

Abbreviazioni

ScFv	Frammento anticorpale a catena singola
V_H	Porzione variabile della catena pesante
V_L	Porzione variabile della catena leggera
Fc	Regione costante delle Ig
HP-RNasi	Ribonucleasi pancreatica umana
cRI	Inibitore citosolico delle ribonucleasi
Erb-hcAb	Anticorpo compatto umano anti-ErbB2
BPER	<i>Bacterial protein extraction reagent</i>
BSA	Albumina di siero bovino
EDTA	Acido etilendiamminotetraacetico
BCA	Acido bicinconico
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
MEP	4-mercapto-etil-piridina
IMAC	<i>Immobilized metal affinity chromatography</i>
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalattopiranoside
PVDF	Difluoruro di polivinile
SDS	Dodecilsolfato di sodio
TRIS	Triidrossimetilamminometano
Amp	Ampicillina
CIP	fosfatasi alcalina da intestino bovino
PCR	<i>polimerase chain reaction</i> (reazione di polimerizzazione a catena)
DTT	ditiotreitolo
LB	Luria Bertani
TBS	<i>Tris Buffered saline</i>
Temed	N,N,N',N'-tetrametil,etilen-diammina
GSH	glutazione
GSSG	glutazione ossidato
pUp	uridina 2',5' e 3',5'- difosfato – agarosio
ELISA	<i>Enzyme Liked Immuno Sorbant Assay</i>

INDICE

1. INTRODUZIONE	
1.1. Cancro ed Immunoterapia	pag. 3
1.2. Recettori ErbB	pag. 4
1.3. Immunoagenti antitumorali umani	pag. 6
2. SCOPO DEL LAVORO	pag. 9
3. MATERIALI E METODI	pag. 10
4. RISULTATI	
4.1. Costruzione del cDNA codificante per la immunoRNasi dimerica	pag. 21
4.2. Espressione della proteina ricombinante Erbicina-HHP-RNasi	pag. 24
4.3. Purificazione della proteina ricombinante Erbicina-HHP-RNasi	pag. 25
4.3.1. <i>Cromatografia di affinità con resina ProBond</i>	pag. 27
4.3.2. <i>Cromatografia di affinità con resina uridina 2',5' e 3',5' difosfato – agarosio</i>	pag. 28
4.3.3. <i>Cromatografia ad interazione idrofobica su resina MEP</i>	pag. 29
4.3.4. <i>Cromatografia di affinità su resina TALON</i>	pag. 30
4.4. Dimerizzazione di Erbicina-HHP-RNasi	pag. 31
4.5. Caratterizzazione funzionale di Erbicina-HHP-RNasi	
4.5.1. <i>Capacità di legame al recettore ErbB2</i>	pag. 35
4.5.2. <i>Citotossicità su cellule tumorali ErbB2- positive</i>	pag. 35
4.6. Valutazione comparativa degli effetti di Erb-hcAb ed Herceptin su cellule cardiache <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	
4.6.1. Determinazione della capacità di Erb-hcAb e di Herceptin di riconoscere ErbB2 in cellule cardiache di ratto	pag. 37
4.6.2. Effetti <i>in vitro</i> di Erb-hcAb e di Herceptin su cellule cardiache	pag. 40
4.6.3. Effetti di Herceptin ed Erb-hcAb sull'apoptosi delle cellule cardiache	pag. 40
5. CONCLUSIONI	pag. 44
6. BIBLIOGRAFIA	pag. 47

1.1. Cancro ed Immunoterapia.

Il cancro è attualmente responsabile del 19% delle morti annue in tutto il mondo [1]. I trattamenti convenzionali adottati per la terapia sono la radioterapia e la chemioterapia, che tuttavia possono provocare effetti collaterali a breve e lungo termine, a causa della loro tossicità aspecifica. Inoltre molti tumori risultano essere resistenti o solo transitoriamente responsivi ai chemioterapici. Questo fenomeno, che si sviluppa in seguito all'esposizione prolungata delle cellule tumorali ai chemioterapici, è chiamato con il termine di *Multi Drug Resistance* (MDR).

Per superare tali limiti e produrre agenti specifici per le sole cellule tumorali, si è proceduto allo sviluppo di un nuovo tipo di trattamento per i tumori, l'immunoterapia.

L'immunoterapia è basata sull'impiego delle componenti del sistema immunitario per la difesa dell'organismo verso cellule tumorali. I progressi nel campo dell'ingegneria genetica e nello sviluppo di ibridomi hanno permesso di sviluppare anticorpi monoclonali (mAb), diretti contro Antigeni Associati a Tumori (TAA). Tali antigeni sono iper-espressi sulla superficie di cellule tumorali, e si ritrovano a bassissimi livelli solo in alcuni tipi cellulari normali.

Sono già stati sviluppati degli anticorpi monoclonali che si sono rilevati efficaci nel trattamento dei tumori, fra questi trastuzumab (Herceptin) specifico per il recettore ErbB2, utilizzato nella cura dei tumori della ghiandola mammaria che iper-esprimono il recettore ErbB2 [2].

1.2. Recettori ErbB

Il gene Her2 codifica per una glicoproteina di 185kDa che appartiene alla famiglia dei recettori di fattori di crescita epiteliali con attività tirosin-chinasica (**Figura 1**), ed è stato chiamato ErbB2 [3,4].

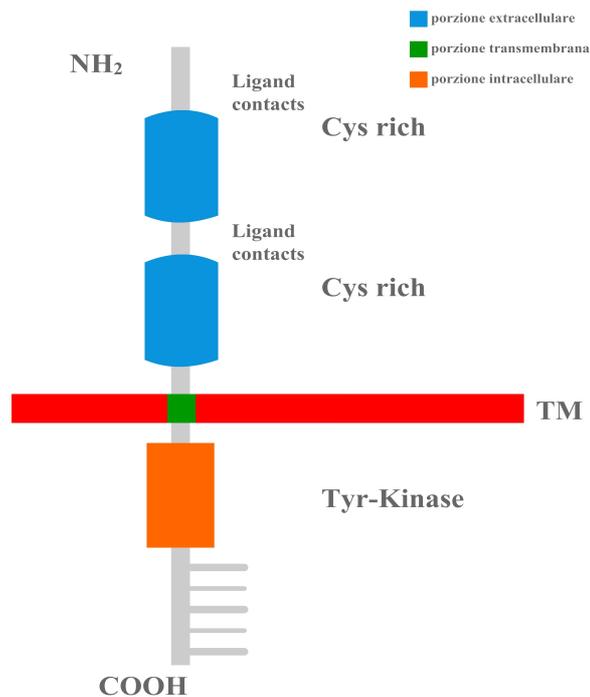


Figura 1: Rappresentazione della struttura del recettore ErbB2

Tutti i quattro recettori ErbB hanno una porzione extracellulare, N-terminale, ricca di cisteine dove si trova il sito di legame per il ligando, un segmento transmembrana idrofobico ed un dominio intracellulare, C-terminale, con attività tirosin-chinasica [3]. L'autofosforilazione del dominio carbossi-terminale indotta dal legame del ligando al dominio extracellulare, è responsabile della trasduzione del segnale mitogenico.

L'amplificazione del gene *ErbB2* provoca una iper-espressione del recettore, che è legato allo sviluppo di molti tipi di tumori nell'uomo, incluso quello della mammella, dell'ovaio e dell'apparato gastrointestinale [5].

Approssimativamente il 20-30% dei carcinomi mammari iper-esprime il recettore ErbB2 [6], e la sua iper-espressione è associata anche allo sviluppo di metastasi [5].

I recettori ErbB sono esposti sulla membrana cellulare come monomeri, ma in seguito all'interazione con il ligando dimerizzano con un recettore identico, o con un altro recettore, in modo da formare degli eterodimeri [7].

Il recettore ErbB2 è privo di un ligando naturale, ma tende spontaneamente a formare eterodimeri con altri recettori. Con tale meccanismo il recettore è capace di partecipare alla trasduzione del segnale in moltissimi processi, anche in assenza di un ligando per esso specifico.

Gli eterodimeri contenenti ErbB2 generano un segnale molto più potente rispetto agli omodimeri e agli eterodimeri di altri recettori della stessa famiglia [8, 9]. Questo fenomeno è dovuto essenzialmente a due fattori: la bassa velocità di dissociazione del ligando dal recettore [7]; la scarsa efficienza di internalizzazione del recettore [10, 11], che pertanto permane sulla superficie cellulare, e può così trasdurre prolungati segnali mitogenici al nucleo, con reazioni di fosforilazione a cascata [12].

Tuttavia ErbB2 svolge anche funzioni essenziali per la sopravvivenza cellulare. In particolare, nei cardiomiociti il recettore ErbB4, può formare eterodimeri con ErbB2 o omodimeri stabili in seguito al legame con il suo ligando, indispensabili per la trasduzione dei segnali anti-apoptotici [13]. Tale ligando è la neuregulina-1 (NRG), che non lega direttamente ErbB2, ma favorisce la sua eterodimerizzazione con ErbB4.

Il segnale innescato dalla neuregulina è essenziale per lo sviluppo cardiaco [14]. L'importanza dell'attivazione di ErbB2/ErbB4, indotta dalla neuregulina

è stata messa in evidenza anche dagli effetti cardiotossici, riscontrati in pazienti trattati con Herceptin [15]. Questo effetto cardiotossico di Herceptin non ha finora basi molecolari note, ma si suppone che esso sia dovuto all'interferenza dell'anticorpo nella trasduzione del segnale indotto da neuregulina-1, e mediato dagli eterodimeri ErbB2/ErbB4.

1.4. Immunoagenti antitumorali umani

Gli anticorpi monoclonali murini specifici per il dominio extracellulare di ErbB2, in caso di somministrazione nell'uomo potrebbero comportare l'insorgenza di una risposta immunitaria (HAMA, *human anti-mouse antibody response*). Allo scopo di ridurre l'immunogenicità, è stata sviluppata la tecnologia di umanizzazione degli anticorpi. Questa tecnica consiste nel sostituire la sequenza di un anticorpo murino con sequenze di origini umane, lasciando invariati i siti originali di legame all'antigene.

Tuttavia gli svantaggi legati all'impiego degli anticorpi umanizzati nella terapia farmacologica, sono: l'insorgenza di risposte immunitarie [16]; la bassa efficienza delle funzioni effettrici; le elevate dimensioni molecolari (155kDa), che riducono la loro capacità di penetrare le masse tumorali.

Per poter progettare efficienti immunoagenti antitumorali è necessario soddisfare una serie di requisiti. Un ideale immunoagente dovrebbe infatti: essere di origine completamente umana; avere elevata affinità per uno specifico antigene tumorale; avere dimensioni idonee alle applicazioni terapeutiche, maggiori di quelle dei frammenti scFv (27kDa), ma inferiori a quelle di intere IgG (155kDa).

Tenuto conto di questi fattori, nel nostro laboratorio è stato progettato e prodotto un anticorpo interamente umano anti-ErbB2, chiamato Erb-hcAb

(anti-ErbB2, human, compact, Antibody) [17]. Esso è stato ottenuto mediante fusione di un scFv umano specifico per ErbB2, chiamato Erbicina [18] con il frammento Fc umano di una IgG1 (**Figura 2**). Tale anticorpo è stato definito compatto perché privo dei domini costanti CH₁ e CL, e pertanto dotato di dimensioni molecolari ridotte rispetto a quelle di una immunoglobulina convenzionale. Erb-hcAb è risultato capace di: legare selettivamente e con elevata affinità cellule ErbB2-positive; inibire la crescita di cellule tumorali ErbB2-positive sia *in vitro* che in modelli sperimentali *in vivo*; indurre apoptosi e citotossicità ADCC (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) in cellule ErbB2-positive [17, 19]. Risultati ottenuti recentemente fanno presupporre che Erb-hcAb possa essere utilizzato per applicazioni terapeutiche, anche in combinazione con altri agenti antitumorali [20].

Uno dei problemi associati all'impiego terapeutico di Herceptin è rappresentato dal suo effetto cardiotossico, come già citato in precedenza. Circa il 7% delle pazienti trattate con Herceptin sviluppa cardiomiopatie; tale percentuale aumenta in maniera considerevole (28%) quando Herceptin è somministrato in combinazione con le antracicline [21].

Herceptin inoltre è risultato efficace solo per il 30% delle pazienti che manifestano elevati livelli di espressione di ErbB2, e non ha alcun effetto su soggetti che manifestano più bassi livelli di espressione del recettore [22].

Infine, un altro limite di Herceptin è l'insorgenza di un fenomeno di resistenza durante il trattamento, che riduce drasticamente gli effetti terapeutici dell'anticorpo. Le pazienti che hanno manifestato tale resistenza costituiscono circa il 30% di quelle trattate. Esse hanno mostrato un'iniziale risposta al trattamento, seguita dallo sviluppo di resistenza entro un anno dall'inizio della

terapia [23]. In tali casi la malattia avanza in modo molto aggressivo. Nessuna delle linee cellulari resistenti presenta tuttavia modifiche strutturali del recettore o alterazioni dei livelli di espressione di ErbB2. È stata invece osservata una inefficiente interazione tra Herceptin e il recettore. In particolare l'epitopo riconosciuto da Herceptin è mascherato e scarsamente accessibile all'anticorpo a causa dell'interazione di ErbB2 con altre proteine di membrana [24]. Poiché è stato recentemente dimostrato che Erb-hcAb riconosce un epitopo diverso da quello di Herceptin [20], esso potrebbe risultare attivo su tali cellule resistenti a Herceptin e consentire di superare i problemi di cardiotossicità.

