

(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2009 00246

(22) Data de depozit: 19.03.2009

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: 30.10.2013 BOPI nr. 10/2013

(41) Data publicării cererii:
28.08.2009 BOPI nr. 8/2009

(73) Titular:
• ACADEMIA ROMÂNĂ - INSTITUTUL DE
BIOCHIMIE, SPLAIUL INDEPENDENȚEI
NR.296, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• NEGROIU GABRIELA, CALEA CRÂNGAȘI
NR.52, BL.5 ICEM, SC.C, ET.6, AP.99,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• FILIMON ANCA, INTRAREA DRIDU NR.3,
BL.113, SC.A, ET.3, AP.15, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;
• GHENEA SIMONA, STR.DUNEI NR.17,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• ZURAC SABINA, STR.RĂUL DORNA
NR.6, BL.Z 46, SC.A, ET.1, AP.1,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• STĂNICEANU FLORICA,
STR.BREZOIANU NR.46, ET.1, AP.9,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;

• SIMA ELENA-LIVIA, CALEA CRÂNGAȘI
NR.34, BL.15, SC.1, ET.5, AP.21,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• PETRESCU ȘTEFANA MARIA,
STR.POSTĂVARUL NR.5, BL.C 5, SC.7,
ET.4, AP.85, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:
VIRADOR V. ȘI COLAB., "PRODUCTION
OF MELANOCYTE-SPECIFIC ANTIBODIES
TO HUMAN MELANOSOMAL PROTEINS:
EXPRESSION PATTERNS IN NORMAL
HUMAN SKIN AND IN CUTANEOUS
PIGMENTED LESIONS", PIGMENT CELL
RESEARCH, VOL. 14, NR. 4, PP.289-297,
AUGUST 2001; ROMERO C. ȘI COLAB.,
"RETINOIC ACID AS MODULATOR OF
UVB-INDUCED MELANOCYTE
DIFFERENTIATION", JOURNAL OF CELL
SCIENCE 107, PP.1095-1103, 1994

(54) ANTICORPI POLICLONALI ANTI-DOPACROM TAUTOMERAZA UMANĂ

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la anticorpi policlonali obținuți față de unul sau mai mulți epitopi prezenți în proteina dopacrom tautomeraza (DCT) umană, și la utilizări ale acestor anticorpi policlonali în detectarea proteinei DCT în probele biologice, cu aplicație în biologia celulară și moleculară a sistemului pigmentar și nervos normal și patologic, medicina de laborator, oncologie. Anticorpii anti-DCT, obținuți prin imunizarea unui mamifer cu proteina recombinantă de fuziune DCT²⁷⁻⁴³⁹-His, au capacitatea de a se lega specific la unul sau mai mulți epitopi din DCT umană, de a reacționa specific cu glicoforme ale proteinei DCT sau fragmente glicozilate, parțial glicozilate sau neglicozilate, derivate de la DCT, de a reacționa specific cu proteina DCT în lizate celulare, prin tehnicile Western blot, de imunoprecipitare și de imunofluorescență, de a reacționa specific cu proteina DCT în preparate histologice, prin tehnica de imunohistofluorescență, de a reacționa specific cu proteina DCT în preparate anatomopatologice, prin tehnica de imunohistochimie.

Produsul conform prezentei invenții poate fi utilizat pentru diagnosticarea oricărei maladii tumorale și boli autoimune în care este implicată DCT, pentru evaluarea DCT ca marker tumoral, pentru explorarea proceselor din sistemul nervos și a mecanismelor de rezistență la stresul fiziologic sau terapeutic al celulelor tumorale în care este implicată DCT.

Revendicări: 8

Figuri: 8

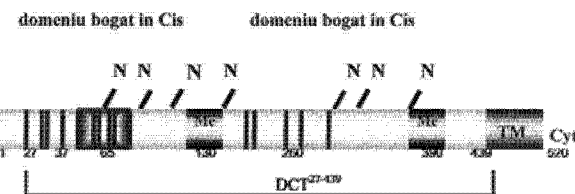


Fig. 1

Examinator: biolog ȚENEA GABRIELA



Orice persoană are dreptul să formuleze în scris și motivat, la OSIM, o cerere de revocare a brevetului de invenție, în termen de 6 luni de la publicarea mențiunii hotărârii de acordare a acesteia

RO 123570 B1

1 Invenția se referă la anticorpi policlonali obținuți față de unul sau mai multi epitopi (deter-
minanți antigenici) prezenți în proteina dopacrom tautomerază (DCT), și utilizarea acestor
3 anticorpi policlonali în detectarea proteinei DCT în probe biologice (celule, lizate celulare, prepa-
rate histologice), în scop de diagnostic, terapie, studii de cercetare la nivel molecular ale proce-
5 selor din anumite tipuri de celule ale sistemului pigmentar și nervos, normale și transformate.

7 Domeniile la care se referă această invenție sunt: biologia celulară și moleculară a siste-
mului pigmentar și nervos normal și patologic, medicină de laborator (diagnosticul anatomopa-
tologic al unor tumori de melanom și/sau gliom), oncologie (terapia anti- melanom și/sau anti-
9 gliom).

11 Sunt cunoscuți anticorpi policlonali față de DCT ce recunosc doar anumite secvențe fie
din domeniul N-, fie din C-terminal ale polipeptidei DCT, aceștia fiind comercial accesibili sau
obținuți în laboratoare de cercetare, așa cum indică studiul publicat de **Virador și colab. (2001),**
13 **în *Pigment Cell Res* 14, 289-297, și Romero și colab. (1994), în *J Cell Sci*, 107, 1095-1103.**
Toți acești anticorpi recunosc secvențe relativ scurte (maximum 150aa) din structura DCT, ceea
15 ce poate limita detecția proteinei. În cazul specimenelor histologice în care expresia antigenelor
melanozomale este scăzută, sunt preferați anticorpii policlonali ce recunosc epitopi multipli în
17 proteină. În plus, fiecare dintre acești anticorpi poate fi utilizat doar în cadrul unui număr de 1
(una) până la maximum 3 (trei) tehnici sau proceduri de laborator.

19 Dopacromtautomeraza (DCT) este proteina a cărei expresie este codificată de gena
localizată pe cromozomul 14 la șoarece (**Jackson și colab., *EMBO J* 11, 527-535 (1992)**) și
21 pe cromozomul 13q32 la om (**S Sturm și colab. *Genomics* 21, 293-296, (1994)**). Este bine docu-
mentată expresia DCT în melanocite, celulele producătoare ale pigmentului de melanină
23 prezente în epidermă, foliculii piloși, retină, choroidă și urechea internă. În dezvoltarea embrio-
nară, DCT este unul dintre markerii de expresie timpurii, detectați în melanoblaste și melanocite.
25 Un studiu recent, efectuat de **Jiao și colab. în *Developmental Biol.* 296, 396, (2006)**, a arătat
că expresia DCT se corelează cu neurogeneza în dezvoltarea embrionară, și că DCT
27 controlează proliferarea și migrarea celulelor neurale progenitoare.

