canale corrispondente è stata dimostrata in neoplasie umane di varia origine, quali ad esempio adenocarcinomi dell’endometrio (Cherubini A. et al., *Br. J. Cancer*, 83: 1722-1729, 2000) e del colon (Lastraioli E. et al., *Cancer Res.* 64: 606-11, 2004), astrocitomi (Masi A. et al., *Br. J. Cancer*, 93: 781-792, 2005) e in vari tipi di leucemie e linfomi (Pillozzi S. et al., *Leukemia* 16: 1791-1798, 2002; Smith G.A. et al. *J. Biol. Chem.* 277: 8528-18534, 2002).

E’ inoltre stato dimostrato che l’attività del canale HERG regola il valore di voltaggio a livelli favorevoli alla crescita e alla sopravvivenza delle cellule tumorali, cosicché il canale HERG risulta avere una funzione rilevante e di vario tipo nel processo di avanzamento della neoplasia, che include il controllo della proliferazione cellulare e dell’apoptosi, la regolazione dell’invasività delle cellule tumorali e della angiogenesi.

Da ciò deriva che l’individuazione di un anticorpo monoclonale specifico capace di riconoscere la proteina HERG1 rappresenterebbe uno strumento essenziale di diagnosi di queste patologie, così eterogenee tra loro, ma che mostrano tutte una sovraespressione di HERG1.

Inoltre, l’aumento dei livelli di HERG si è dimostrato correlato con l’aumento della malignità nei carcinomi colon-rettali e nelle lesioni neoplastiche dello stomaco, ed in leucemie acute mieloidi, pazienti HERG positivi presentano una prognosi più sfavorevole di pazienti non esprimenti HERG.

L'individuazione di un tale anticorpo potrebbe perciò portare anche a significativi avanzamenti nella scelta del trattamento, e nel monitoraggio delle patologie sopra menzionate.

#### SOMMARIO DELL'INVENZIONE

Ora la Richiedente ha individuato un ibridoma, selezionato con metodi convenzionali descritti in dettaglio nel seguito, capace di produrre un anticorpo monoclonale specifico anti-HERG1 con un processo di preparazione condotto secondo metodologie convenzionali, descritte in dettaglio nel seguito.

Tale anticorpo monoclonale è un anticorpo specifico anti-HERG1 e in particolare contro la sua porzione extra-cellulare. Per quanto riportato sopra, tale anticorpo può essere usato per la determinazione dei livelli della proteina HERG1 in campioni istologici prelevati da pazienti che richiedono una diagnosi di patologie alle quali è associata una sovraespressione della proteina HERG1.

Rappresenta pertanto oggetto dell'invenzione un ibridoma capace di produrre una quantità percettibile di un anticorpo monoclonale specifico contro la porzione extracellulare S-5 poro della proteina HERG1, comprendente il prodotto della fusione tra una cellula immortalizzata ed un linfocita ottenuto dopo immunizzazione di un animale ospite con un peptide di sequenza EQPHMDSRIGWLHN.

L'anticorpo monoclonale specifico contro la porzione extra-cellulare della proteina HERG1 prodotto dal suddetto ibridoma, costituisce ulteriore oggetto dell'invenzione.

Ulteriori oggetti dell'invenzione sono inoltre un metodo per la determinazione dei livelli di proteina HERG1 in campioni istologici prelevati da pazienti che richiedono una diagnosi di patologie alle quali è associata una sovraespressione della suddetta proteina, ed un kit per la realizzazione di tale metodo, comprendente il suddetto anticorpo monoclonale.

#### BREVE DESCRIZIONE DELLE FIGURE

Figura 1: Immunoistochimica eseguita con il sovranatante dell'ibridoma non diluito, selezionato come descritto nell'Esempio 1 seguente, senza l'utilizzo di permeabilizzazione cellulare.

Figura 2: Analisi citofluorimetrica di cellule HEK293 trasfettate con il gene hERG1 (HEK-hERG1) In verde, è mostrato il controllo negativo (HEK293-hERG1 marcate con il solo anticorpo secondario, anti-mouse IgG FITC); in blu, HEK293-hERG1 marcate con l'anticorpo monoclonale anti-HERG1 ottenuto come descritto nell'Esempio 1 e con l'anticorpo secondario anti-mouse IgG FITC.