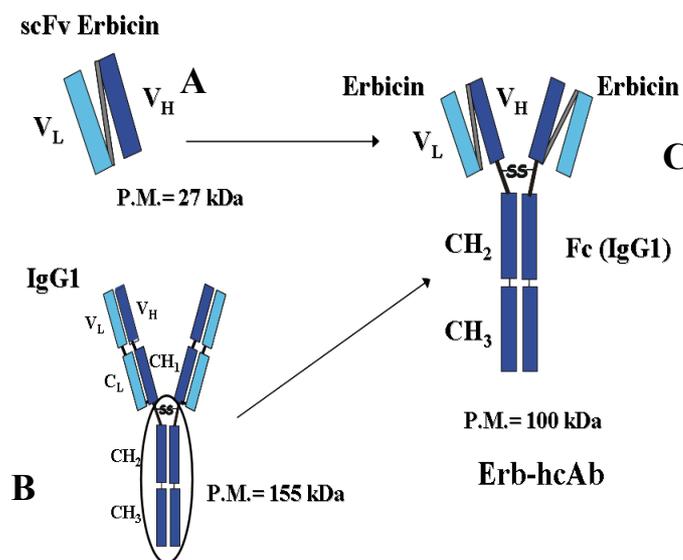


Figura 2: costruzione dell'anticorpo compatto umano (C), derivato da ErbB2 (A) e dalla porzione Fc di una IgG umana (B)

Oltre all'anticorpo "compatto" nel nostro laboratorio è stato prodotto un altro immunoagente anti-ErbB2 definito immunoRNasi. Le immunoRNasi sono immunoconiugati in cui l'scFv è fuso ad una ribonucleasi, che funge da pro-tossina in quanto manifesta la sua azione citotossica solo dopo

l'internalizzazione nelle cellule bersaglio, mediata dalla porzione anticorpale. La immunoRNasi da noi prodotta interamente umana è costituita dall'scFv anti-ErbB2 e dalla ribonucleasi pancreatica umana (HP-RNasi). Tale immunoRNasi chiamata Erbicina-HP-RNasi, è risultata essere selettivamente citotossica per cellule tumorali sia *in vitro* che *in vivo* [25], anche se, essendo monomeric, è suscettibile di inibizione da parte dell'inibitore citosolico delle ribonucleasi (cRI) [26].

2. Scopo del lavoro

La prima parte del lavoro di tesi è stato volto alla produzione di una nuova immunoRNasi interamente umana, resistente all'inibitore citosolico delle ribonucleasi, e pertanto dotata di una più potente attività citotossica. Per ottenere un immunoRNasi che abbia tali caratteristiche è stato utilizzato l'scFv Erbicina ed un mutante dimerico della ribonucleasi pancreatica umana. Tale variante, resistente all'azione dell'inibitore, è anche di per sé già dotata di attività citotossica selettiva per cellule tumorali [27].

Nella seconda parte, il lavoro sperimentale era finalizzato a verificare gli effetti *in vitro* di Erb-hcAb ed Herceptin su cellule cardiache e a chiarire gli aspetti molecolari alla base di tali effetti, mediante analisi della loro capacità di indurre l'apoptosi di tali cellule.

3. MATERIALI E METODI

Colture cellulari

Le cellule della linea SKBR3 da adenocarcinoma mammario, e le cellule TUBO, stabilizzate in coltura da tumori sviluppati in topi transgenici per ErbB2 di ratto, sono state coltivate in terreno RPMI 1640 (Cambrex) supplementato con L-glutamina, penicillina, streptomicina e siero fetale bovino (FBS) al 10%, inattivato al calore (56°C).

I cardiomioblasti della linea H9C2 stabilizzati provenienti da embrioni di ratto, erano tenuti in coltura con terreno DMEM (Cambrex) supplementato con L-glutamina, penicillina, streptomicina, FBS al 10%, e sodio piruvato (1mM).

I cardiomiociti neonatali sono stati preparati con il metodo di Yagev [28].

Ceppi batterici

Sono stati utilizzati i ceppi di *E. coli* BL21 DE3 (Novagen), BL21 DE3 Rosetta (Novagen), BL21 DE3 Star (Invitrogen), DH5 α (Invitrogen).

Vettori

Il vettore pET22b+ è dalla Novagen, il vettore pGEM-t-easy è della Promega.

Mezzi di coltura batterica

I mezzi di coltura LB (Luria-Bertani) e SOC, utilizzati per la coltura dei batteri in terreno liquido e solido, erano preparati come descritto da Sambrook *et al* [29, 30]. Per trasformare il ceppo di *E.coli* BL21 DE3 era utilizzata ampicillina alla concentrazione di 50 μ g/ml.

Anticorpi

Gli anticorpi impiegati erano: immunoglobuline da siero di coniglio anti-HP-RNasi (Igtech); l'anticorpo monoclonale murino anti-His (Quiagen); l'anticorpo da siero di coniglio anti-actina (Sigma); l'anticorpo da siero di

capra anti-caspasi3p20, l'anticorpo da siero di coniglio anti-Bcl-X_L, l'anticorpo da siero di coniglio anti-Neu, l'anticorpo monoclonale murino specifico per le tirosine fosforilate erano acquistati da Santa Cruz Biotechnology, Inc. Gli anticorpi anti-Fc umano (Sigma), anti-Fc di coniglio(Sigma) anti-Fc di topo (Pierce) e anti-Fc di capra (Santa Cruz Biotechnology, Inc) erano tutti coniugati con la perossidasi.

Preparazione di cellule batteriche competenti

Singole colonie del ceppo BL21 DE3 erano prelevate da una piastra di LB/agar ed inoculate in 5 ml di terreno LB. Le cellule erano incubate in agitazione a 37°C e fatte crescere fino ad un valore di 0,5 O.D._{600 nm}. Dopo 10 minuti le cellule erano centrifugate per 5 minuti a 5000 rpm ed il sedimento risospeso in CaCl₂ 50 mM e lasciato per 20 minuti a 0°C. Le cellule erano poi centrifugate per 5 minuti a 4000 rpm ed il sedimento risospeso nella stessa soluzione.

Trasformazione batterica

Le cellule DH5α competenti (150 µl) erano trasformate con l'aggiunta di 50 ng di DNA plasmidico e poste in ghiaccio per 40 minuti. Seguivano l'incubazione a 42°C per 2 minuti. Dopo l'aggiunta di 1 ml di terreno LB, le cellule erano incubate a 37°C per un'ora. Aliquote di 200 µl della sospensione batterica erano piastrate su piastre di LB/agar contenente ampicillina (50 µg/ml).

Costruzione del cDNA chimerico

Il cDNA codificante l'HP-RNasi è stato amplificato mediante due reazioni successive di PCR. Gli oligonucleotidi utilizzati erano SP-1, AP, SP-2, le cui sequenze sono riportate di seguito.

SP-1 (senso): 5'-GGCCCGGAAGGCGGCAGCAAAAGAATCTAGAGCTAA
AAA-3'. Esso contiene la sequenza codificante la porzione C-terminale del peptide *spacer* di sei aminoacidi. La regione sottolineata è complementare allo stampo. AP (antisenso): 5'-ATAAGAATGCGGCCGCAGAGTCTTCAACAG
ACG-3'. Tale oligonucleotide è complementare alla sequenza codificante l'estremità C-terminale della HP-RNasi e consente l'introduzione del sito di restrizione *NotI*, sottolineato in corsivo. Nella seconda PCR è stato utilizzato l'oligonucleotide AP (antisenso) e l'oligonucleotide SP-2 (senso), la cui sequenza è mostrata di seguito. SP-2 (senso): 5'-ATAAGAATGCGGCCGC
AGCGGCGGCCCGGAAGGCGG-3'. Quest'ultimo oligonucleotide consente l'introduzione della sequenza codificante per i primi cinque aminoacidi dello *spacer* e contiene il secondo sito di restrizione *NotI*.

Le reazioni sono state effettuate in un volume di 50 µl utilizzando 20 ng di DNA. Nella miscela di reazione erano presenti : gli oligonucleotidi alla concentrazione finale di 20 µM; la miscela di dNTP_s alla concentrazione di 0.2 mM; MgSO₄ (1mM); il tampone di reazione (amplification buffer 10x) e 5U di enzima *Taq* polimerasi (da *T. aquaticus*, Roche). I campioni erano sottoposti a 30 cicli di amplificazione: denaturazione per 2 minuti a 95°C; ibridazione per 2 minuti a 55°C; polimerizzazione per 2 minuti a 73°C. La sintesi era completata incubando per 10 minuti a 73°C. Il DNA amplificato è stato isolato, mediante eluizione da gel di agarosio (1%), con il sistema "Gel Extraction Kit" (Qiagen).

Clonaggio del prodotto di amplificazione nel vettore pGEM-t-easy

Per il clonaggio si preparava la miscela di legazione composta: Rapid buffer (2x), il vettore (50ng), il cDNA (20ng), la DNA Ligasi di T4 (3U) in un volume finale di 10 µl.

Clonaggio del cDNA nel vettore pET22b+

Il cDNA chimerico escisso dal vettore pGEM-t-easy, mediante digestione con l'endonucleasi di restrizione *NotI*, era purificato per elettroforesi su gel d'agarosio e sottoposto a reazione di ligazione con il vettore pET22b+. In cui era già clonato il cDNA codificante l'scFv Erbicina. Un'aliquota di 6 µg di pET22b+ ricombinante era digerita con l'endonucleasi di restrizione *NotI* (20U) per 2 ore a 37°C. e successivamente sottoposto ad una reazione di defosforilazione. mediante incubazione per 30 minuti a 37°C con la fosfatasi (CIP). L'enzima (4U) è stato poi inattivato per aggiunta di EDTA 50 mM per 10 minuti a 75°C. Il vettore era purificato mediante eluizione da gel di agarosio. Si procedeva alla legazione nella miscela di legazione era composta da: il tampone DNA ligasi (10x), il vettore pET22b+/scFv (50ng), il cDNA (20ng) e la DNA ligasi di T4 (3U) in un volume finale di 10 µl.

Batteri del ceppo DH5α sono stati quindi trasformati con la miscela ligasica e cresciuti su piastre di agar in LB, contenente ampicillina (50 µg/ml).

Si è poi proceduto alla preparazione del DNA plasmidico dalle colture in terreno liquido ottenuto dopo inoculo delle colonie in LB. A tale scopo si utilizzava il sistema "Miniprep kit" (Quiagen). Il sequenziamento confermava che il cDNA era stato correttamente clonato.

Espressione della proteina ricombinante

Per l'espressione della ImmunoRNasi, era prelevata una colonia di cellule trasformate con il plasmide ricombinante. Le cellule erano inoculate in 5 ml di LB contenente ampicillina 50 µg/ml ed incubate a 37°C in agitazione fino ad avere un'assorbanza a 600 nm pari a 0.6 O.D. Tale coltura era poi inoculata in 1 litro di terreno LB contenente l'antibiotico, ed incubata in agitazione a 37°C

fino ad avere un'assorbanza a 600 nm pari a 1 O.D. Le colture erano poi indotte mediante aggiunta di IPTG alla concentrazione di 1 mM, e lasciate in agitazione per circa 16 ore a temperatura ambiente. Successivamente le cellule erano raccolte mediante centrifugazione a 6000 rpm per 20 minuti a 4°C.

Preparazione dell'estratto periplasmico e della frazione insolubile per l'isolamento della ImmunoRNasi

Le cellule batteriche, raccolte per centrifugazione, erano risospese nel tampone Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, contenente saccarosio 20%, EDTA 1 mM ed inibitori delle proteasi, per ottenere la lisi osmotica delle cellule batteriche. Le cellule erano lasciate per 40 minuti a 0°C e successivamente centrifugate a 12'000 rpm alla temperatura di 4°C per 15 minuti ottenendo così l'estratto periplasmico. La frazione insolubile era solubilizzata con un tampone TBS di Tris-HCl 0.25 M, pH 8.0 contenente urea 4 M, NaCl 1,4 M, KCl 27 mM e tenuta in agitazione a 0°C per 1 ora. Mediante centrifugazione a 4°C per un'ora a 22'000g, si otteneva una frazione solubile.

Tecniche cromatografiche per l'isolamento della ImmunoRNasi

Cromatografia ad interazione idrofobica

L'estratto periplasmico era caricato su una resina cromatografica MEP (4-mercapto-etil-piridina, Hypercel, Biosepra). Il campione, ottenuto mediante solubilizzazione nel tampone TBS/Urea 4 M, era dializzato contro un tampone di Tris-Acetato 0.1 M a pH 8.4, contenente PMSF 1 mM. Il surnatante, ottenuto in seguito a centrifugazione del campione dializzato, veniva incubato per 2 ore a temperatura ambiente con la resina che era successivamente lavata con Tris-HCl 50 mM, pH 8.0. Dopo un successivo lavaggio con H₂O, seguito da 2 lavaggi con Tris-HCl 50 mM, pH 8.0 contenente sodio caprilato (25 mM),

si procedeva ad un lavaggio con Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, ed infine all'eluizione con tampone di acetato di sodio 50 mM, pH 4.0. La frazione eluita era immediatamente neutralizzata con Tris-HCl 1 M, pH 7.4 (1/10 del volume della frazione) e diluita (1:1 v/v) con BPER (Pierce).