Funcțiile biologice ale DCT în celulele sistemului pigmentar normal și patologic

29 DCT-DCT, cunoscută și sub denumirea de TRP-2, este un membru al familiei tirozina-
zelor (Tyrosinase Related Proteins), compus din tirozinază TRP-1 și TRP-2, proteine ce contro-
lează căile de sinteză ale melaninelor în melanocite. În calea melanogenetică DCT catalizează
31 reacția de tautomerizare a Dopacrom (un intermediar rezultat din DOPAquinonă, produs în
urma activității tirozinazei asupra tirozinei), la acidul dihidroxindolcarboxilic (DHICA). DHICA
33 este precursorul melaninelor de culoare brună, cu solubilitate crescută și greutate moleculară
mică. Studii adiționale semnalează implicarea DCT în controlul unor procese celulare cum ar
35 fi medierea contactelor intercelulare, creșterea, morfologia și îmbătrânirea celulară.

37 În condiții patologice, melanocitele pot reprezenta ținta destrucției autoimune, cum este
cazul în vitiligo, sau pot evolua către o proliferare necontrolată, transformându-se în celule de
39 melanom. Atât în vitiligo, cât și în melanom a fost detectat un răspuns imun umoral (**Kemp și**
colab., *Clin Exp Immunol* 109, 495-500, (1997)) și celular față de DCT (**Khong și colab. *J***
41 ***Immunol.* 168, 951-956, 2002; Tang, *Cancer Immunol Immunother* 56, 319-329, 2007)). DCT
este exprimată și în celulele de gliom. La pacienții cu gliom, un tip de cancer care derivă din
43 transformarea celulelor gliale și ce are foarte multe caracteristici comune cu melanomul, au fost
identificate celule T citotoxice specifice față de DCT. Astfel, rezultatele publicate de **Liu și**
45 **colab. în *Oncogene* 24, 5226-5234 (2005)**, demonstrează că DCT reprezintă un candidat
atractiv în elaborarea de noi terapii imunologice anti-melanom sau anti-gliom.**

RO 123570 B1

Cea mai recent semnalată funcție a DCT în patofiziologie, susținută prin rezultatele publicate de Nishioka și colab. (1999), *Melanoma Res* 9, 433-443; Pak și colab. (2000), *Melanoma Res* 10, 499-505; Chu și colab (2000), *Oncogene* 19, 395-402; Pak și colab. (2004), *Oncogene* 23, 30-38; Michard și colab. (2008), *Free Radic Biol* 44, 1023-1031, este aceea de mediator al unei căi prin care celulele tumorale sunt rezistente la stresul fiziologic sau la cel indus în urma tratamentului cu agenți chemo- și radio-terapeutici. S-a arătat că acest mecanism este legat de activitatea enzimatică a DCT, și depinde în totalitate de integritatea centrului său catalitic activ. Transformarea de către DCT a derivaților quinonici, rezultați în calea de sinteză a melaninelor, în produși cu toxicitate scăzută explică rolul protectiv al DCT asupra melanocitelor sau celulelor de melanom. Având în vedere ca DCT se exprimă atât în melanocite, cât și în celulele neuronale, cât și faptul că intermediarii quinonici toxici rezultați din sinteza catecolaminelor în neuroni sunt, prin analogie structurală, posibile substraturi pentru DCT, acțiunea protectivă a DCT ar putea funcționa și pentru celulele sistemului nervos.

DCT în evaluarea leziunilor melanocitice.

Melanomul malign este unul dintre cele mai agresive forme de cancer, care debutează printr-o proliferare necontrolată a melanocitelor din stratul bazal al epidermei, și culminează cu popularea organelor distale (ficat, plămân, creier) cu celule de melanom. Diversitatea morfologică a melanomului malign necesită adesea diagnosticarea pe baze imunohistochimice. Printre mecanismele dezvoltate de celulele de melanom în timpul progresiei tumorale este și aceea de a induce scăderea expresiei proteinelor melanozomale, care sunt și antigene tumorale (Le Poole și colab., *Am J Pathol*, 160, 521-528 (2002)). Acest eveniment reprezintă un impediment atât în recunoașterea și eliminarea tumorii de către sistemul imun, cât și în diagnosticarea corectă a maladiei. Nu sunt cunoscute mecanismele prin care, în diverse tipuri de melanom și stadii ale acestuia, expresia unor proteine melanocitice scade, iar a altora nu. În plus, mai există și diferențe de expresie ale acestor proteine la nivel individual al subiecților cu melanom, care complică și mai mult diagnosticarea maladiei. Astfel, în pofida unui număr extrem de mare de proteine exprimate specific în melanom sau în stadii de progresie ale acestuia, nu există un consens în ceea ce privește diagnosticarea melanomului utilizând o anumită configurație de markeri moleculari. În ultimul timp se practică pe scară tot mai largă utilizarea așa-numitelor "melanoma cocktails", ce reprezintă un amestec de anticorpi care permite detectarea simultană într-un preparat histologic a cât mai multe antigene specifice. Un astfel de exemplu este amestecul format din 2 clone anticorpi (DT101 și BC199) care detectează proteina MART, o clonă care detectează tirozinaza (T311) și o clonă care detectează proteina HMB45.

Studiile publicate de Orlov și colab. (1995) în *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 92, 10152-56, arată că, spre deosebire de alte proteine melanozomale, nivelul de expresie al DCT este menținut în decursul progresiei tumorale, mai ales în melanoamele amelanotice (lipsite de pigment), sugerând că DCT ar putea fi un antigen specific și sensibil pentru diagnosticul acestui tip de melanom. Cu toate acestea, nu există, până în prezent, studii consistente care să stabilească importanța acestei proteine în evaluarea leziunilor melanocitice.

În concluzie, Dopacromtautomeraza este o proteină cu funcții biologice multiple în fiziologia normală a melanocitelor și a celulelor gliale, cât și în patofiziologia celulelor transformate ce derivă din acestea, celulele de melanom și gliom. În plus, informațiile recente despre implicarea DCT în dezvoltarea și fiziologia celulelor neuronale extind ariile de interes ale acestei proteine.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în detectarea proteinei DCT într-un număr de 5 teste de laborator, diagnosticarea sau terapia unor maladii în care este implicată DCT, studiul proceselor biologice în care este implicată DCT înlocuind antiseruri similare comercializate din import.