Figura 3: A) Colorazione con blu di Comassie di un gel al 6% ottenuto tramite elettroforesi in condizioni non riducenti. I 3 campioni sono rappresentati dallo standard, l'anticorpo A7 purificato (10 µl) ottenuto come descritto nell'Esempio 2, e un anticorpo monoclonale anti-tubulina (IgG<sub>2a</sub>, 200 ng/µl, Santa Cruz Biotechnology). B) Colorazione con blu di Comassie eseguito su gel al 10% in condizioni riducenti; i 9 campioni sono: standard, anticorpo purificato ottenuto come descritto nell'Esempio 2 (1 µl, 2µl, 5µl, 10 µl, 15 µl) e BSA (0,1 µg, 0,2 µg, 0,5 µg).

## DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Secondo l'invenzione, la linea cellulare usata come popolazione immortalizzata per la selezione dell'ibridoma, appartiene alla linea cellulare NS0 neoplastica murina, mentre l'animale ospite usato di preferenza per la produzione dell'ibridoma è il topo.

L'anticorpo monoclonale ottenuto secondo l'invenzione può essere purificato mediante cromatografia per affinità mediante proteina A legata a sefarosio.

I requisiti che l'anticorpo anti-hERG1 dell'invenzione ha mostrato di possedere, sono essenziali per considerare tale molecola non solo un mezzo essenziale di identificazione della proteina nella ricerca di base, ma anche per la sua applicazione in diagnostica ed in clinica. Infatti, l'epitopo specifico di tale anticorpo si trova a livello di una porzione del canale capace di interagire con l'unità funzionale della proteina (il poro P), così da indurre alterazioni sulle caratteristiche biofisiche e quindi sui processi biologici che ne sono influenzati (ad es. proliferazione e capacità invasiva delle cellule neoplastiche).

Inoltre, in diagnostica, l'anticorpo monoclonale secondo l'invenzione può essere usato per la determinazione dei livelli di HERG1 che, come spiegato sopra, sono indice della presenza di patologie in cui tale proteina viene sovraespressa, quali ad esempio neoplasie umane di varia origine, come adenocarcinomi dell'endometrio e del tratto gastro-intestinale, astrocitomi e vari tipi di leucemie e linfomi. La determinazione secondo il presente metodo viene condotta su un campione istologico prelevato al paziente che necessita della diagnosi.

Rientra negli scopi dell'invenzione un kit adatto a realizzare tale metodo, comprendente il presente anticorpo monoclonale.

Oltre all'anticorpo, il presente kit può inoltre comprendere il peptide con il quale è stata prodotta la proteina, un adatto standard di controllo, ed uno o più tamponi a scopo di diluizione e mantenimento del valore di pH appropriato per non alterare la struttura e la capacità di legame anticorpale.

I seguenti esempi sono riportati a scopo illustrativo e non limitativo dell'invenzione.

#### ESEMPIO 1

##### Selezione dell'ibridoma e produzione dell'anticorpo monoclonale

##### Immunizzazione

Tre topi BALB C acquistati dalla Ditta Harlan sono stati inoculati con un peptide diretto contro 14 amminoacidi della porzione extracellulare S5-poro della proteina HERG1 umana (residui 575-588 della sequenza conservata in Banca Dati, Numero di Accesso NM 000238). Tale peptide è stato acquistato dalla ditta PRIMM s.r.l. La sequenza specifica è la seguente:EQPHMDSRIGWLHN.

In particolare, sono stati eseguiti tre inoculi intramuscolari nell'arco di 45 giorni e due inoculi endovena a distanza di 2 settimane l'uno dall'altro.

##### Protocollo di fusione cellulare

Dopo 3 giorni dal secondo inoculo endovenoso sono state prelevate le milze dei tre topi immunizzati: una milza è stata congelata dopo disgregazione meccanica, mentre le altre due sono state utilizzate immediatamente per l'esperimento di fusione cellulare.