Cromatografie per affinità

Cromatografia di affinità per riconoscimento di ioni Co^{2+} immobilizzati su resina TALON

Il campione, ottenuto dalla preparazione dell'estratto periplasmico o dalla frazione insolubile, era sottoposto ad una cromatografia per affinità IMAC (TALON[®] Metal Affinity Resin, Clontech). Il campione era incubato in presenza di 400 µl di resina per 2 ore a 25°C in agitazione. La resina era lavata poi con il tampone NaH_2PO_4 50 mM, pH 7.0, contenente NaCl 0.3 M e imidazolo 20 mM. L'eluizione avveniva con il tampone di eluizione contenente imidazolo 250 mM.

Uridina 2',5' e 3',5'- difosfato – agarosio (pUp)

Il campione, ottenuto dalla solubilizzazione della membrana batterica nel tampone TBS contenente Urea 4 M, era sottoposto a dialisi contro il tampone di equilibrio (acetato di sodio 0.1 M a pH 5.8). Il surnatante dializzato veniva quindi incubato con la resina pUp-agarosio per 16 ore alla temperatura di 4°C. Dopo opportuni lavaggi con il tampone di equilibrio si procedeva all'eluizione con un tampone di Tris-HCl alla concentrazione di 50 mM a pH 8.0 contenente NaCl 1 M.

Sistema di purificazione ProBond

Gli estratti batterici, solubilizzati nel tampone TBS /Urea 4 M, erano incubati in agitazione a 4°C per un'ora. Il surnatante, ottenuto mediante centrifugazione, veniva incubato con la resina per 16 ore a 4°C.

La resina era poi sottoposta ai seguenti lavaggi: tre lavaggi in un tampone fosfato contenente Urea 4 M; due lavaggi in un tampone di fosfato di sodio 20 mM a pH 7.8, contenente Urea 4 M, NaCl 50 mM; quattro lavaggi in un tampone di fosfato di sodio 20 mM a pH 6.0 contenente NaCl 50 mM. Seguiva l'eluizione in un tampone NaH_2PO_4 20 mM a pH 4.0 contenente NaCl 50 mM.

Determinazione della concentrazione proteica

Per la determinazione della concentrazione proteica si è usato il metodo "BCA Protein Assay" (Pierce), utilizzando come riferimento una retta di calibrazione costruita con albumina di siero bovino (BSA), saggiata in quantità comprese tra 1 e 4 μg . L'incubazione con BCA era condotta a 60°C per 30 minuti. Tutte le determinazioni erano effettuate in duplicato.

Elettroforesi su gel di poliacrilammide in SDS

L'elettroforesi era effettuata secondo il protocollo proposto da Laemmli [31].

Al termine della corsa elettroforetica il gel era trattato come segue:

a) Colorazione con colorante blu di Coomassie. Il gel era colorato mediante immersione per 30 minuti in una soluzione contenente isopropanolo al 20%, acido acetico al 10% e il colorante blu di Coomassie alla concentrazione finale dello 0,1%. Il gel era poi decolorato con successivi lavaggi in una soluzione contenente alcool etilico al 20% e acido acetico al 7%.

b) Colorazione per attività ribonucleasica. Il gel era immerso in una miscela di isopropanolo al 25% in Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 per 30 minuti, ed equilibrato poi in Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 per lo stesso tempo. Successivamente il gel era incubato con una soluzione dello stesso tampone contenente RNA alla concentrazione di 4 mg/ml per 10 minuti a 37°C. A reazione ultimata, il gel era lavato con il tampone di equilibrio, e poi colorato per immersione in una

soluzione di blu di toluidina allo 0.2% in acido acetico 0.1% per 15 minuti, ed infine decolorato con successivi lavaggi in acqua. Come controllo, era utilizzata la ribonucleasi seminale bovina (BS-RNasi) (20-100 ng).

c) Western blotting. Il materiale presente sul gel era trasferito elettricamente su di una membrana di PVDF, utilizzando un voltaggio di 25 V per 16 ore a 4°C. La membrana successivamente era lavata con 10 mL di una soluzione di PBS, Tween 20 allo 0,1% e BSA al 5% per 1 ora a temperatura ambiente. Successivamente la membrana era incubata per 1 ora e 30 minuti l'anticorpo anti-His o anti-HPRNasi in PBS, contenente Tween 20 allo 0.1% e BSA all'1%. Dopo cinque lavaggi con una soluzione di PBS, contenente Tween 20 allo 0.1%, effettuati allo scopo di allontanare l'eccesso di anticorpo, le bande erano visualizzate mediante chemiluminescenza al *phosphorimager* (Super Signal® West-Pico Chemiluminescent Substrate, PIERCE).

Dimerizzazione della proteina ricombinante

Incubazione con miscela redox (GSH/GSSG)

Ad aliquote di 50 µg di proteina, era aggiunto glutatione (GSH) a concentrazioni finali di 3 mM, 5 mM e 10 mM. La proteina, portata a pH 8.0 con NaOH 1M, era poi incubata per 2.5 ore a temperatura ambiente, in atmosfera di azoto. Successivamente, veniva aggiunto glutatione ossidato (GSSG) alla concentrazione finale di 1 mM. Il rapporto molare GSH/GSSG finale nelle diverse soluzioni era quindi pari a 3:1, 5:1, 10:1 (M/M). Seguiva un'incubazione per 24 ore a temperatura ambiente.

Ultrafiltrazione

Aliquote di 500 µl di proteina, venivano concentrate per ultrafiltrazione con sistema Microcon YM10 (Amicon).

Preparazione di lisati cellulari

Le cellule H9C2 e i cardiomiociti neonatali, rimossi dai pozzetti con la soluzione di dissociazione (Sigma), erano lavati con PBS. Dopo centrifugazione a 1200 rpm per 7 minuti, il sedimento era risospeso in tampone di lisi costituito da: Tris-Hcl 10 mM pH 7.4, Nonidet-P-40 0.5%, NaCl 150 mM, in presenza di una miscela di inibitori di proteasi (Complete™ Proteases Inhibitor, Boehringer Mannheim, Germania). La lisi era effettuata incubando le cellule per 20 minuti in ghiaccio. Il lisato era ottenuto per centrifugazione a 12000 rpm per 15 minuti a 4°C.

Saggi ELISA

I saggi di legame di Erbicina-HHP-RNasi al recettore sono stati effettuati su cellule SKBR3, ErbB2-positive. Le cellule erano trasferite in piastre da 96 pozzetti a fondo conico, alla densità di 200.000 cellule per pozzetto. Le cellule erano incubate con concentrazioni crescenti di Erbicina-HHP-RNasi e Erbicina-HP-RNasi per 1 ora e 30 minuti a temperatura ambiente in PBS contenente BSA al 3%. Dopo estensivi lavaggi in PBS, le cellule erano incubate con l'anticorpo anti-istidine (Qiagen) coniugato alla perossidasi di rafano, diluito 1:1000 in PBS e BSA 3%, per 1 ora a temperatura ambiente in agitazione.

I saggi di legame di Erb-hcAb e Herceptin al recettore ErbB2 di ratto sono stati effettuati su cellule della linea H9C2, cellule della linea TUBO, e cardiomiociti neonatali. Le cellule H9C2 e TUBO erano trasferite in piastre da 96 pozzetti a fondo conico, alla densità di 300000 cellule per pozzetto. I cardiomiociti neonatali erano invece piastrati in piastre da 96 pozzetti a fondo piano, coltivati per una settimana, e fissati mediante incubazione per 10 minuti

a temperatura ambiente con una soluzione di PBS contenente paraformaldeide al 4%. Dopo lavaggi in PBS, le cellule erano incubate per 10 minuti a temperatura ambiente in una soluzione di PBS/BSA 3%, e successivamente di nuovo lavate in PBS. Per le successive fasi, si procedeva per le tre linee cellulari con le seguenti modalità: le cellule erano incubate in assenza o in presenza di concentrazioni crescenti di Erb-hcAb o Herceptin per 1 ora e 30 minuti a temperatura ambiente. Dopo estensivi lavaggi in PBS, le cellule erano incubate con l'anticorpo anti-Fc umano coniugato alla perossidasi di rafano, diluito 1:1000 in PBS e BSA 3%, per 1 ora a temperatura ambiente in agitazione.

In tutti i casi, al termine dell'incubazione con l'anticorpo coniugato all'enzima, erano effettuati lavaggi in PBS, e le cellule erano incubate per 5 minuti con il substrato della perossidasi 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (Sigma).

La reazione enzimatica era arrestata con l'aggiunta di HCl 1N, e l'assorbanza a 450 nm era misurata utilizzando un lettore automatico VICTOR³_{TM} Perkin-Elmer.

Saggi di inibizione della crescita di cellule tumorali

Le cellule SKBR3, coltivate come descritto precedentemente, erano piastrate alla densità di circa 15000 cellule per pozzetto in piastre da 96 pozzetti.

Le proteine Erbicina-HHP-RNasi e Erbicina-HP-RNasi, erano aggiunte al terreno di coltura al momento del piastramento a concentrazioni crescenti (5-80 nM). Le cellule erano quindi incubate a 37°C per 72 ore in assenza o in presenza delle immunoRNasi. Si procedeva poi alla conta delle cellule con il microscopio ottico. I valori ottenuti dalla media di tre determinazioni sono stati usati per calcolare la percentuale di sopravvivenza delle cellule incubate

rispetto al controllo, costituito da cellule cresciute nelle stesse condizioni in assenza di proteina.

Immunoprecipitazione di ErbB2 di ratto

Tali esperimenti erano effettuati utilizzando cellule H9C2 e cardiomiociti neonatali. Le cellule erano rimosse dalla piastra con la soluzione di dissociazione (Sigma), lavate con PBS, e risospese in tampone di lisi, come precedentemente descritto. Dopo centrifugazione, la frazione solubile (2.5 mg di proteine totali) era sottoposta a pre-incubazione con la resina Proteina-A-agarosio (20µl), per 1 ora a 4°C.

Dopo rimozione della resina, il lisato era incubato con aliquote di 10 µg dell'anticorpo Erb-hcAb o dell'anticorpo Herceptin e di 5 µg dell'anticorpo anti-Neu, per 16 ore a 4°C in agitazione. Successivamente a ciascuna miscela era aggiunta la resina Proteina-A-agarosio (20µl) ed incubato per 1 ora a 4°C. La resina era poi recuperata per centrifugazione a 1500 rpm per 2 minuti e lavata per tre volte con tampone di lisi e una volta con PBS. L'eluizione avveniva mediante bollitura per 5 minuti in tampone di carico composto da: Tris 0.1 M, pH 6.8, SDS 10%, glicerolo 100%, Blu di bromofenolo 2,5%. Dopo centrifugazione a 1200 rpm per 5 minuti, il sopranatante era analizzato mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide al 7.5% in SDS. Il contenuto del gel era poi trasferito elettricamente su membrana PVDF, come descritto precedentemente. Le analisi mediante Western Blotting erano effettuate utilizzando un anticorpo monoclonale di coniglio anti-ErbB2 (sc284, Santa Cruz Biotechnology) diluito 1:200. Come anticorpo secondario era utilizzato un anticorpo anti-IgG di coniglio coniugato a perossidasi di rafano (Pierce). Le bande erano visualizzate mediante chemiluminescenza al *phosphorimager*.

Determinazione dei livelli intracellulari di Bcl-X_L e Caspasi3

Per analizzare gli effetti di Erb-hcAb e Herceptin sui livelli intracellulari di caspasi3 e Bcl-XL erano utilizzate cellule H9C2, piastrate in piastre da 6 pozzetti alla densità di 600.000 cellule per pozzetto.

Le cellule erano incubate a 37°C in assenza o in presenza di Erb-hcAb o Herceptin alla concentrazione di 200 nM per diversi intervalli di tempo (24, 48 e 72 ore). Dopo un lavaggio in PBS, si procedeva alla raccolta delle cellule con la soluzione di dissociazione (Sigma) mediante incubazione per 15 minuti a 37°C, e al loro trasferimento in tubi Eppendorf.

Dopo centrifugazione a 12000 rpm per 2 minuti, le cellule erano lavate in PBS e lisate come precedentemente descritto. I prodotti della lisi erano analizzati mediante gel di poliacrilammide al 7,5% in SDS, il cui contenuto era poi trasferito elettricamente su membrana PVDF per l'analisi mediante Western Blotting con l'utilizzo di un anticorpo di coniglio anti-Caspasi3p20, un anticorpo di capra anti Bcl-X_L e un anticorpo di coniglio anti-actina. Seguiva l'incubazione con gli anticorpi secondari, anti-immunoglobuline di coniglio e di capra, coniugati alla perossidasi di rafano.

Le bande immunoreattive erano poi visualizzate mediante chemiluminescenza al *phosphorimager*.