RO 123570 B1

1 Anticorpul anti-DCT prezentat în această invenție are capacitatea de a se lega specific
la unul sau mai mulți epitopi din secvența de aminoacizi aa27-aa439 a SECV. NR1, din DCT
3 umană. Anticorpul se obține prin imunizarea unui mamifer cu proteina recombinantă de fuziune
DCT²⁷⁻⁴³⁹-His.

5 Avantajul prezentei invenții constă în faptul că detectarea DCT la nivel de proteină este
bazată pe recunoașterea sa specifică de către anticorpi.

7 În continuare, sunt descrise câteva exemple de realizare a invenției în legătură cu
următoarele figuri:

9 - fig. 1 - reprezentarea schematică a polipeptidei DCT. De la capătul C-terminal, coada
citoplasmatică (Cyt), domeniul transmembranar (TM) și domeniul luminal cu două situsuri de
11 legare a metalului (Me), 15 resturi de cisteină și 7 situsuri potențiale de N-glicozilare. Secvența
de aminoacizi 27-439, din domeniul luminal al DCT, a fost clonată în vectorul pHAT-2 și folosită
13 la obținerea antiserului anti-DCT;

15 - fig. 2 - analiza proteinei recombinante DCT²⁸⁻⁴²³⁹. Proteina recombinantă DCT²⁸⁻⁴²³⁹,
exprimată în bacterii și purificată pe Ni-NTA-agaroză, a fost analizată în SDS-PAGE prin colo-
rația cu Coomassie (a, b) și prin Western blot (c) cu anticorpi anti-TRP-2 (D18);

17 - fig. 3 - analiza anticorpilor anti-DCT. Titrul și specificitatea anticorpilor anti-DCT obținuți
în timpul a 4 imunizări (a-e) cu DCT²⁸⁻⁴²³⁹ au fost testați prin Western blot, folosind lizate celulare
19 de melanom (MJS și SKMel28), comparativ cu antiserul anti-TRP-2 (D18) (f, g). Celulele HEK
au fost utilizate ca și control negativ;

21 - fig. 4 - detectarea DCT în lizate celulare de melanom cu anticorpi anti-DCT în Western
blot. Lizate celulare diferite au fost separate în SDS-PAGE (condiții reducătoare) și gelul a fost
23 transferat pe membrană de nitroceluloză; după blocare, membrana a fost incubată cu anticorpi
anti-DCT, cu IgG de capră anti-iepura-HRPO și, în final, cu reactiv ECL;

25 - fig. 5 - detectarea DCT în celule de melanom cu anticorpi anti-DCT prin imunoprecipi-
tare. Celulele MJS și HEK (control negativ) au fost marcate cu [³⁵S]metionină/[³⁵S]cisteină timp
27 de 30 min, și urmărite pentru timpii indicați în figură. DCT a fost imunoprecipitată din lizatul
celular cu anticorpi anti-DCT, și imunocomplexele au fost capturate pe Protein A Sepharose.
29 DCT a fost eluată în condiții reducătoare, separată în SDS-PAGE și vizualizată prin autoradio-
grafie;

31 - fig. 6 - detectarea DCT în celule de melanom cu anticorpi anti-DCT în imunofluores-
cență. Celulele au fost crescute 24 h pe suporturi de sticlă standard. Celulele au fost fixate,
33 permeabilizate și incubate alternativ cu: anticorpi anti-hDCT (a, b, e, f, g), cu anti-TRP-2 (D18)
(Santa Cruz) (c), cu anti-Pep8 (d) urmate de incubarea cu IgG capră anti-iepura Alexa Fluor 488
35 (a, b, e, f, g), IgG măgar anti-capră Alexa Fluor 594 (c), sau IgG capră anti-iepura Alexa Fluor
488 (d) (1: 400) și montate în reactiv ProLong Gold antifade cu DAPI;

37 - fig. 7 - expresia DCT, analizată cu anticorpi anti-DCT în specimene reprezentând dife-
rite stadii de melanom prin imunohistofluorescență (IHF). Au fost testate cazuri de nev displazic
39 (a, b), melanom malign extensiv în suprafața (c, d), melanom malign nodular acromic (e, f) și
melanom acral lentiginos (g, h). Probele au fost incubate simultan cu anticorpi anti-DCT și T311
41 (pentru tirozinază). DCT și tirozinaza au fost detectate cu IgG capră anti-iepura Alexa Fluor 594
(roșu), și cu IgG capră anti-șoarece Alexa Fluor 488 (verde), iar nucleolele, cu reactiv ProLong
43 Gold antifade cu DAPI (albastru) (a-h);

45 - fig. 8 - expresia DCT, analizată cu anticorpi anti-DCT în specimene reprezentând
diferite stadii de melanom prin imunohistochemie (IHC). Probele (a-e) au fost incubate secvențial
cu anticorpi anti-DCT, IgG anti-iepura biotinitat, streptavidină cu peroxidază și, în final, cu DAB.

RO 123570 B1

Abrevieri: SFV - Ser fetal de vițel; SDS-PAGE-sodium dodecylpolyacrylamide (electroforeză în gel de poli-acrilamidă în dodecilsulfat de sodiu); ASB - albumină serică bovină; TC - temperatura camerei; PBS - tampon fosfat salin, Phosphate Buffer Saline, TBS - tampon fosfat salin, Tris Buffer Saline, DAB-diaminobenzidină. 1
3

Linii celulare și specimene histologice: 5

B16F1, B16F10 linii de melanom murin (ATCC nr acces cri-6323 și, respectiv, CRL-6475); MelJuso (MJS) linie de melanom uman primar (ATCC nr. acces ACC72); SKMel28 - linie de melanom uman metastatic (ATCC nr. acces HTB-72). Melanocite normale embrionare umane (NHEM) (ATCC). Liniile celulare HEK (Human Embryonic Kidney - celule embrionare de rinichi) și HeLa (celule tumorale de cancer de endometru) au fost donate de Dr. E. Condac - din colecția Facultății de Biologie, Universitatea București. Preparatele analizate prin imunohisto- chimie și imunohistofluorescență au reprezentat specimene de melanom malign uman provenite de la Departamentul de Patologie al Spitalului Universitar Colentina, București. Fragmentele tumorale incluse în parafină au fost procesate conform procedeele standard din practica de rutină a acestui departament. Celulele BL21 trx RIL și XL1 blue competente (Stratagene). 7
9
11
13
15

Culturi celulare: celulele au fost cultivate în mediu RPMI 1640 (EuroClone), cu 10% SFV (Biochrome), 50 unități/ml penicilină, 50 mg/ml streptomicină suplimentat cu aminoacizi neesențiali și piruvat de sodiu (Gibco). 17