Per ogni milza, 100.000.000 di linfociti ottenuti dalla disgregazione meccanica sono stati fusi con altrettante cellule NS0 (cellule di mieloma murino) mediante l'utilizzo di una soluzione acquosa di polietilen glicole al 50%.

Sono state quindi effettuate quattro diverse diluizioni (1:2; 1:4; 1:8; 1:16) del volume totale derivante dalla fusione (48 ml) e sono stati preparati 96 pozzetti del diametro di 1,4 cm l'uno.

#### Selezione colture cellulari positive

Mediante test ELISA è stata valutata la presenza dell'anticorpo nel terreno delle varie colture cellulari. Tra queste sono state selezionate quelle con assorbanza maggiore di 2 rispetto al controllo, rappresentato dal solo terreno di coltura.

#### Amplificazione delle colture positive

Tutte le colture risultate positive sono state amplificate (dai pozzetti di 1,4 cm sono state fatte crescere fino ad essere in grado di riempire una fiasca da 25 cm<sup>2</sup>), in modo da ottenere almeno 10.000.000 di cellule per ognuna e da congelarle in azoto liquido ( $10^7$  è infatti la concentrazione necessaria perchè le cellule non muoiano durante il congelamento). Prima del congelamento sono stati eseguiti tre test ELISA per ogni coltura cellulare.

Delle 96 colture di partenza ne sono state congelate 10.

#### Clonazione in soft agar

Le tre colture migliori, oltre che essere congelate, sono state clonate in soft agar, in modo da ottenere colture cellulari derivanti da una singola cellula (cloni). Per ogni coltura sono state fatte quattro piastre di soft

agar del diametro di 6 cm con 1.000, 10.000, 20.000, 40.000 cellule, rispettivamente. Dopo circa tre settimane sono stati prelevati singoli cloni derivanti da una cellula e sono stati rimessi in coltura in pozzetti dal diametro di 0,6 cm. Sono stati ottenuti circa 80 pozzetti per ognuna delle 3 colture cellulari.

#### Selezione dei cloni positivi

Ciascun clone è stato sottoposto a test ELISA e sono stati mantenuti tutti i cloni con assorbanza maggiore di 2 rispetto al controllo, rappresentato dal solo terreno di coltura.

#### Amplificazione dei cloni positivi

Tutti i cloni risultati positivi sono stati amplificati (dai pozzetti da 0,6 cm sono stati fatti crescere fino ad essere in grado di riempire una fiasca da 25 cm<sup>2</sup>) in modo da ottenere almeno 10.000.000 di cellule per ognuno e congelarle in azoto liquido. Prima del congelamento sono stati eseguiti cinque test ELISA per ogni clone.

Dei 240 cloni di partenza ne sono stati congelati 30.

Di questi 30, ne è stato selezionato 1, denominato A7, che riconosce l'epitopo antigenico specifico in forma nativa ed è efficiente, anche sottoforma di sovrantante cellulare non purificato, in esperimenti di immunostochimica (Figura 1) e citofluorimetria (Figura 2) descritti in dettaglio nei seguenti Esempi 3 e 4, senza l'utilizzo di permeabilizzazione cellulare, procedura che compromette la vitalità cellulare.

#### ESEMPIO 2

Purificazione dell'anticorpo monoclonale

L'anticorpo A7 selezionato secondo la procedura descritta sopra nell'Esempio 1, è stato successivamente purificato per ottenere una preparazione con un grado di purezza ed una concentrazione tali da avere la massima efficienza della proteina nella gran parte dei protocolli sperimentali. A tal fine, il clone di ibridomi secernente l'anticorpo di nostro interesse, normalmente mantenuto ad elevate concentrazioni sieriche (20% di BMP = Basal Medium Supplement), è stato adattato a crescere in presenza di concentrazioni di siero più basse (5-10% di BMP). La capacità del clone di ibridomi di produrre l'anticorpo è stata costantemente monitorata, tramite test ELISA, durante tutte le fasi di adattamento alla crescita.