4. RISULTATI

4.1. Costruzione del cDNA codificante per la immunoRNasi dimerica

Nel nostro laboratorio erano già disponibili i cDNA codificanti l'scFv Erbicina ed un mutante dimerico della ribonucleasi pancreatica umana (HP-RNasi). Tale RNasi è stata ingegnerizzata utilizzando come modello la BS-RNasi, unica proteina membro della superfamiglia delle ribonucleasi di tipo pancreatico ad avere una struttura dimerica, che ha consentito l'identificazione dei cinque amminoacidi essenziali per la struttura dimerica [27].

Tali residui amminoacidici assenti nella sequenza della HP-RNasi nativa, e quindi introdotti mediante mutagenesi, sono: le cisteine in posizione 31 e 32, indispensabili per la formazione dei due ponti disolfurici intersubunità; la leucina in posizione 28, importante per la stabilizzazione della struttura dimerica in quanto consente un'interazione idrofobica all'interfaccia fra le due subunità; la lisina in posizione 34, responsabile della reattività delle cisteine per la formazione di ponti disolfurici intercatena; la glicina in posizione 111, necessaria per l'attività ribonucleasica su RNA a doppia elica [32].

Altri amminoacidi importanti della BS-RNasi, ma già presenti anche nella sequenza della ribonucleasi pancreatica umana, sono la glicina in posizione 38, necessaria anch'essa per l'attività enzimatica su RNA a doppia elica [32], la prolina in posizione 19, coinvolta nell'interscambio dei segmenti NH₂-terminali tra le due subunità nella BS-RNasi, che è risultato essere importante per l'attività antitumorale [33].

La ribonucleasi dimerica ottenuta è stata chiamata LCCKG-HHP-RNasi ed è dotata delle stesse proprietà biologiche della BS-RNasi. La sigla LCCKG si

riferisce alle cinque sostituzioni amminoacidiche effettuate, la doppia H indica la sua struttura dimerica.

Per l'ottenimento del cDNA chimerico in cui la sequenza codificante la ribonucleasi fosse fusa a quella codificante l'scFv, è stata seguita la seguente strategia (**Figura 1**). La sequenza del cDNA codificante l'HHP-RNasi, contenuta nel vettore plasmidico pET22b+, è stata amplificata mediante due successive reazioni di polimerizzazione a catena (PCR), utilizzando specifici oligonucleotidi utili per inserire a valle del cDNA la sequenza di riconoscimento per l'endonucleasi di restrizione *NotI*, ed a monte un segmento spaziatore codificante un oligopeptide di undici residui amminoacidici ed una seconda sequenza di riconoscimento per *NotI*.

Il prodotto di amplificazione è stato clonato prima nel vettore pGEM-t-easy e successivamente nel vettore pET22b+ contenente l'scFv Erbicina, come descritto nei metodi.

Il costrutto ottenuto che risulta clonato nel vettore pET22b+ codifica la proteina chimerica con la seguente struttura: all'estremità NH₂-terminale è presente l'scFv Erbicina, costituito a sua volta dalle regioni V_H e V_L, fra le quali è interposto un oligopeptide flessibile di quindici residui amminoacidici che ne permette il corretto ripiegamento, segue la ribonucleasi pancreatica umana mutata (HHP-LCCKG). Un peptide spaziatore di undici residui amminoacidici, risulta interposto fra il frammento anticorpale e la ribonucleasi. Infine a valle del costrutto è presente una sequenza di sei istidine, utile per il suo isolamento e riconoscimento mediante analisi di western blotting. L'immunoRNasi dimerica così costituita è stata chiamata Erbicina-HHP-RNasi.

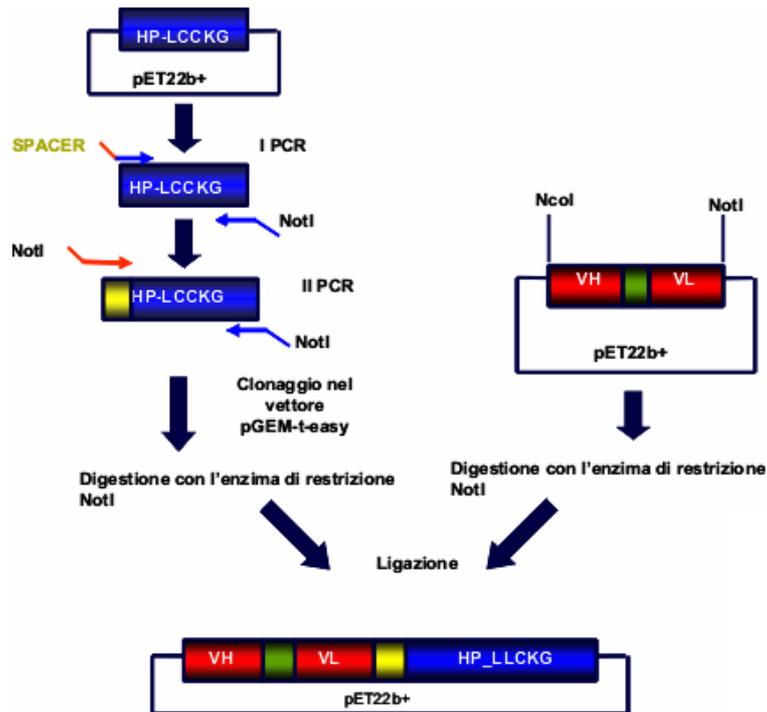


Figura 1: Schema della strategia utilizzata per la costruzione del cDNA chimerico

4.2. Espressione della proteina ricombinante Erbicina-HHP-RNasi

Il vettore ricombinante pET22b+ contenente il costrutto hscFv-HP-LCCKG era utilizzato per trasformare opportuni ceppi di *E. coli* per espressione.

Per stabilire quali fossero gli ospiti cellulari che consentissero di ottenere una maggiore espressione della proteina ricombinante, erano utilizzati diversi ceppi di *E. coli*: BL21 (DE3), era utilizzato perché impiegato per l'espressione della ImmunoRNasi monomerica; BL21 (DE3) Rosetta, era scelto in quanto ingegnerizzato per ottimizzare l'espressione di sequenze codificanti proteine eucariotiche contenenti codoni raramente usati in *E.coli*; BL21(DE3) Star era impiegato in quanto ingegnerizzato per aumentare la stabilità dei trascritti di mRNA ed incrementare la produzione di proteine nei sistemi d'espressione contenenti il promotore del fago T7. L'espressione in tali ceppi cellulari era analizzata mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti degli estratti periplasmici e dei corpi di inclusione, preparati come

descritto nei Metodi. I gel erano poi sottoposti a colorazione con blu di Coomassie e ad analisi mediante Western blotting. La colorazione con blu di Coomassie non ha permesso di osservare una differenza di espressione per i ceppi cellulari in esame. Dall'analisi mediante Western blotting (**Figura 2a**) si osserva che la proteina di interesse, dal peso molecolare di 46kDa, è espressa a più alti livelli nel ceppo BL21 (DE3) Rosetta, in particolare nei corpi di inclusione (90% di proteina espressa). Al fine di individuare le condizioni ottimali per l'espressione della proteina, erano utilizzate diverse temperature di crescita per i batteri (25°C e 37°C), e differenti terreni di coltura (LB e SOC). Gli estratti proteici dei batteri erano analizzati come descritto sopra. Dalla **figura 2b** si evince che la proteina è espressa in quantità più elevate quando si utilizza il terreno di coltura SOC, la temperatura di 37°C per la crescita, e l'induzione con IPTG alla concentrazione di 1mM per 16 ora a 25°C. Anche in queste condizioni il 90% della proteina espressa si ritrova nei corpi di inclusione.

Per verificare che la immunoRNasi ricombinante fosse dotata di attività ribonucleasica, era eseguita un'elettroforesi su gel di poliacrilammide con successiva colorazione per attività ribonucleasica. Nello zimogramma (**Figura 3**) si evidenzia la presenza di una banda chiara su fondo scuro, che indica l'avvenuta degradazione dell'RNA nel gel, e quindi la presenza di attività enzimatica associabile alla proteina di interesse.

4.3. Purificazione della proteina ricombinante Erbicina-HHP-RNasi

Per ottenere la proteina ricombinante in forma pura sono state utilizzate varie tecniche cromatografiche, usate in combinazione fra loro o singolarmente, e descritte di seguito

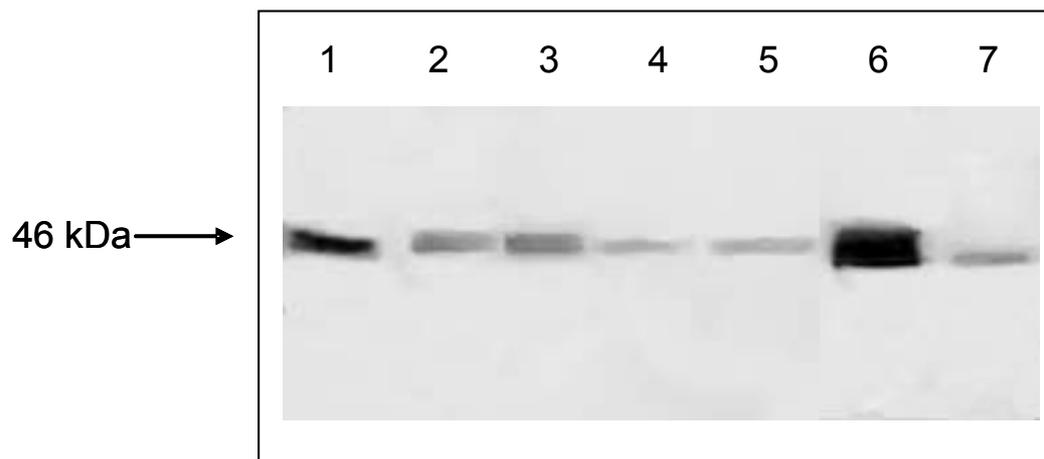


Figura 2a. Analisi dell'espressione di Erbicina-HP-LCCKG-RNasi in tre ceppi cellulari di *E.coli* mediante immunorilevazione.

Nel canale 1 è presente Erbicina-HP-RNasi, l'immunoRNasi monomerica utilizzata da riferimento di peso molecolare (P.M.=46 kDa). Nei canali seguenti sono presenti le frazioni di proteina d'interesse, isolata dallo spazio periplasmico dei ceppi cellulari BL21 Star (canale 2), BL21 Rosetta (canale 3), BL21 (canale 4). Negli ultimi tre canali si osservano le frazioni di proteina isolata dai corpi d'inclusione dei ceppi cellulari BL21 Star (canale 5), BL21 Rosetta (canale 6), BL21 (canale 7).

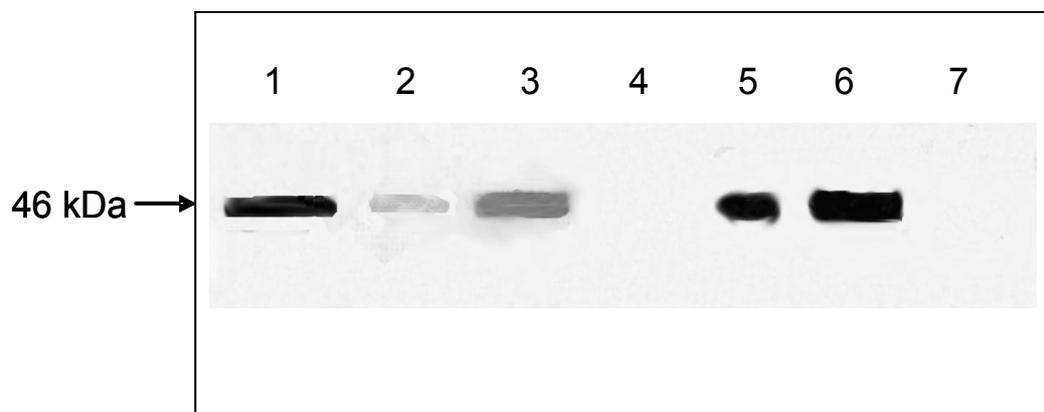


Figura 2b. Analisi dell'espressione di Erbicina-HPLCCKG-RNasi in diversi terreni di coltura, mediante immunorilevazione.

Nel canale 1 si osserva Erbicina-HP-RNasi, immunoRNasi monomerica utilizzata come riferimento di peso molecolare. Nei tre canali successivi: frazione di proteina isolata dall'estratto periplasmico delle cellule BL21 Rosetta, cresciute in terreno LB ed indotte con IPTG (canale 2), in terreno SOC ed indotte con IPTG (canale 3), in terreno SOC in assenza di IPTG (canale 4). Negli ultimi tre canali è presente la frazione di proteina d'interesse isolata dai corpi d'inclusione del suddetto ceppo cresciuto in LB ed indotto con IPTG (canale 5), in terreno SOC ed indotto con IPTG (canale 6), in terreno SOC in assenza di IPTG (canale 7).