Anticorpi și reactivi: Anti-TRP-2 (D18), T311 (anti-tirozinază umană) (Santa Cruz Biotechnologies); IgG capră anti-iepure-Alexa Fluor 594, IgG capră anti-șoarece-Alexa Fluor 594, IgG măgar anti-capră-Alexa Fluor 488, ProLong Gold reactiv cu DAPI (Invitrogen Molecular Probes). IgG capră anti-iepure-HRPO și IgG măgar anti-capră-HRPO, HEPES, CHAPS, L-metionina, medium RPMI 1640 fără metionină și cisteină, paraformaldehidă, ASB, Tween-20, saponină, IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside), imidazol (Sigma Aldrich); lapte degresat pudră (Sainsbury's), kit ECL (Amersham); suporturi sticlă pentru imunofluorescență (VWRInternational), cocktail de inhibitori de proteaze (Complete™) (Roche), [³⁵S] metionină/[³⁵S]cisteină (MP Biomedicals Inc.CA, US); Ni-NTA-agarose (Qiagen), Cytifix/Cytoperm (BD Biosciences). Streptavidină cu peroxidază, diaminobenzidină (DAB) de la Lab Vision. 19
21
23
25
27
29

Conținutul de proteină totală a fost determinat prin metoda Bradford (Thermo Scientific).

Plasmide, enzime de restricție, pCMV-DCT (donație de la Dr. S. Shibaraha, Dermal Res Dept, POLA R&D dept. Yokohama), pHAT-2 (EMBL-Heidelberg); Ncol și Sall (New England Biolabs). 31
33

Western Blot

Celulele testate au fost lizate în tampon 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,5% Triton X-100, centrifugate, și supernatantul, conținând între 50...100 μg proteină totală sau aproximativ 20 μg proteină recombinantă, a fost separat în SDS-PAGE. După transferul gelului pe membrană de nitroceluloză, aceasta a fost incubată în 5...15% lapte în PBS peste noapte, incubată secvențial la TC cu anticorpi anti-DCT (1:500...1:1,000) sau IgG capră anti-TRP-2 (D18) (1: 250...1:500) între 0,5...2 h, spălată cu tampon de spălare PBS conținând 0,1...0,3% Tween, incubată cu anticorpi secundari IgG capră anti-iepure, marcați cu HRPO (1:10,000-1:50,000) (pentru anti-DCT), sau cu IgG măgar anti-capră (1:2000), marcați cu HRPO (pentru D18). După spălarea anticorpilor secundari, membrana a fost incubată în reactiv ECL, și benzile au fost vizualizate prin autoradiografie. 35
37
39
41
43

RO 123570 B1

1 Marcarea metabolică și imunoprecipitarea

Un număr de celule între 20×10^4 ... 70×10^4 au fost suspendate în mediu fără metionină și cisteină, timp de 1 h, la 37°C , și incubate cu aproximativ 200 μl Ci/ml [^{35}S]metionină/ [^{35}S]cisteină timp de 30 min, la 37°C . Se adaugă medium RPMI ce conține 5 mM metionină nemarcată, și se continuă incubarea pentru intervalele de timp indicate (perioada de "chase"). Celulele sunt recoltate, lizate în tampon 50 mM Hepes, pH 7,5, cu 2% Chaps, 200 mM NaCl și cocktail de inhibitori de proteaze. Lizatele conținând proteine marcate cu ^{35}S sunt imunoprecipitate cu anticorpi anti-DCT, și imunocomplexele sunt capturate prin incubare cu Protein A-Sepharose peste noapte, la 4°C . După spălare cu tampon 50 mM HEPES, pH 7,5, cu 0,5% CHAPS și 200 mM NaCl, DCT este eluată în condiții reducătoare, separată în SDS-PAGE și vizualizată prin autoradiografie.

13 Imunofluorescența

Un număr de celule între $0,5 \times 10^4$... 2×10^4 au fost cultivate pe suporturi de sticlă standard timp de 24 h, fixate în 4% paraformaldehidă și permeabilizate în tampon cu 0,05...0,2% saponină și 0,5...2% ASB. Celulele au fost incubate alternativ cu anticorpi anti-DCT (1:500...1:3,000), cu anti-TRP-2 (D18) (1:200...1:500) sau cu αPep8 (1:200-1:500), timp de 20 min, la TC, spălate cu tampon 0,05... 0,2% saponină și 0,5...0,2% BSA, și incubate cu anticorpi secundari IgG de capră anti- iepure-Alexa Fluor 488 (pentru anti-DCT), IgG de capră anti- iepure Alexa Fluor 594 (pentru αPep8) și IgG măgar anti-capră AlexaFluor 594 (pentru D18) (1:300...1:500). Preparatele au fost montate în reactiv ProLong Gold antifade cu DAPI, și vizualizate cu ajutorul unui microscop de fluorescență Nikon Eclipse E 600. Imaginile au fost prelucrate cu programul Adobe 7.0.

23 Imunohistofluorescența (IHF) și Imunohistochimia (IHC)

Probele analizate pentru IHF au fost deparafinate după procedee standard, și rehidratate în băi succesive de etanol până la apă distilată. Atât pentru evidențierea DCT, cât și a tirozinazei în IHF, probele au fost incubate în tampon Tris cu EDTA, 20 min, la 97°C . După incubarea în soluție de blocare (0,2...2% ASB și 0,05...0,2% gelatină), probele au fost incubate simultan în anticorpi anti-DCT (1:2,000...1:10,000) și T311 (1:1,000...1:1,3000), timp de 1 h la TC. După spălare, probele au fost incubate în anticorpi secundari IgG de capră anti- iepure Alexa Fluor 594 (pentru anti-DCT) și IgG capră anti-șoarece Alexa Fluor 488 (pentru T311) (1:300...1:500), timp de 20 min, la TC, spălate și, în final, montate în reactiv ProLong Gold antifade cu DAPI. Vizualizarea s-a făcut cu ajutorul unui microscop de fluorescență Nikon Eclipse E 600. Imaginile au fost prelucrate cu programul Adobe 7,0. Pentru IHC, probele au fost analizate pentru colorații uzuale (hematoxilina&eozina) și histochimice. După hidratare, au fost efectuate următoarele etape: 1) spălare cu TBS pH 7,4, de 3 ori a câte 5 min; 2) fierbere în Tris cu EDTA, 20 min, la 97°C ; 3) spălare cu TBS, de 3 ori a câte 5 min; 4) inhibarea peroxidazei endogene (Hydrogen peroxide Block, Labvision) timp de 15 min; 5) spălare cu TBS, de 3 ori a câte 5 min; 6) blocarea antigenicității nespecifice cu protein block (ultra V block Lab Vision), timp de 10 min, la TC; 7) spălare cu TBS, de 3 ori a câte 5 min; 8) incubare cu anticorpi anti-DCT (1:2,000...1:10,000), timp de 1 h, la TC, în camera umedă; 9) spălare cu TBS, de 3 ori a câte 5 min; 10) incubare cu anticorp secundar biotinitat anti- iepure (Ultravision detection system); 11) spălare cu TBS, de 3 ori a câte 5 min; 12) streptavidină-peroxidază (streptavidin peroxidaze Lab Vision) timp de 10 min; 13) spălare cu TBS, de 3 ori a câte 5 min; 14) dezvoltare cu DAB (DAB plus substraturi, LabVision); 15)spălare cu apă de robinet; 17) colorare cu Hemalaun Meyer, urmată de deshidratare și uscare la colorator automat.