In seguito, mediante una colonna di 2 ml di proteina A legata a sefarosio, sono stati purificati circa 450 ml del sovranatante. Il terreno di coltura, che conteneva quantità variabili di BMP (5-20%), è stato previamente filtrato attraverso filtri con pori di 0,2  $\mu\text{m}$ , in condizioni sterili. Prima dell'applicazione del sovranatante, la colonna è stata equilibrata con una soluzione di Potassio Fosfato 1 M (pH 9,0), che è stata utilizzata anche come soluzione di lavaggio. La velocità di flusso è stata mantenuta costante per tutta la durata dell'esperimento (circa 0,5 ml/minuto). Alla fine, dopo opportuni lavaggi, la colonna è stata eluita con una soluzione di Acido Citrico 0,1 M (pH 3,0). Sono state raccolti circa 10 ml di eluato monitorando l'avvenuta eluizione mediante una conta spettrofotometrica a 280 nm. Il pH di ogni aliquota è stato istantaneamente neutralizzato all'uscita della colonna con una

soluzione di Tris-HCl 1,5 M pH 9,0 per impedire la degradazione dell'anticorpo. In seguito, un piccolo volume di ogni campione è stato fatto correre su un gel di acrilammide e colorato con Blu di Comassie per valutare la purezza e l'effettiva concentrazione delle varie aliquote (Figura 3). Mediante un gel al 6%, eseguito in condizioni non riducenti, si è verificato che i vari campioni di anticorpo purificato non presentassero alcuna traccia dei contaminanti presenti nel terreno di partenza; inoltre, con una corsa in condizioni riducenti in un gel al 10%, paragonando l'intensità di segnale dei vari campioni con concentrazioni note di albumina bovina (BSA), è stato possibile valutare la quantità di anticorpo purificato.

### ESEMPIO 3

#### Valutazione dell'efficienza dell'anticorpo in esperimenti di citofluorimetria

L'anticorpo purificato ottenuto come descritto sopra nell'Esempio 2, è stato impiegato in esperimenti di citofluorimetria, dove si è dimostrato efficiente non solo nel riconoscere l'epitopo specifico in cellule iperesprimenti hERG1 (vedi Figura 1), ma anche in una linea che lo esprime endogenamente, la linea leucemica monoblastica umana FLG 29.1. Per tale protocollo i campioni di cellule da testare vengono prelevati da piastre Petri: il terreno viene tolto mediante aspirazione e si effettuano due lavaggi con PBS. I campioni vengono poi posti in centrifuga per 5 minuti a 2000 rpm. Al termine della centrifugata, si aspira il PBS, si aggiunge l'anticorpo primario (monoclonale purificato non diluito o diluito opportunamente) e si lascia il tutto 15 minuti a

temperatura ambiente e 15 minuti a 37°C. In seguito, si centrifugano i campioni per 5 minuti a 2000 rpm e si aspira l'anticorpo primario; si effettua un lavaggio con 0,5 ml di PBS e si centrifuga per 5 minuti a 2000 rpm. Si ripetono gli ultimi due passaggi una volta e si aggiunge l'anticorpo secondario diluito in PBS (1 µg di anticorpo → 1 µl di anticorpo e 99 µl di PBS). L'anticorpo secondario è un'anti IgG di topo marcato con fluoresceina (FITC). Si incuba per 15 minuti a 37°C. Successivamente, si centrifuga per 5 minuti a 2000 rpm, si aspira e si aggiungono 0,5 ml di PBS. I campioni sono pronti per la lettura al citofluorimetro. I campioni (come quelli mostrati in Figura 2) sono analizzati utilizzando un FACScan a flusso citometrico (Becton Dickinson) dotato di un laser ad ioni Argon di 5 W.

#### ESEMPIO 4

##### Valutazione dell'efficienza dell'anticorpo in esperimenti di immunofluorescenza

Per definire se l'anticorpo monoclonale purificato come descritto sopra nell'Esempio 2, potesse essere impiegato in future ricerche sulle relazioni "struttura-funzione" del canale hERG1 e sulle sue interazioni con proteine coinvolte nel movimento cellulare e nel processo di invasività tumorale, è stata valutata la sua efficienza in esperimenti di immunofluorescenza.