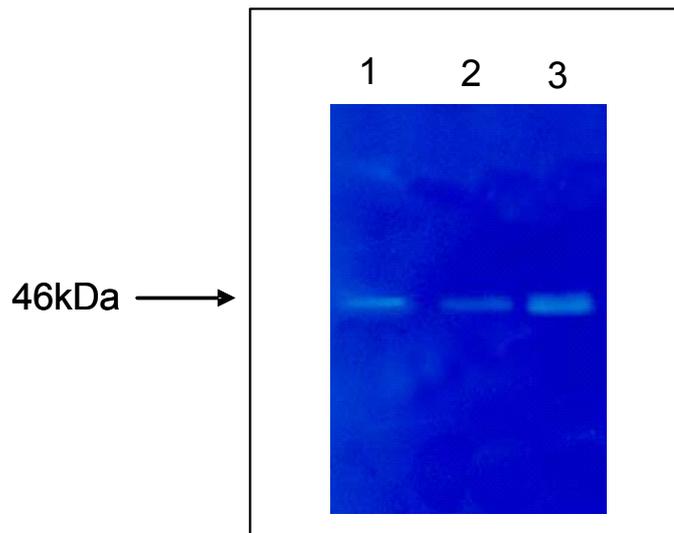


Figura 3: Analisi mediante colorazione per attività ribonucleasica del campione estratto dal ceppo cellulare BL21 Rosetta. A partire da sinistra si osservano: la frazione di proteina d'interesse isolata dai corpi d'inclusione delle cellule BL21 Rosetta (canale 1); la frazione di proteina d'interesse isolata dallo spazio periplasmico del medesimo ceppo cellulare (canale 2); Erbicina-HP-RNasi, utilizzata come riferimento (canale 3).

4.3.1. Cromatografia di affinità con resina ProBond

Alla resina del sistema ProBond sono legati ioni Ni^{2+} capaci di formare legami di coordinazione con residui di poli-istidina presenti all'estremità COOH-terminale della proteina. La cromatografia era sviluppata come descritto nei metodi. La frazione proteica eluita era analizzata mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide al 12% in SDS in condizioni non riducenti. Come si osserva in **figura 4** la quantità di proteina ricombinante, isolata con tale cromatografia, è esigua ed in forma esclusivamente monomeric. La maggior parte della proteina di interesse è presente nel rifiutato di tale resina. Inoltre la presenza di bande contaminanti a più basso peso molecolare è indice che tale procedimento non consente di ottenere la proteina in forma omogenea.

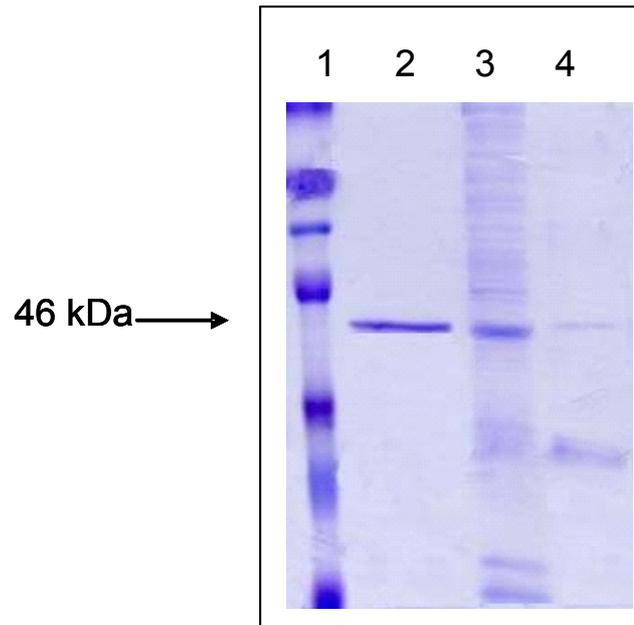


Figura 4: Analisi mediante SDS-PAGE della purificazione mediante cromatografia di affinità su resina-Nichel.

A partire da sinistra si osservano: proteine di peso molecolare noto (canale 1); l'ImmunoRNasi monomeric Erbicina-HP-RNasi (canale 2); la frazione proteica del rifiutato da resina Nickel (canale 3); la frazione eluita dalla resina Nickel (canale 4).

4.3.2. Cromatografia di affinità con resina uridina 2',5' e 3',5' difosfato – agarosio (pUp)

La resina per affinità pUp-agarosio contiene i nucleotidi uridina 2'5' e 3'5'- difosfato analoghi del substrato della ribonucleasi. Tali nucleotidi sono capaci di legare il sito catalitico di ribonucleasi enzimaticamente attive.

La frazione insolubile dell'estratto batterico era solubilizzata in tampone contenente Urea 4M e successivamente sottoposta a dialisi contro tampone di acetato di sodio 0.1M a pH 5.8, necessario per consentire il legame proteina-resina. La dialisi però comportava la precipitazione di materiale proteico che era allontanato mediante centrifugazione. Il surnatante era incubato con la resina per 16 ore a 4°C. La resina era lavata (vedi Metodi) e sottoposta ad eluizione con Tris-HCl 50 mM a pH 8, contenente NaCl 1M.

Dall'analisi mediante elettroforesi su SDS-PAGE si evince che la maggior parte di proteina ricombinante precipita durante la dialisi in tampone di sodio acetato, e solo una piccola quota di proteina di interesse viene isolata con tale cromatografia (**Figura 5a**).

4.3.3. Cromatografia ad interazione idrofobica su resina MEP (4-mercapto-etil-piridina)

La cromatografia ad interazione idrofobica mediante impiego della resina MEP consente di isolare la proteina di interesse sfruttando le interazioni che si formano tra la regione idrofobica dell'scFv e la catena alifatica legata alla resina. L'estratto batterico, ottenuto mediante solubilizzazione in un tampone TBS/Urea 4M, era dializzato contro un tampone di Tris-Acetato 0.1M a pH 8.4, contenente PMSF 1mM.

Tuttavia l'allontanamento dell'urea, necessario per consentire il legame della proteina alla resina MEP, comportava la precipitazione di proteine, rimosse successivamente mediante centrifugazione. Il surnatante era quindi incubato su resina MEP per 2 ore a 25°C. Le frazioni eluite con un tampone di sodio acetato 50mM a pH 4.0, erano immediatamente neutralizzate con Tris-HCl 1M pH 7.4 (1/10 del volume della frazione), per evitare che la proteina precipitasse a pH acido. Per verificare la purezza della proteina eluita, è stata effettuata un'analisi mediante gel di poliacrilammide al 12% in SDS in condizioni non riducenti. Come si può osservare dalla **figura 5b** gran parte della proteina di interesse era precipitata durante la dialisi, e solo una minima parte era isolata mediante tale tecnica cromatografica. Inoltre la presenza di proteine contaminanti nella frazione eluita indicava l'inefficienza di tale procedura di purificazione.

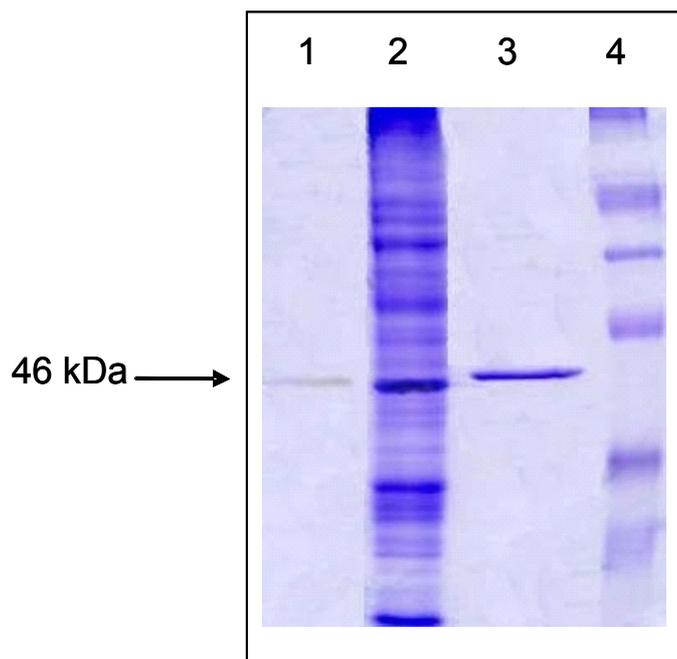


Figura 5a. Analisi mediante SDS-PAGE della cromatografia su resina pUp della: frazione eluita dalla resina pUp (canale 1); frazione proteica precipitata dopo dialisi contro il tampone NaAc 0.1M a pH 5.8 (canale 2); Erbicina-HP-RNasi, impiegata come riferimento (canale 3); proteine di peso molecolare noto (canale 4).

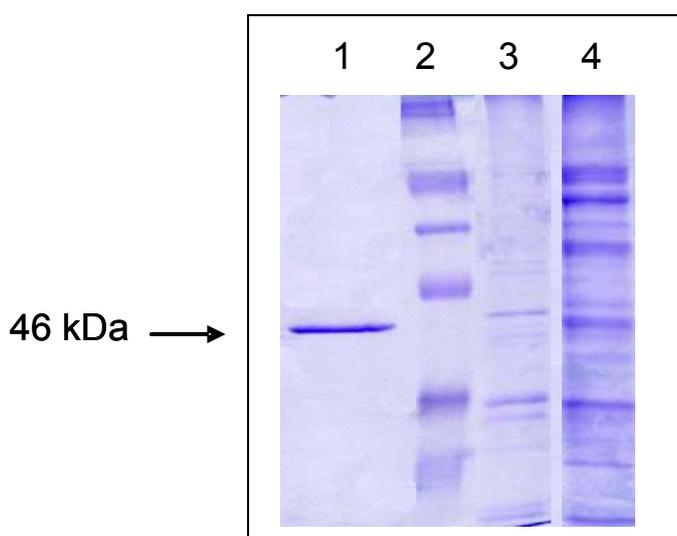


Figura 5b. Analisi mediante SDS-PAGE della cromatografia su resina MEP. Si osservano: Erbicina-HP-RNasi, utilizzata come riferimento (canale 1); proteine di peso molecolare noto (canale 2); frazione eluita da cromatografia su resina MEP (canale 3); frazione proteica precipitata in seguito a dialisi (canale 4)

4.3.4. Cromatografia di affinità su resina TALON

La resina TALON presenta ioni Co^{2+} capaci, anch'essi come gli ioni Ni^{2+} , di formare legami di coordinazione con residui di istidina.

L'estratto batterico, solubilizzato in tampone TBS contenente Urea 4M, era incubato con la resina per 16 ore a 4°C, che veniva poi lavata come descritto nei Metodi. Le frazioni eluite da tale resina erano analizzate mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide in SDS in condizioni non riducenti.

È possibile osservare in **figura 6a** la presenza della proteina, in forma monomerica (P.M. = 46kDa) ed in forma dimerica (P.M. = 92 kDa). Inoltre l'assenza di specie proteiche contaminanti indica che tale tecnica cromatografica permette una soddisfacente purificazione della proteina ricombinante.

L'analisi dei medesimi campioni mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide in SDS in condizioni non riducenti, e successiva colorazione per attività ribonucleasica, confermava che sia la forma monomerica che la forma dimerica sono attive enzimaticamente (**Figura 6b**). Tale procedura di purificazione è risultata essere la più efficiente tra quelle impiegate, e pertanto è stata scelta per ottenere la proteina in forma omogenea nelle successive preparazioni proteiche.

4.4. Dimerizzazione di Erbicina-HHP-RNasi

Allo scopo di indurre la dimerizzazione di Erbicina-HHP-RNasi mediante la formazione dei due ponti disolfurici intersubunità erano utilizzati vari metodi volti a favorire la riossidazione delle cisteine coinvolte, in posizione 31 e 32.

A tale scopo la proteina era incubata in miscele redox contenente differenti rapporti molari di glutatione ossidato (GSSG) e glutatione (GSH) pari a 3:1, 5:1, 10:1.

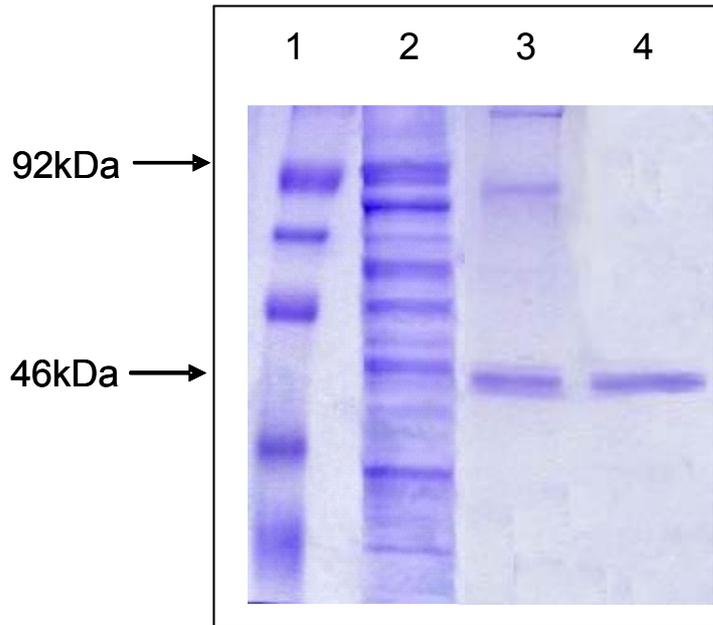


Figura 6a. Analisi mediante SDS-PAGE delle frazioni ottenute dalla cromatografia su resina TALON.