Se dau în continuare 7 exemple de realizare a invenției.

Exemplul 1. Clonarea hDCT în vectorul pHAT-2

Pentru expresia fragmentului aa 27-aa 439 din domeniul luminal al DCT umane (fig. 1), cDNA-ul ce codifică această secvență, fragmentul a fost clonat în vectorul pHAT-2, pornind de la cDNA cu întreaga secvență a DCT umane clonată în vectorul pCMV (pCMV-DCT). Plasmida pentru expresia în bacterii a fost obținută prin clonarea fragmentului 27-439 obținut prin amplificare prin PCR din pCMV-hDCT, între situsurile *NcoI* și *SalI*, în sensul unei secvențe de 6 resturi de His, folosind următorii primeri: 5'-AATTCCATGGGAGTCTGCATGACGGTGGACAGC (sense) și 5'-AATTGTCGACTTACTACACTGGAGGGAAGAAAGGAACCATG (antisense). Produsul codificând secvența aa27-aa439, a fost obținut prin aplicarea tehnicilor standard de ADN recombinant, și confirmat prin secvențiere.

Exemplul 2. Expresia, purificarea și analiza proteinei umane recombinante DCT²⁷⁻⁴³⁹

Colonii de celule BL21 trx RIL transformate cu cDNA conținând DCT²⁷⁻⁴³⁹-pHAT au fost crescute peste noapte și diluate. Expresia proteinei de fuziune DCT²⁷⁻⁴³⁹-His s-a realizat prin inducție cu o concentrație de IPTG între 0,1...0,7 mM, timp de 1...6 h. Celulele bacteriene au fost colectate și lizate în tampon de liză (50 mM Na₂HPO₄, 0,3M NaCl cu 0,5M...1,0 M uree). Lizatul bacterian a fost centrifugat și reextras în tampon de liză de câteva ori. Frațiile de supernatante au fost reunite și utilizate pentru purificarea proteinei recombinante prin afinitate pe gel de Ni-NTA-agaroză și eluție cu 100 mM...550 mM imidazol. Proteina de fuziune DCT²⁷⁻⁴³⁹-His a fost analizată în SDS-PAGE, prin colorație cu Coomassie, și în Western blot, prin imunodectie cu antiser anti-TRP-2 (D18). După cum este arătat în fig. 2a, b, DCT²⁷⁻⁴³⁹ migrează ca o bandă de aproximativ 42 kDa, ceea ce corespunde greutateii moleculare așteptate a domeniului luminal al DCT. În plus, DCT²⁷⁻⁴³⁹ a fost imunodectată și de antiserul anti-TRP-2 (D18) (Santa Cruz) care este descris ca specific pentru un epitop din apropierea regiunii N-terminale (fig. 2c). Proteina DCT²⁷⁻⁴³⁹ astfel purificată a fost utilizată ca agent imunizant.

Exemplul 3. Obținerea și analiza anticorpilor anti-DCT

Aproximativ 1 mg de proteină DCT²⁷⁻⁴³⁹ recombinantă purificată a fost amestecată cu 1 ml adjuvant Freund complet, și injectată subcutanat în 6 locuri distincte, într-un iepure. Procedura s-a repetat de încă 3 ori, folosind adjuvant Freud incomplet, astfel: imunizarea a 2-a și a 3-a la 2 săptămâni de la cea anterioară, și a 4-a la 3 săptămâni de cea anterioară. Animalul a fost sângerat la 7 zile după a 2-a, a 3-a și a 4-a imunizare, și serul a fost testat pentru specificitate în western blot. Serul imun obținut în decursul etapelor de imunizare a fost analizat pentru specificitatea și titrul anticorpilor anti-DCT prin Western blot folosind lizate de celule de melanom care exprimă DCT. Rezultatele prezentate în fig. 3 arată că antiserul colectat după a 4-a imunizare conține anticorpi care detectează specific DCT (fig. 3c, d) similar cu antiserul comercial D18 (fig. 3f, g) doar în celulele de melanom, nu și în celulele HEK (fig. 3e) utilizate drept control negativ. Serul obținut după a 4-a imunizare a fost utilizat în toate testele descrise în continuare, și va fi referit în text ca "anticorpi anti-DCT".

Exemplul 4. Detectarea specifică a DCT în lizate celulare de melanom cu anticorpi anti-DCT prin Western blot

Pentru a determina specificitatea anticorpilor anti-DCT, s-a analizat expresia DCT în diferite linii de melanom uman (primar - MJS și metastatic-SK28) și murin (B16F1 și B16F10), iar celulele HEK și HeLa, cunoscute că nu exprimă DCT, au fost utilizate drept control negativ. Rezultatele prezentate în fig. 4 arată că, în starea de homeostazie atât în celulele de melanom murin, cât și uman (primar sau metastatic) DCT, este detectată ca un dublet format dintr-o bandă de 69 kDa și alta de 80 kDa. Fiind cunoscut că polipeptida neglicozilată migrează la 55 kDa, cele două benzi detectate de antiserul anti-DCT reprezintă glicoforme ale DCT. Aceste

1 date sunt în concordanță cu cele raportate în alte studii despre DCT în celule de melanom murin
2 cu antiserul α Pep8; în plus, acest rezultat indică faptul că anticorpul anti-DCT detectează
3 întregul lanț polipeptidic al DCT complet glicozilat, ca și antiserul α Pep8 ce recunoaște epitopul
4 de la capătul C-terminal al polipeptidei. Nu au fost detectate în celulele HEK sau HeLa benzi
5 similare cu cele din celulele MJS și SK28. Anticorpul anti-DCT mai recunoaște o bandă nespecifică
6 de aproximativ 50 kDa.

7 **Exemplul 5.** *Procesarea intracelulară a DCT în celule de melanom urmărită cu anticorpi
8 anti-DCT prin marcarea metabolică și imunoprecipitare*

9 Tehnica de marcarea metabolică, urmată de imunoprecipitare, este larg folosită pentru
10 studiul căilor de biosinteză a proteinelor. Procesarea DCT în celulele de melanom uman primar
11 MJS a fost monitorizată într-un experiment de marcarea metabolică și imunoprecipitare a lizatelor
12 celulare la 0 h și 3 h. Așa cum se observă în fig. 5, proteina nou sintetizată DCT migrează la
13 aproximativ 62 kDa după 30 min de la marcarea celulelor. În decursul celor 3 h, intensitatea
14 benzii de 62 kD scade și apare banda de la 80 kDa, ceea ce indică procesarea gradată a
15 structurilor N-glicozilate din precursorul parțial glicozilat de la 0 h, la structuri complexe.
16 Important de reținut este faptul că, deși obținut față de proteina neglicozilată, anticorpul anti-DCT
17 detectează formele glicozilate ale DCT în soluție. Această interacțiune este specifică deoarece
18 nu apare și în celulele HEK.