In tale metodica, sono utilizzate cellule trasfettate transientemente con il canale HERG1, mediante Lipofectamine Reagent (Invitrogen). Le cellule dopo 48 ore dalla trasfezione sono fissate mediante una soluzione di Paraformaldeide in PBS al 4% per 15 minuti a temperatura

ambiente. Viene in seguito effettuato un lavaggio con una soluzione di glicina 100 mM per 10 minuti e due ulteriori lavaggi con una soluzione di PBS. Segue un'incubazione per 10 minuti con una soluzione acquosa di Albumina Bovina al 3%, in modo da saturare i siti di interazione aspecifica e da ottenere un segnale anticorpo-specifico. La soluzione viene eliminata sempre con due lavaggi con PBS, e si procede all'incubazione con 50  $\mu$ l di anticorpo primario monoclonale per tutta la notte. Abbiamo utilizzato l'anticorpo primario sia in forma non diluita che diluita in PBS 1:2, 1:10, 1:20. La mattina successiva si procede a due lavaggi con PBS, seguiti dall'incubazione con l'anticorpo secondario per 45 minuti. L'anticorpo secondario è un'anti IgG di topo marcato con fluoresceina (FITC). Dopo ulteriori cinque lavaggi in PBS, di 5 minuti ciascuno, si montano i vetrini utilizzando il Mowiol 4-88 (Calbiochem, che permette l'adesione del vetrino copri-oggetto su cui sono attaccate le cellule ad un supporto) così da rendere il segnale fluorescente (di per sé poco durevole), indice del legame antigene-anticorpo, più stabile. Dopo aver fatto asciugare i vetrini per alcune ore a temperatura ambiente si può procedere all'osservazione al microscopio a fluorescenza. La preparazione di anticorpo monoclonale da noi utilizzata si è dimostrata efficiente soprattutto alla diluizione maggiore (1:20), con la quale è evidente la specificità di legame dell'anticorpo (presentano un segnale positivo soltanto le cellule trasfettate, circa il 60% della popolazione totale).

ESEMPIO 5

Metodo per la determinazione dei livelli di HERG1 in campioni istologici  
(come mostrato in Figura 2)

Il metodo impiegato si basa sull'utilizzo di due anticorpi (*metodo indiretto*): un anticorpo primario (monoclonale), non marcato e diretto contro l'antigene da identificare, e un anticorpo secondario, coniugato con una perossidasi, che riconosce e lega l'anticorpo primario. In questo modo, più copie di secondario possono legarsi all'anticorpo primario, con il risultato di un segnale più evidente, e senza che la specificità dell'anticorpo primario verso l'antigene venga modificata dai procedimenti chimici impiegati per la marcatura. L'utilizzo di una perossidasi legata al secondario aumenta, inoltre, la sensibilità dei metodi immunostochimici, perché occorrono poche molecole di enzima per produrre una reazione visibile al microscopio. L'enzima coniugato all'anticorpo secondario viene rivelato tramite una reazione istochimica che utilizza come substrato la Dab (Diaminobenzidina).

Per l'analisi, si utilizzano sezioni di mucosa colica umana, che non esprime la proteina contro cui è diretto l'anticorpo, e sezioni di adenocarcinoma del colon, che la iperesprimono, come riportato in letteratura (Lastraioli E. et al., *Cancer Res.* 64: 606-11, 2004).

Le sezioni vengono sparaffinate, attraverso tre passaggi in toluolo di 5 minuti ciascuno, e reidratate attraverso la serie discendente degli alcool [alcool assoluto (5') - alcool 75% (5') - alcool 50% (5')], fino all'acqua distillata (5 minuti). Le fette vengono trattate, per 20 minuti, con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1% in PBS a 25°C al buio (500-1000 µl di soluzione su ciascun vetrino, sopra le fette). Questo trattamento viene eseguito per bloccare l'azione