I campioni sono nel seguente ordine: proteine di peso molecolare noto (canale 1); l'estratto proteico in urea prima dell'incubazione con resina TALON (canale 2); frazione proteica eluita da resina TALON (canale 3); Erbicina-HP-RNasi utilizzata come riferimento (canale 4).

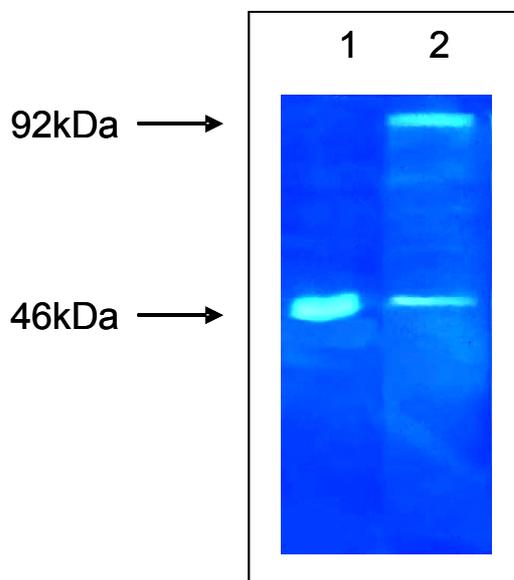


Figura 6b. Colorazione per attività ribonucleasica della frazione proteica eluita da resina TALON.

I campioni sono: Erbicina-HP-RNasi (canale 1); frazione proteica eluita da resina TALON (canale 2).

In parallelo, per una di tali miscele redox (GSH/GSSG 5:1 M/M), si procedeva alla dialisi in tampone PBS 1X, NaCl 0,16M e GSSG 1mM a 4°C per 24 ore. Una frazione proteica era incubata per 24 ore a 25°C all'aria ed in assenza di GSH e GSSG. I campioni erano poi analizzati mediante Western Blotting con l'anticorpo anti-His per rilevare la quantità di proteina dimerica formata. Come si può osservare dalla **figura 7a**, la maggior quantità di proteina dimerica (P.M. = 92kDa) era nella frazione incubata a 25°C per 24 ore. Nelle altre miscele la quantità di proteina dimerica era poco apprezzabile o assente. In conclusione, la miscela redox non favorisce la formazione di ponti disolfurici intersubunità, che si formano invece spontaneamente quando lasciati in ambiente ossidante.

Per verificare se un aumento della concentrazione proteica favorisse il processo di dimerizzazione, aliquote di Erbicina-HHP-RNasi erano concentrate per ultrafiltrazione 5 e 10 volte. Le aliquote concentrate erano poi analizzate mediante analisi per Western Blotting (**Figura 7b**). Da tale analisi si può osservare che l'aumento della concentrazione determina un significativo aumento della quota di proteina in forma dimerica. In particolare, la misura dell'intensità delle bande al *phosphorimager* ha indicato che la frazione proteica concentrata cinque volte era costituita dalla forma dimerica per il 70%, e che la percentuale di forma dimerica nella frazione concentrata 10 volte era maggiore del 90%.

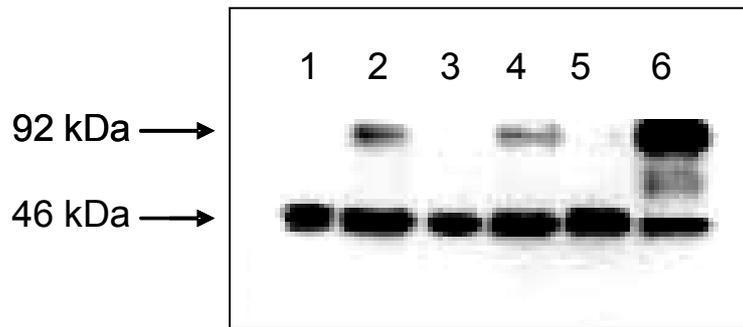


Figura 7a. Analisi della dimerizzazione di Erbicina-HHP-RNasi mediante immunorilevazione.

Erbicina-HP-RNasi, utilizzata come riferimento di peso molecolare è nel canale 1. Nei canali successivi è presente Erbicina-HHP-RNasi incubata nella miscela redox contenente GSH/GSSG nei seguenti rapporti molar: 5:1 (canale 2), 5:1 e dializzata contro tampone PBS contenente NaCl 0.16M e GSSG 1mM (canale 3), 3:1 (canale 4); 10:1 (canale 5), Erbicina-HHP-RNasi incubata a temperatura ambiente per 24 ore in assenza di glutatione (canale 6).

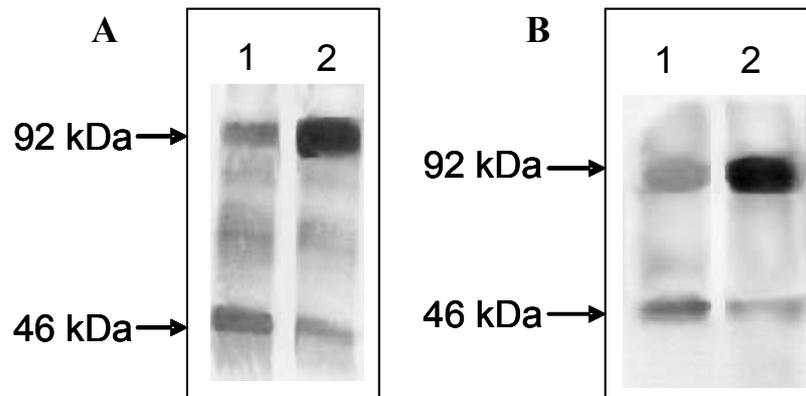


Figura 7b. Analisi dei campioni sottoposti ad ultrafiltrazione mediante immunorilevazione.

In figura A è riportata l'analisi del campione prima della concentrazione (canale 1) e dopo essere stato concentrato cinque volte mediante ultrafiltrazione (canale 2).

In figura B è riportata l'analisi del campione prima della concentrazione (canale 1) e dopo essere stato concentrato dieci volte con la stessa procedura (canale 2).

4.5. Caratterizzazione funzionale di Erbicina-HHP-RNasi.

4.5.1. Capacità di legame al recettore ErbB2

L'affinità di Erbicina-HHP-RNasi per il recettore ErbB2 era verificata mediante saggi ELISA, utilizzando cellule SKBR3, che iper-esprimono il recettore ErbB2. Tali cellule erano incubate per 1 ora e 30 minuti con Erbicina-HHP-RNasi o Erbicina-HP-RNasi a concentrazioni crescenti. Dopo opportuni lavaggi alle cellule, era aggiunto l'anticorpo specifico per la sequenza di polistidine coniugato alla perossidasi di rafano, che produce una reazione colorimetrica in presenza del substrato specifico.

I risultati ottenuti, riportati in grafico (**figura 8a**), indicano che la immunoRNasi dimerica lega le cellule ErbB2-positive con maggiore affinità rispetto alla immunoRNasi monomerica Erbicina-HP-RNasi, probabilmente grazie all'avidità che la struttura dimerica le conferisce.

4.5.2. Citotossicità su cellule tumorali ErbB2-positive

Una volta verificato che Erbicina-HHP-RNasi è enzimaticamente attiva ed in grado di legare le cellule ErbB2-positive, è stato possibile valutare la sua capacità di inibire la proliferazione delle cellule ErbB2-positive.

Come controllo, è stata impiegata la immunoRNasi monomerica Erbicina-HP-RNasi. Le cellule SKBR3 erano incubate in assenza o in presenza di concentrazioni crescenti di Erbicina-HHP-RNasi o Erbicina-HP-RNasi per 72 ore a 37°C. Al termine dell'incubazione le cellule erano staccate e contate come descritto nei Metodi.

I risultati di tali saggi riportati in grafico (**figura 8b**), indicano che Erbicina-HHP-RNasi ha un'attività citotossica più potente della immunoRNasi monomerica, soprattutto a basse concentrazioni.

Tale caratteristica è molto probabilmente dovuta al fatto che Erbicina-HHP-RNasi, in virtù della sua natura dimerica non può essere inibita dall'inibitore citosolico delle ribonucleasi, presente nel citosol, che invece è in grado di neutralizzare l'immunoRNasi monomericamente quando la sua concentrazione è insufficiente a saturare l'inibitore [22].

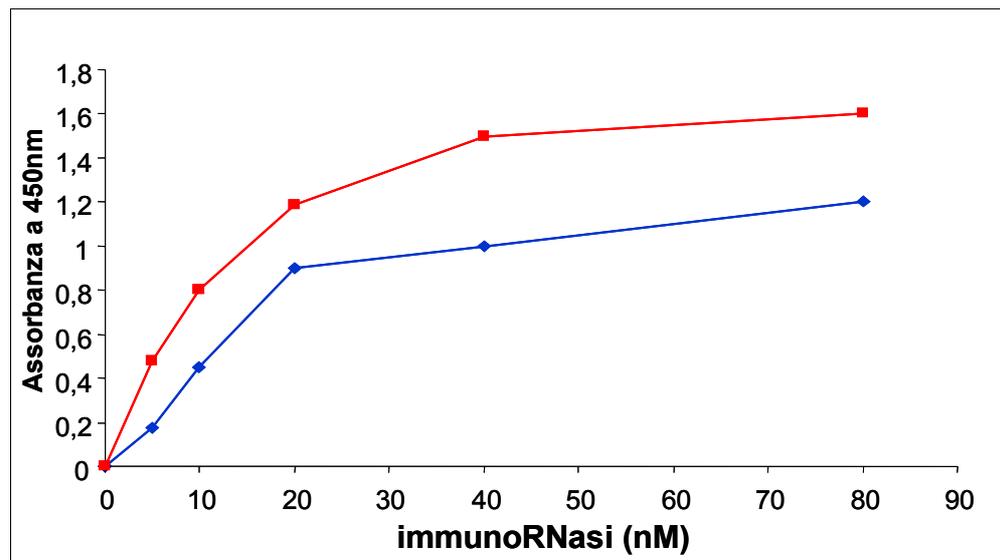


Figura 8a. Curve di legame ottenute mediante saggi ELISA. In rosso la curva di legame alle cellule SKBR3 della immunoRNasi dimerica, in blu quella della immunoRNasi monomericamente.

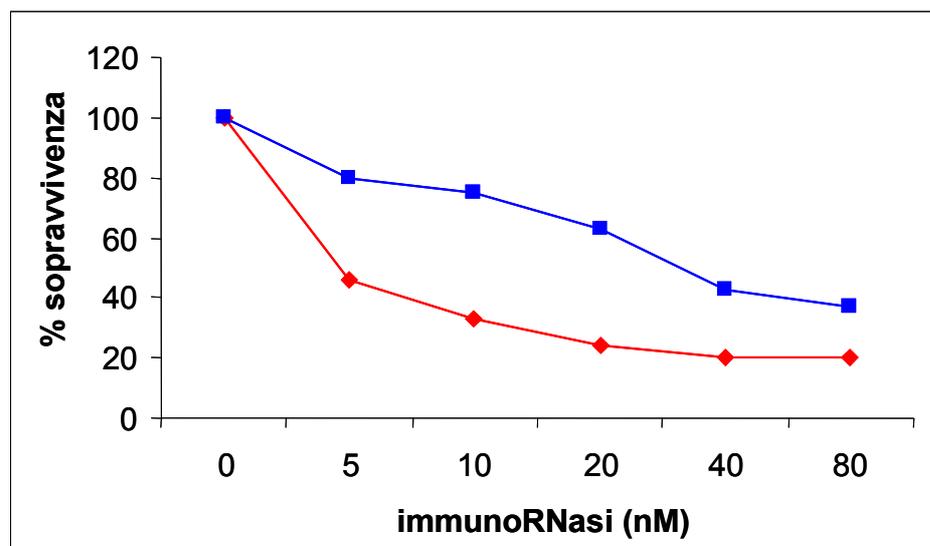


Figura 8b. Effetti di Erbicina-HHP-RNasi sulla sopravvivenza cellulare. In rosso è riportata la curva dose-effetto della immunoRNasi dimerica, in blu quella della immunoRNasi monomericamente.

4.6. Valutazione comparativa degli effetti di Erb-hcAb ed Herceptin su cellule cardiache *in vitro* e *in vivo*

4.6.1. Determinazione della capacità di Erb-hcAb e di Herceptin di riconoscere ErbB2 in cellule cardiache di ratto

Come già descritto nell'introduzione, uno dei problemi associati all'impiego terapeutico di Herceptin è rappresentato dal suo effetto cardiotossico.

Allo scopo di valutare se tali effetti di Herceptin potessero essere studiati *in vitro* su cellule cardiache di ratto, e paragonati a quelli di Erb-hcAb, è stato necessario verificare preventivamente che i due anticorpi avessero la capacità di riconoscere ErbB2 di ratto. Tali studi sono stati effettuati in collaborazione con il gruppo della Prof.ssa S. Hrelia del Dipartimento di Biochimica "G. Moruzzi" dell'Università "Alma Mater" di Bologna.

Per tali esperimenti erano utilizzati cardiomiociti neonatali e cardiomioblasti della linea cellulare H9c2, entrambi di ratto, e le cellule della linea TUBO, derivata da tumori sviluppati in topi transgenici per ErbB2 di ratto.