19 **Exemplul 6.** *Detectarea DCT în substructuri celulare de melanom cu anticorpi anti-DCT
20 prin imunofluorescență*

21 Informații despre localizarea intracelulară a unei proteine se pot obține prin detectarea
22 acesteia prin imunofluorescență, simultan cu markeri moleculari specifici pentru comparti-
23 mentele celulare. Rezultatele obținute în celulele MJS și SK28, HeLa și HEK cu anticorpii anti-
24 DCT au fost analizate comparativ cu cele obținute cu antiserul anti-TRP-2 (D18) (Santa Cruz)
25 și cu α Pep8. Așa cum se observă în fig. 6, atât în celulele MJS, cât și SK28, imunofluorescența
26 pentru DCT cu toate antiserurile testate este localizată în citoplasmă în structuri veziculare (în
27 SK28) sau tubulare (în MJS). În plus, anticorpul anti-DCT detectează intens DCT la membrana
28 plasmatică în ambele tipuri de celule. Acest rezultat este așteptat deoarece anticorpul anti-DCT,
29 fiind obținut față de aproximativ întreg domeniul luminal, ar reacționa cu ușurință cu acesta în
30 eventualitatea în care proteina este traficată la membrana plasmatică și expune porțiunea N-
31 terminală. Un semnal difuz nespecific este detectat în celulele HEK și HeLa, precum și în linia
32 de melanom A375, în care atât tirozinaza, cât și TRP-1 nu sunt detectabile.

33 **Exemplul 7.** *Detectarea DCT cu anticorpi anti-DCT în preparate histopatologice de
34 melanom prin imunohistofluorescență (IHF) și imunohistochimie (IHC)*

35 Pentru a valida utilizarea anticorpilor anti-DCT ca reactiv de diagnostic al leziunilor
36 melanocitice, s-a utilizat acest antiser pentru analiza expresiei DCT în câteva specimene de la
37 pacienți cu melanom cutanat prin tehnicile de IHF și IHC. Rezultatele prezentate în fig. 7 și fig.
38 8 arată că marcarea DCT cu anticorpi anti-DCT prin tehnicile de IHF și, respectiv, IHC indică
39 o colorație specifică reproductibilă, cu interacțiuni nespecifice slabe. Imunoreactivitatea acestor
40 anticorpi pentru DCT în cazurile de melanom malign invaziv în derm sau hipoderm apare intens
41 difuză sau în grupuri de celule localizate în special în dermul profund (fig. 7). În anumite celule
42 ale leziunii tumorale DCT și tirozinaza (detectată cu T311) colocalizează în melanocitele
43 prezente în stratul bazal (c); în aceste celule se observă clar că DCT și tirozinaza colocalizează
44 doar în regiunea perinucleară, în vreme ce tirozinaza apare și în dendritele melanocitelor.
45 Interesant de notat faptul că, în cazul unui nev nevocelular displazic, se observă cluster de
46 celule DCT pozitive și negative pentru tirozinază (a, b). În pofida omologiei structurale, imuno-
47 reactivitatea observată pentru DCT și tirozinază nu se suprapune complet în majoritatea

RO 123570 B1

probelor analizate. Aceste rezultate demonstrează că anticorpii anti-DCT reacționează specific cu DCT. În plus, observația că DCT și tirozinaza sunt detectate în populații celulare distincte, în același specimen tumoral, sugerează că expresia și procesarea tirozinazei și a DCT sunt probabil controlate de mecanisme individuale specifice în progresia tumorală. 1
3

Analiza specimenelor histologice prin IHC (fig. 8) cu anticorpi anti-DCT a demonstrat o pozitivitate intensă atât în celulele de melanom cu răspândire superficială (MRS), cât și în cele de melanom malign nodular (MMN). Componenta intraepidermală a MRS a fost pozitivă, dar mai difuză decât cea dermală invazivă. Celulele tumorale DCT-pozitive atât în MMN, cât și cele din faza de creștere verticală a MRS sunt grupate în arii restrânse, distribuite neuniform în masa tumorală. În toate celulele DCT este detectată în citoplasmă, iar intensitatea colorației este între 2+ și 3+ pe o scară de la 0 la 3. Există și o reactivitate nespecifică slabă în epidermă, în porțiunea epitelială a anexelor cutanate (glandele sudoripare și sebacee) și în musculatura netedă și vasele de sânge. În plus, un aspect deosebit de interesant a fost acela că, în anumite cazuri ce nu au prezentat pozitivitate pentru markeri consacrați în diagnosticul melanomului, HMB45 și MelanA, DCT a fost detectată cu anticorpii anti-DCT, ceea ce susține includerea DCT pe lista markerilor de diagnostic histopatologic al melanomului și specificitatea anticorpilor anti-DCT. 5
7
9
11
13
15
17

Lista de secvențe:

SECV. NR.1: proteina DCT umană aa27-aa439 19
RVCMTVDSLNVNKECCPRLGAESANVCGSQGGRGQCTEVRADTRPWSGPYILRNQDDREL
WPRKF 21
FHRTCKCTGNFAGYNCGDCKFGWTGPNCERKKPPVIRQNIHSLSPQEREQFLGALDLAKK
RVHP 23
DYVITTQHWLGLLGPNGTQPQFANCSVYDFVWLHYYSVRDILLGPGRPYRAIDFSHQGP
AFVTW 25
HRYHLLCLERDLQRLIGNESFALPYWNFATGRNECDVCTDQLFGAARPDDPTLISRNSRFS
SWET 27
VCDSLDDYNHLVTLNNGTYEGLLRNQMGRNSMKLPTLKDIRDCLSLQKFDNPPFFQNSTF
SFRNALEGFDKADGTLDSQVMSLHNLVHSFLNGTNALPHSAANDPIFVVLHSFTDAIFDEW 29
MKRFNPPADAWPQELAPIGHNRMYNMVPFFPPVT

RO 123570 B1

Revendicări

1

3

1. Anticorpi policlonali anti-DCT, **caracterizați prin aceea că** au capacitatea de a se lega specific la unul sau mai multi epitopi din secvența de aminoacizi aa27-aa439 a SECV. NR1, din DCT umană.