delle perossidasi endogene che potrebbe falsare il risultato ottenuto, in quanto la tecnica immunistochemica si basa sostanzialmente su una reazione di perossidazione. Tolta l' $H_2O_2$ , si fanno due lavaggi, di 5 minuti ciascuno, con 200  $\mu$ l di PBS per fetta. Segue il trattamento con una soluzione di Proteinasi K in PBS (5  $\mu$ g/ml) per 5 minuti a 37°C. Tale passaggio permette il cosiddetto "smascheramento antigenico", ovvero l'eliminazione di tutte le porzioni proteiche che nascondono l'antigene. Dopo aver eseguito altri due lavaggi con PBS, le fette vengono trattate per 4 minuti con Ultra V block (Lab Vision) a temperatura ambiente (50  $\mu$ l per fetta), in modo da saturare i siti di interazione aspecifica e da ottenere un segnale anticorpo-specifico. La soluzione viene eliminata sempre con due lavaggi con PBS, e si procede all'incubazione con 50  $\mu$ l per fetta di anticorpo primario monoclonale tutta la notte a 4°C. Abbiamo utilizzato l'anticorpo primario sia in forma non diluita che diluita in PBS 1x Ultra V block 1:2, 1:10, 1:20. La mattina successiva si procede a due lavaggi con PBS, seguiti dall'incubazione con l'anticorpo secondario, coniugato all'enzima perossidasi (Picture Plus Kit, Zymed), per 10 minuti a temperatura ambiente. Tale anticorpo è un polimero contenente gruppi Fab (che riconoscono l'anticorpo primario indipendentemente dalla specie di origine) e molecole enzimatiche. Terminati i 10 minuti, e fatti due lavaggi con PBS, si aggiungono una o due gocce per fetta di Dab, lasciandola agire per circa 8-10 minuti. In seguito alla reazione enzimatica, il substrato incolore viene convertito in un precipitato marrone. Si lava, poi, con  $H_2O_2$  distillata per 5 minuti e si procede alla controcolorazione con ematossilina: a tale scopo, le fette

vengono coperte, per 5 minuti, con ematossilina di Meyer, trasferite in acqua di fonte per 5 minuti, per permettere il viraggio del colore, e, infine, lasciate per altri 5 minuti in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> distillata. Si procede poi alla disidratazione delle sezioni nella serie ascendente degli alcool (alcool 50% - alcool 75% - alcool assoluto). Dopo due passaggi in toluolo, di 5 minuti ciascuno, si montano i vetrini utilizzando l'Entellan (Merch) che permette l'adesione del vetrino copri-oggetto ad un supporto. Dopo aver fatto asciugare i vetrini per alcune ore a temperatura ambiente si può procedere all'osservazione al microscopio, che mostrerà l'antigene marcato colorato di marrone, e i nuclei cellulari colorati di viola.

## RIVENDICAZIONI

1. Ibridoma capace di produrre una quantità percettibile di un anticorpo monoclonale specifico contro la porzione extracellulare S5-poro della proteina HERG1, comprendente il prodotto della fusione tra una cellula immortalizzata ed un linfocita ottenuto per immunizzazione di un animale ospite con un peptide di sequenza EQPHMDSRIGWLHN.
2. Ibridoma secondo la rivendicazione 1, in cui detta cellula immortalizzata è appartiene alla linea cellulare NS0 neoplastica murina.
3. Ibridoma secondo la rivendicazione 1, in cui detto animale ospite è un topo.
4. Anticorpo monoclonale specifico contro la porzione extra-cellulare S5-poro della proteina HERG1 prodotto dall'ibridoma come definito nelle rivendicazioni 1-3.
5. Metodo per la determinazione dei livelli di proteina HERG1 in un campione istologico,
6. Kit per la determinazione dei livelli di proteina HERG1 in un campione istologico, comprendente l'anticorpo monoclonale specifico contro la porzione extra-cellulare S5-poro della proteina HERG1 come definito nella rivendicazione 4.
7. Kit secondo la rivendicazione 6, comprendente inoltre il peptide con il quale è stato prodotto l'anticorpo, un adatto standard di controllo, ed uno o più tamponi a scopo di diluizione e mantenimento del valore di pH appropriato per non alterare la struttura e la capacità di legame anticorpale.