Per verificare la capacità degli anticorpi di legare tali cellule erano effettuati saggi ELISA. A tale scopo, le cellule H9C2, TUBO e i cardiomiociti neonatali, previamente cresciuti per una settimana, erano fissate alla piastra mediante trattamento con paraformaldeide. Le cellule erano quindi incubate per 1 ora e 30 minuti con gli anticorpi a concentrazioni crescenti, e successivamente lavate. Alle cellule era poi aggiunto l'anticorpo anti-Fc umano coniugato con la perossidasi di rafano che produce una reazione colorimetrica in presenza di un substrato specifico.

I risultati ottenuti con questo saggio, riportati in grafico (**Figura 9**), indicano che Herceptin e Erb-hcAb sono in grado di legare il recettore ErbB2 esposto su tali cellule con simile affinità.

Per una valutazione più accurata della capacità dei due anticorpi di legare specificamente il recettore ErbB2 di ratto, erano condotti degli esperimenti di immunoprecipitazione sui lisati di tali cellule. Aliquote di 2,5 mg di proteine da estratto cellulare di H9C2 e cardiomiociti neonatali erano pre-incubate con la resina Proteina-A agarosio per un ora a 4°C, procedura che si effettuava per prevenire legami aspecifici, e successivamente incubate con Herceptin, Erb-hcAb o con l'anticorpo commerciale specifico per ErbB2 di ratto Neu (C-18), utilizzato come controllo positivo, per 24 ore a 4°C in agitazione. Le miscele erano poi incubate con aliquote di Proteina-A agarosio per 1 ora a 4°C, e dopo ripetuti lavaggi, le proteine erano eluite, come descritto in materiali e metodi. Il campione proteico eluito era quindi analizzato mediante analisi di Western blotting con l'anticorpo Neu (C-18).

Come si osserva in **Figura 10**, in tutti i campioni si evidenzia una banda immunoreattiva corrispondente al peso molecolare del recettore ErbB2 (185kDa). Tale banda, come atteso, appare più intensa nel campione sottoposto a immunoprecipitazione con l'anticorpo Neu (C-18) specifico per ErbB2 di ratto, rispetto a quelli trattati con Herceptin e Erb-hcAb. Per questi ultimi tuttavia, l'intensità della banda è simile. Pertanto tali risultati indicano che entrambi gli anticorpi, Herceptin ed Erb-hcAb, riconoscono il recettore di ratto con affinità simile, anche se inferiore a quella dell'anticorpo Neu (C-18).

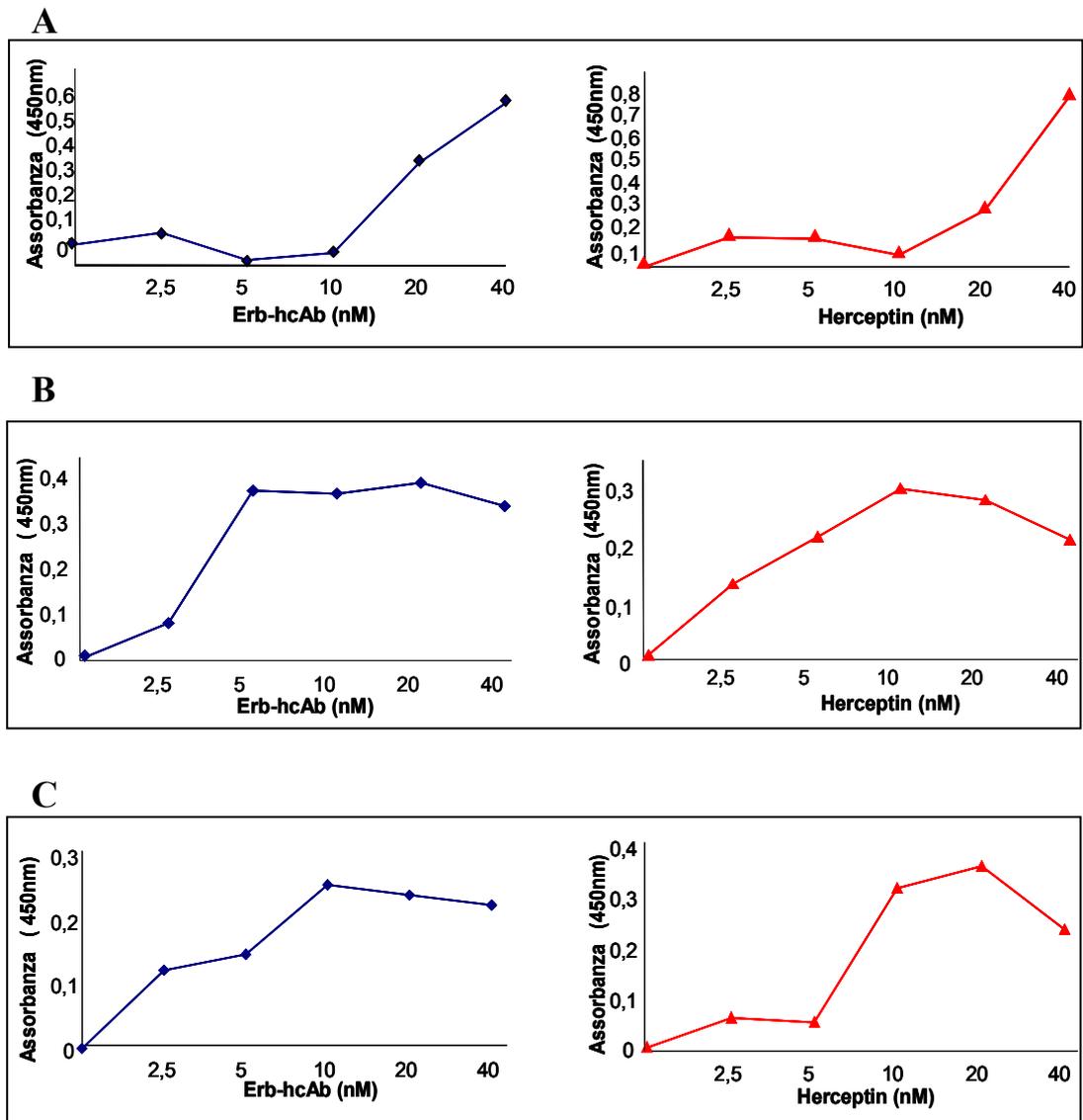


Figura 9. Curve di legame ottenute mediante saggi ELISA su cardiomiociti neonatali di ratto (A), cellule H9c2 (B) e TUBO (C), con Herceptin (▲) o con Erb-hcAb(◆).

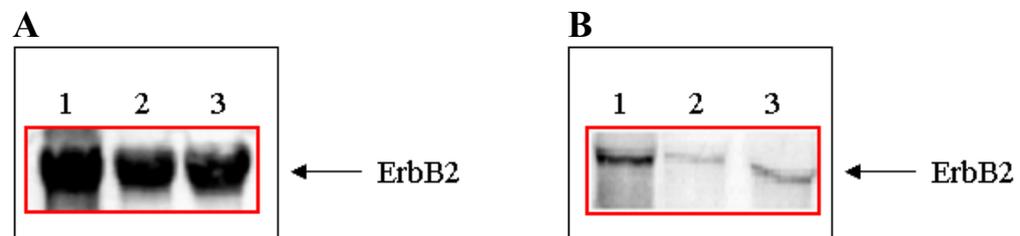


Figura 10: Analisi mediante immunorilevazione con anticorpo Neu (C-18) specifico per ErbB2 di ratto dei prodotti di immunoprecipitazione ottenuti rispettivamente con Neu (C-18) (canale 1), Herceptin (Canale 2) o Erb-hcAb (Canale 3), da estratti di cardiomiociti neonatali (A) o di cardiomioblasti H9c2 (B).

4.6.2. Effetti *in vitro* di Erb-hcAb e di Herceptin su cellule cardiache.

Una volta accertata la capacità degli anticorpi di riconoscere il recettore ErbB2 esposto sui cardiomiociti, è stato possibile valutare eventuali effetti cardiotossici di Erb-hcAb e di Erbicina-HP-RNasi *in vitro* su cellule cardiache, comparandoli con quelli di Herceptin. Per tali studi, i cardiomiociti neonatali di ratto e i cardiomioblasti H9C2 erano incubati per 24 ore a 37°C, in assenza o in presenza di concentrazioni crescenti di Erb-hcAb, di Erbicina-HP-RNasi e di Herceptin. Come controllo positivo era utilizzata la doxorubicina alla concentrazione di 1µM. Al termine del trattamento la vitalità cellulare era misurata mediante saggio MTT. I risultati ottenuti, riportati in **Figura 11 e 12**, indicano che Erb-hcAb e Erbicina-HP-RNasi non hanno effetti tossici né sui cardiomiociti neonatali né sui cardiomioblasti. Al contrario, Herceptin manifesta effetti cardiotossici significativi su entrambe le linee cellulari.

4.6.3. Effetti di Herceptin ed Erb-hcAb sull'apoptosi delle cellule cardiache.

Per verificare se alla base della differente tossicità degli anticorpi vi fosse una loro differente capacità di indurre apoptosi, le cellule H9c2 erano incubate con Herceptin o Erb-hcAb per intervalli di tempo crescenti. Le cellule erano poi lavate e lisate, ed aliquote equivalenti degli estratti erano sottoposte ad analisi di Western Blotting, con i seguenti anticorpi: uno capace di riconoscere la caspasi3 sia nella forma nativa sia nella forma attiva proteolizzata (caspasi3 p20), e l'altro specifico per Bcl-X_L. Entrambe queste proteine giocano un ruolo chiave nell'apoptosi, ed i loro livelli erano risultati alterati in cellule trattate con altri anticorpi anti-ErbB2 [34].

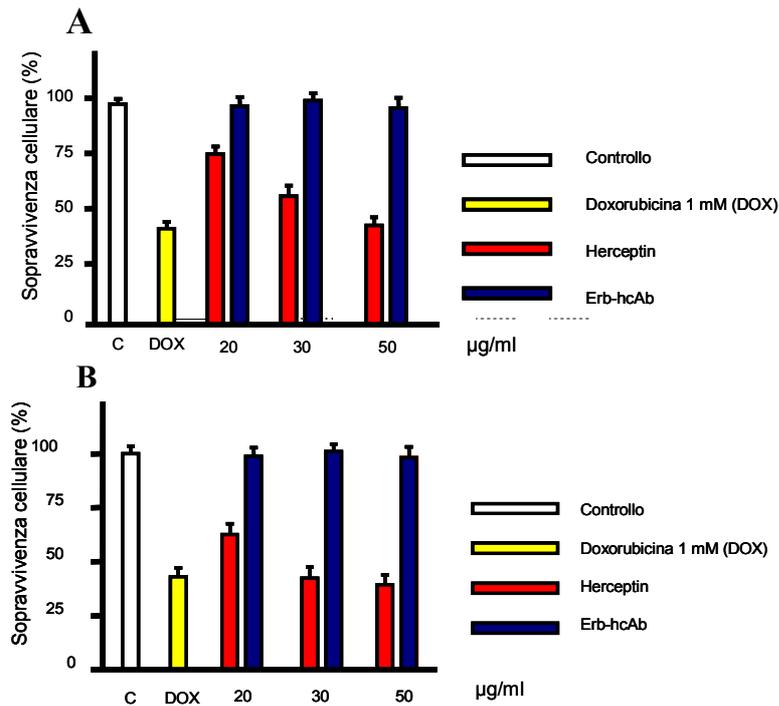


Figura 11: Effetti *in vitro* di Erb-hcAb, Herceptin e Doxorubicina sulla sopravvivenza cellulare di cardiomiociti neonatali (A) e di cardiomioblasti della linea H9c2 (B).

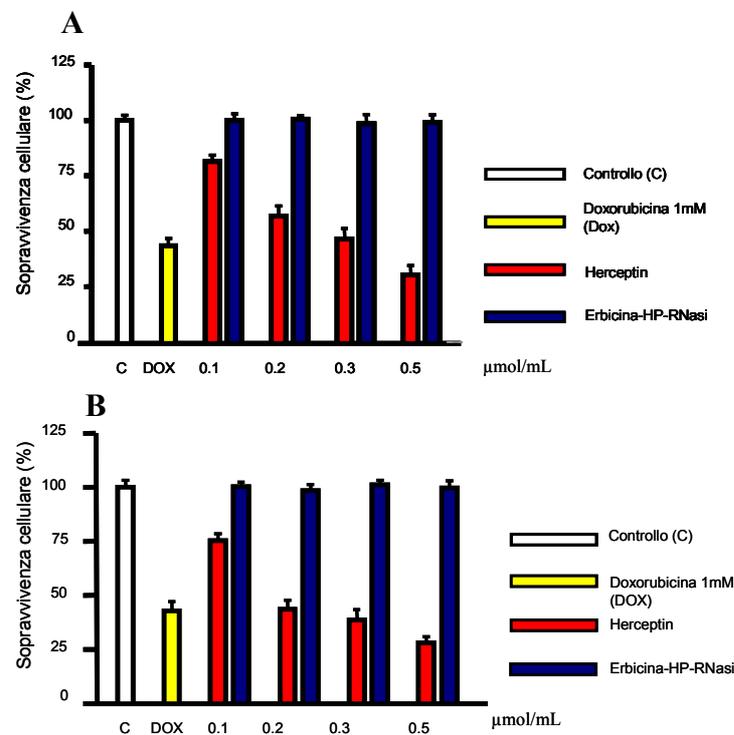


Figura 12: Effetti *in vitro* di Erbicina-HP-RNasi, Herceptin e Doxorubicina sulla sopravvivenza cellulare di cardiomiociti neonatali (A) e di cardiomioblasti della linea H9c2 (B).