5

7

2. Anticorpi în conformitate cu revendicarea 1, **caracterizați prin aceea că** se obțin prin imunizarea unui mamifer cu proteina recombinantă de fuziune DCT²⁷⁻⁴³⁹-His.

9

3. Anticorpi anti-DCT, **caracterizați prin aceea că** reacționează specific cu glicoforme ale proteinei DCT sau fragmente glicozilate, parțial glicozilate sau neglicozilate, derivate de la DCT.

11

4. Anticorpi anti-DCT, **caracterizați prin aceea că** reacționează specific cu proteina DCT în lizate celulare, prin tehnica Western blot.

13

5. Anticorpi anti-DCT, **caracterizați prin aceea că** reacționează specific cu proteina DCT în lizate celulare, prin tehnica de imunoprecipitare.

15

6. Anticorpi anti-DCT, **caracterizați prin aceea că** reacționează specific cu proteina DCT în celule, prin tehnica de imunofluorescență.

17

7. Anticorpi anti-DCT, **caracterizați prin aceea că** reacționează specific cu proteina DCT, în preparate histologice, în amestec cu alți anticorpi, prin tehnica de imunohistofluorescență.

19

8. Anticorpi anti- DCT, **caracterizați prin aceea că** reacționează cu proteina DCT în preparate anatomopatologice, prin tehnica de imunohistochimie.

21

(51) Int.Cl.

C12P 21/08 (2006.01),

A61K 39/395 (2006.01)

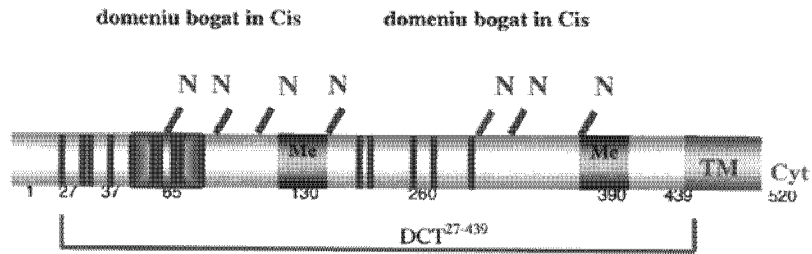


Fig. 1

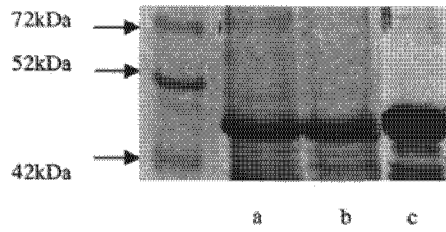


Fig. 2

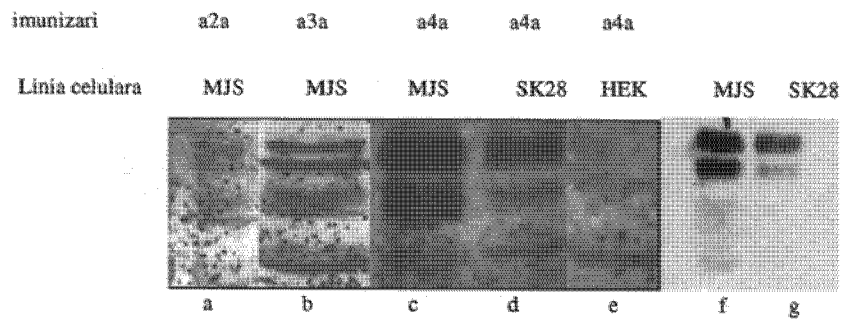


Fig. 3

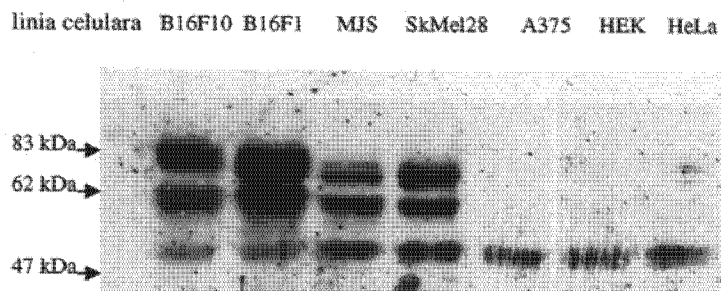


Fig. 4

(51) Int.Cl.

C12P 21/08 (2006.01),

A61K 39/395 (2006.01)

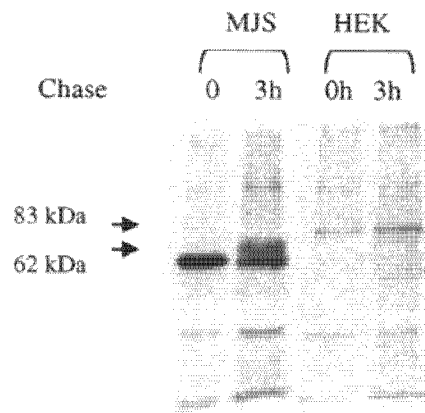


Fig. 5

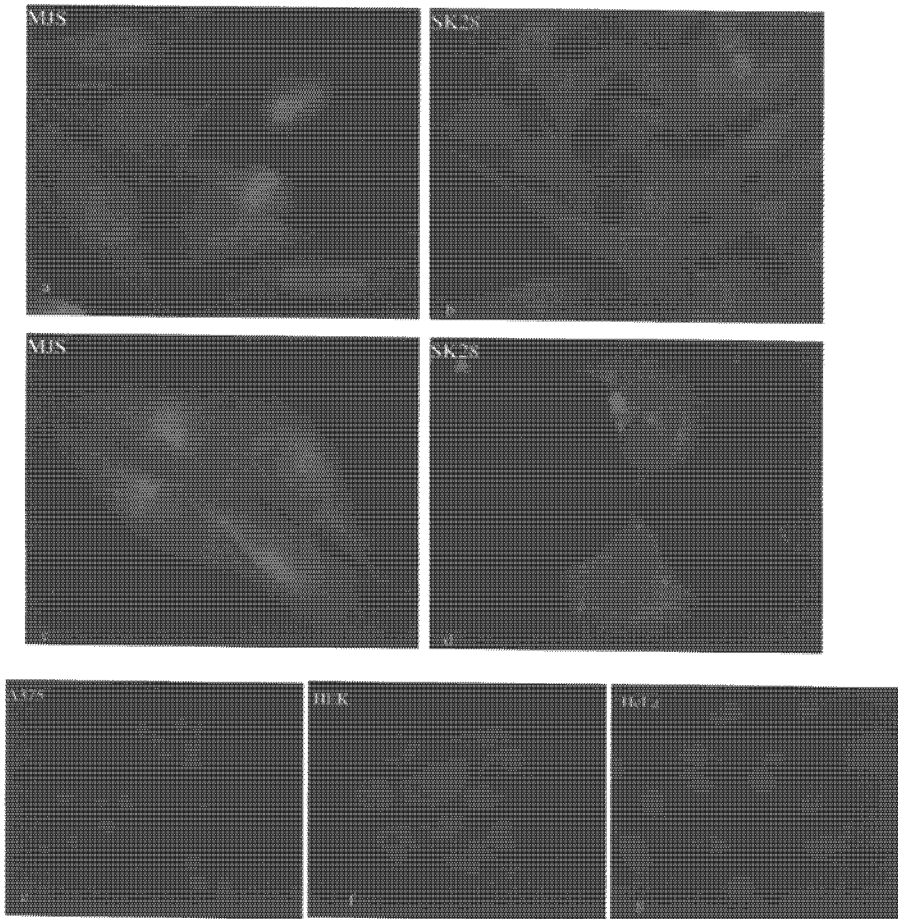


Fig. 6

(51) Int.Cl.