Firenze, 21 Novembre 2005

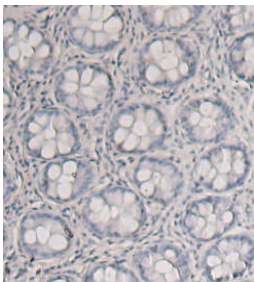
p. UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FIRENZE

il Mandatario

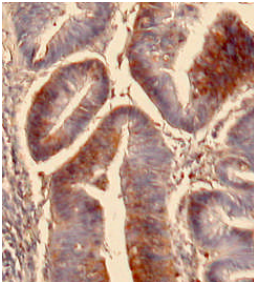
Dr.ssa Silvia Brazzini

della NOTARBARTOLO & GERVASI

Figura 1



Mucosa colica



Adenocarcinoma

Figura 2

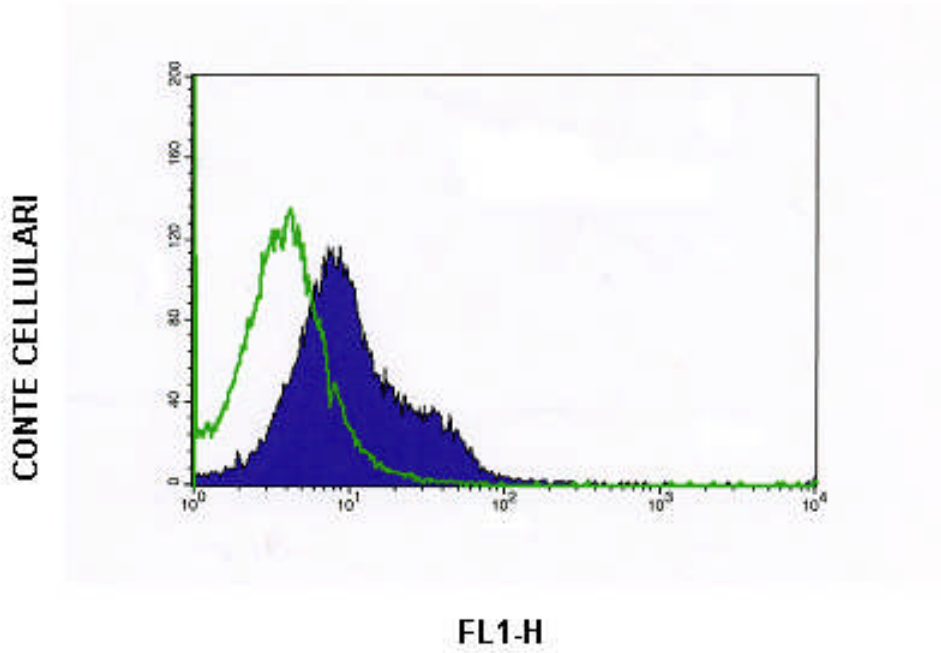
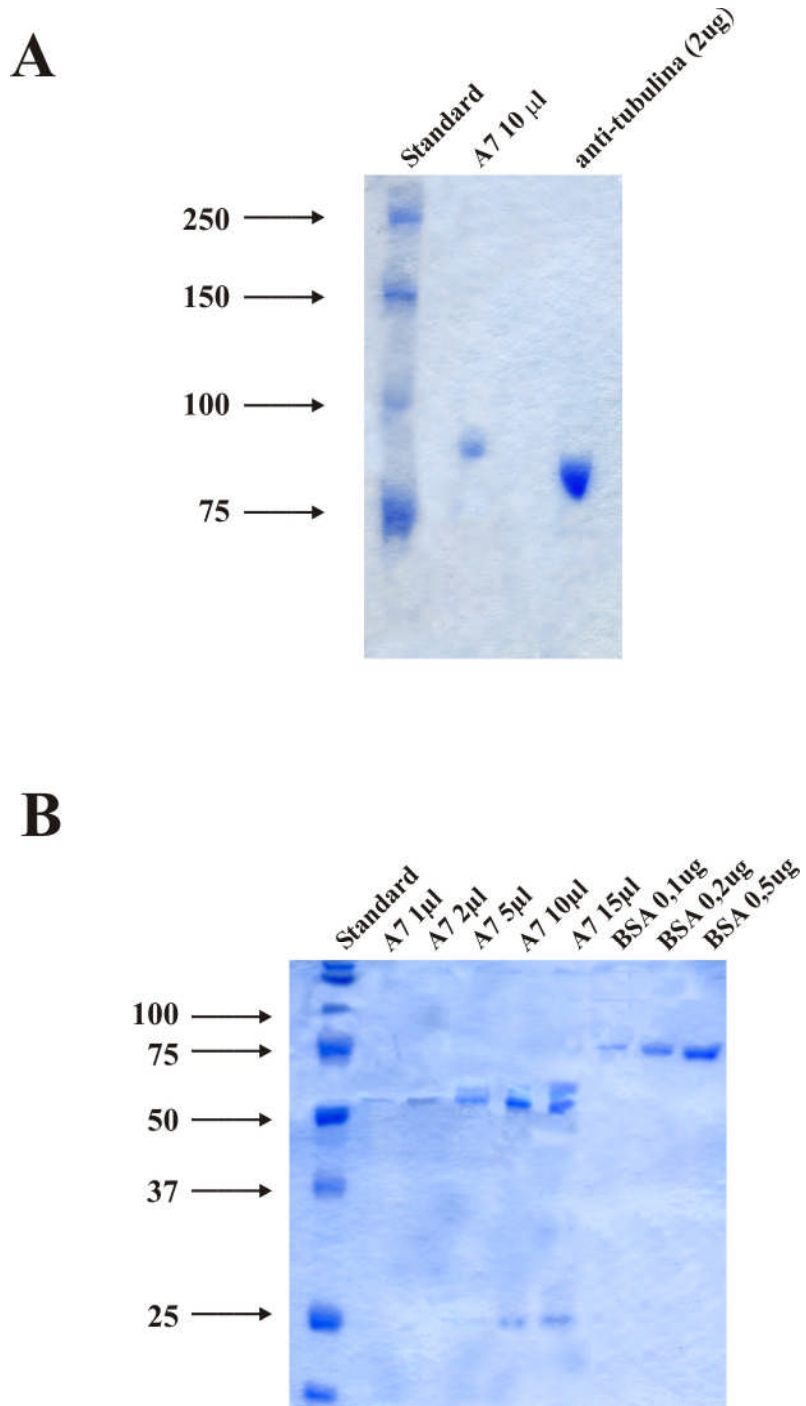


Figura 3





6009

*Ministero dello Sviluppo Economico*  
*Direzione Generale per la Proprieta' Industriale*  
*Ufficio Italiano Brevetti e Marchi*

**ATTESTATO DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE**

**N. 0001367861**

Il presente brevetto viene concesso per l'invenzione della domanda sotto specificata:

num. domanda	anno	C.C.I.A.A.	data pres. domanda	classifica
000008	2006	FIRENZE	10/01/2006	A61K39

**TITOLARE/I** UNIVERSITA'DEGLI STUDI DI FIRENZE  
FIRENZE

**MANDATARIO** BRAZZINI SILVIA

**INDIRIZZO** NOTARBARTOLO & GERVASI S.P.A.  
VIA MONTEBELLO N. 41  
50123 FIRENZE

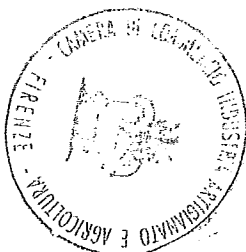
**TITOLO** IBRIDOMA CAPACE DI PRODURRE UN ANTICORPO MONOCLONALE ANTI-HERG1, ANTICORPO MONOCLONALE COSI' PRODOTTO, METODO PER LA DETERMINAZIONE DEI LIVELLI DI PROTEINA HERG1 E KIT PER TALE DETERMINAZIONE

**INVENTORE/I** ARCANGELI ANNAROSA  
CROCIANI OLIVIA

Copia Conforme all'originale digitalmente firmato dal  
 Responsabile del Servizio per l'Attivita' I.P.S.M.  
 data **01 APR. 2010**

L'Ufficio rogante  
**IL FUNZIONARIO DELEGATO**  
 Giuseppe Candia

Roma, 16/11/2009



**IL DIRIGENTE**  
 Ing. RICCARDO COPPO