C12P 21/08 (2006.01),

A61K 39/395 (2006.01)

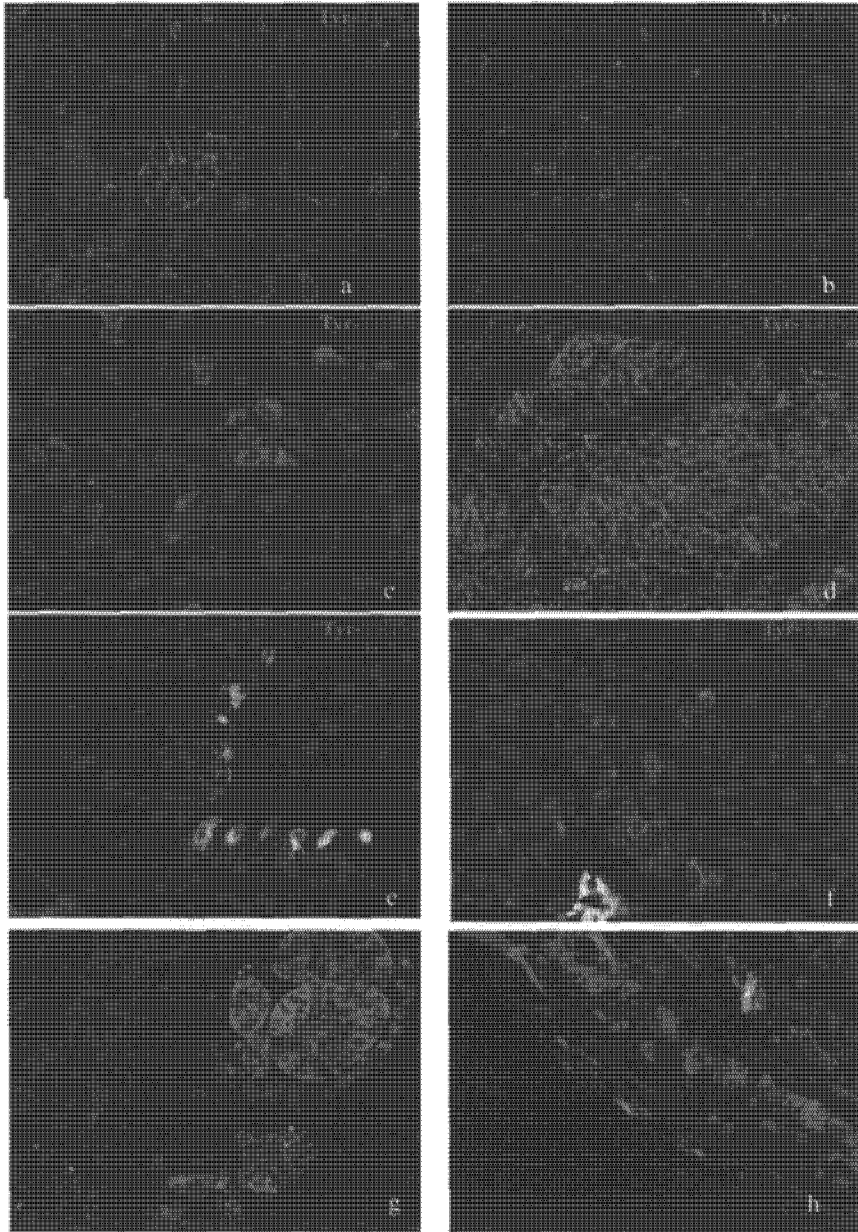


Fig. 7

(51) Int.Cl.

C12P 21/08 (2006.01),

A61K 39/395 (2006.01)

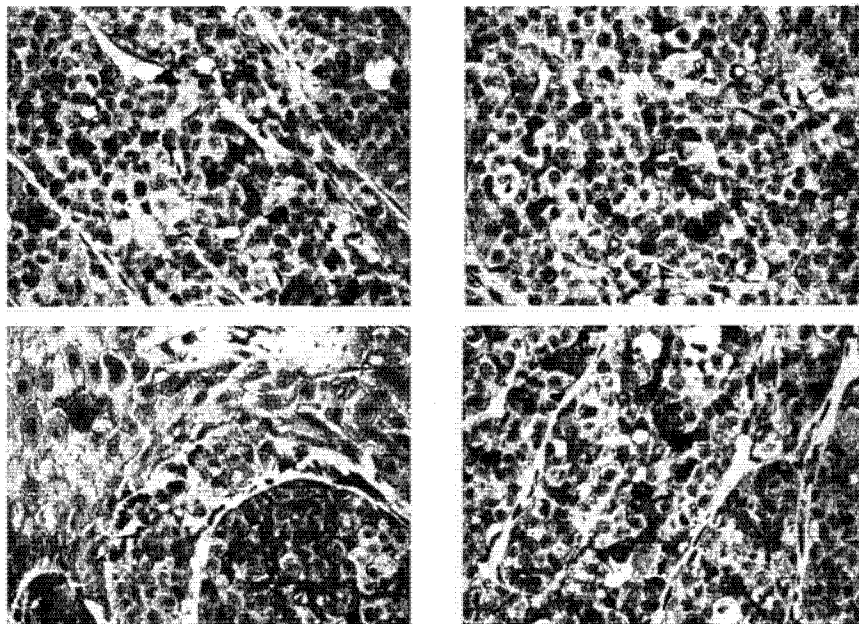
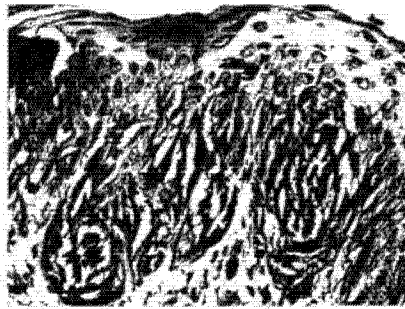


Fig. 8



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 951/2013