Per la normalizzazione dei diversi campioni era condotta in parallelo anche l'analisi con un anticorpo anti-actina.

In **figura 13**, è possibile osservare i risultati: Herceptin induce un lieve incremento del livello di caspasi3 ed un forte aumento della forma p20 nelle cellule trattate, mentre Erb-hcAb non mostra effetti né sul livello della caspasi 3 nativa, né su quello della forma attivata p20. I livelli di Bcl-XL, più difficili da misurare a causa della bassa intensità del segnale, sembrano più alti nelle cellule trattate con Erb-hcAb, e lievemente ridotti in quelle trattate con Herceptin.

Questi risultati indicano un diverso meccanismo d'azione dei due anticorpi, che potrebbe rendere conto del loro diverso effetto cardiotossico. Infatti Erb-hcAb, a differenza di Herceptin, non provoca l'attivazione della caspasi 3 e la conseguente apoptosi delle cellule cardiache, al contrario induce un sorprendente aumento dei livelli di Bcl-X_L, una proteina anti-apoptotica.

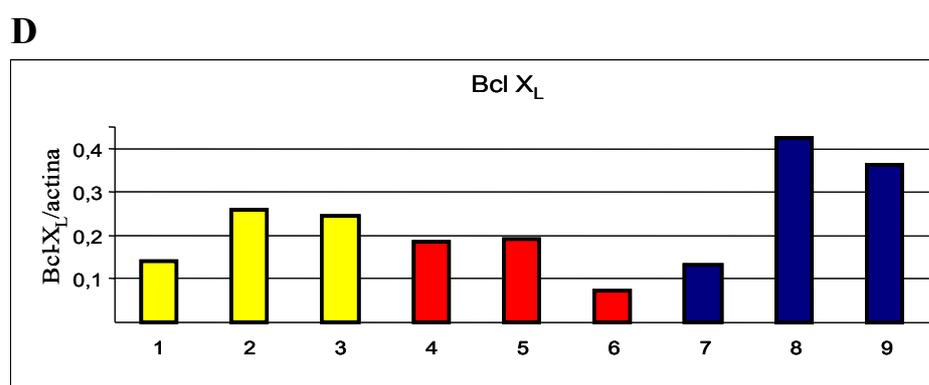
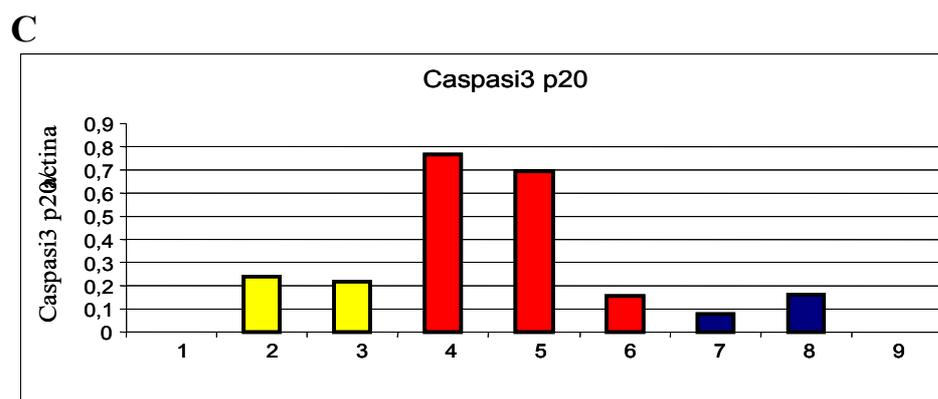
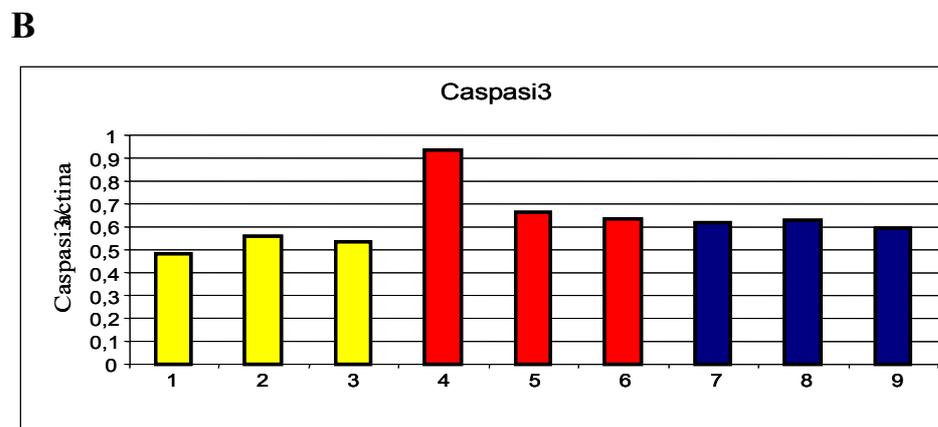
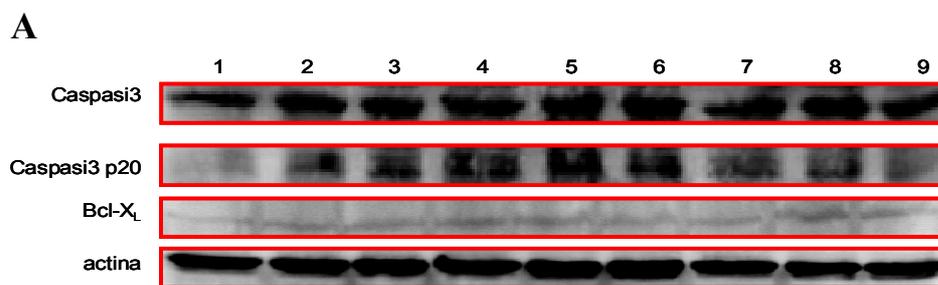


Figura 13: Analisi mediante immunorilevazione (A) dei lisati di cellule H9c2 trattate per 24, 48 e 72 ore in assenza (rispettivamente nei canali 1-3), o in presenza di Herceptin (canali 4-6) o di Erb-hcAb (canali 7-9). Nei grafici (pannelli B, C e D) sono riportati i valori ottenuti in assenza (giallo) o in presenza di Herceptin (rosso) e di Erb-hcAb (blu), mediante misura di intensità delle bande con un *phosphorimager*, e successiva normalizzazione con i segnali dell'actina.

5. CONCLUSIONI

Il presente lavoro di tesi era finalizzato alla costruzione di una ImmunoRNasi dimerica umana resistente all'azione dell'inibitore citosolico delle ribonucleasi (cRI) e pertanto dotata, rispetto alla immunoRNasi monomerica, di maggiore potenziale citotossico e avidità di legame al recettore grazie alla presenza di due molecole di scFv, ognuna legata ad una delle due subunità della RNasi dimerica.

Tale proteina, chiamata Erbicina-HHP-RNasi, è stata ottenuta mediante fusione del frammento anticorpale scFv Erbicina specifico per il recettore ErbB2, un noto antigene tumorale (TAA, tumour associated antigen), con la variante dimerica della ribonucleasi pancreatica umana (HHP2 RNasi).

Tale proteina ricombinante è stata espressa in tre diversi ceppi cellulari ed in diverse condizioni di crescita, ciò che ha consentito di individuare le condizioni ottimali per la produzione della proteina ricombinante. E' stata quindi messa a punto una procedura di purificazione che ha premesso l'isolamento della proteina in forma omogenea.

La proteina isolata, pur essendo monomerica, mostrava una naturale tendenza ad organizzarsi nella forma dimerica. Per favorire tale processo di dimerizzazione erano seguite diverse strategie, tra le quali quella che dava i risultati più soddisfacenti, è risultata essere la concentrazione del campione mediante ultrafiltrazione. L'aumento della concentrazione proteica determinava un significativo aumento della percentuale di dimero nella miscela proteica.

La proteina ricombinante dimerica ottenuta è risultata capace di legare le cellule ErbB2-positive con maggiore avidità rispetto alla immunoRNasi monomerica, probabilmente grazie alla sua struttura dimerica e conseguente

natura bivalente. Erbicina-HHP-RNasi ha inoltre mostrato avere anche un'attività citotossica più potente di Erbicina-HP-RNasi a basse concentrazioni. Tale risultato è dovuto probabilmente al fatto che Erbicina-HHP-RNasi, in virtù della sua struttura dimerica, non è inibita dall'inibitore citosolico delle ribonucleasi, al contrario di Erbicina-HP-RNasi.

Si può pertanto ritenere che tale proteina possa risultare utile in applicazioni terapeutiche consentendo di ridurre le dosi richieste per ottenere la massima efficacia.

Inoltre nel lavoro di tesi sono state analizzate alcune caratteristiche funzionali di Erb-hcAb, un anticorpo antitumorale interamente umano, prodotto nel nostro laboratorio mediante fusione di Erbicina con il frammento Fc umano di una IgG1, al fine di verificare se Erb-hcAb è privo degli effetti cardiotossici mostrati da Herceptin.

I risultati ottenuti utilizzando come sistema di studio *in vitro* con cardiomiociti di ratto e cardiomioblasti, permettono di affermare che Erb-hcAb non manifesta effetto cardiotossico, al contrario di Herceptin. Inoltre è stato possibile dimostrare che alla base della differenza di tossicità tra i due anticorpi vi è una differente capacità di indurre apoptosi nelle cellule cardiache. Nelle cellule trattate con Herceptin aumentavano i livelli intracellulari della forma attiva della caspasi3 e diminuivano i livelli di Bcl-X_L, in linea con i risultati già riportati in letteratura [34]. Al contrario, nelle cellule trattate con Erb-hcAb non si osservava né un aumento dei livelli intracellulari della forma attiva della caspasi3 né la riduzione di quelli di Bcl-X_L, per i quali si verificavano sorprendenti aumenti.

Tuttavia è possibile affermare che Herceptin è tossico per le cellule cardiache a causa dell'attivazione della trasduzione di segnali pro-apoptotici e inibizione di quelli anti-apoptotici, mentre Erb-hcAb, che riconosce un epitopo diverso [20], sembra mostrare effetti contrari.

Tali risultati indicano quindi che Erb-hcAb potrebbe avere un elevato potenziale terapeutico consentendo di superare i problemi di cardiotoxicità legati all'impiego di Herceptin.

6. BIBLIOGRAFIA

1. World Cancer Report – World Health Organization (2006), Edited by Bernard W. Stuart and Paul Kleiheus.
2. Waldmann, T.A. and Morris, J.C., (2006) “Development of antibodies and chimeric molecules for cancer immunotherapy” *Adv. Immunol.* **90**,83–131.
3. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, Seeburg PH, Libermann TA, Schlessinger J, Francke U,(1985) “Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene” *Science.* **230**,1132-1139.
4. King CR, Kraus MH, Aaronson SA., (1985) “Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma” *Science.* **229**, 974-976
5. Hynes NE, and Stern DF., (1994). “The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer” *Biochem Biophys Acta Rev Cancer* **1198**, 165-184
6. Pauletti G, Godolphin W, Press MF, Slamon DJ., (1996) “Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization” *Oncogene* **13**,63-72
7. Alroy I. and Yarden Y. (1997) “The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions.” *FEBS Lett.* **410**,83-86.
8. Karunagaran D, Tzahar E, Beerli RR, Chen X, Graus-Porta D, Ratzkin BJ, Seger R, Hynes NE, Yarden Y., (1996) “ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer.” *EMBO J* **15**,254-264.
9. Sliwkowski MX, Schaefer G, Akita RW, Lofgren JA, Fitzpatrick VD, Nuijens A, Fendly BM, Cerione RA, Vandlen RL, Carraway KL, (1994)

“Coexpression of erbB2 and erbB3 proteins reconstitutes a high affinity receptor for heregulin.” *J Biol Chem* **269**,14661-14665.

10. Pinkas-Kramarski R, Soussan L, Waterman H, Levkowitz G, Alroy I, Klapper L, Lavi S, Seger R, Ratzkin BJ, Sela M, Yarden Y. (1996) “Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions.” *EMBO J* **15**,2452-2467.

11. Baulida J, Kraus MH, Alimandi M, Di Fiore PP, Carpenter G. (1996) “All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired.” *J Biol Chem* **271**,5251-5257.

12. Klapper LN, Vaisman N, Hurwitz E, Pinkas-Kramarski R, Yarden Y, Sela M.,(1997) “A subclass of tumor-inhibitory monoclonal antibodies to ErbB-2/HER2 blocks crosstalk with growth factor receptors.” *Oncogene* **14**,1140-1145

13. Holbro T, Hynes NE.,(2004) “ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life.” *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **44**:195-217.

14. Mayer, D. and Birchmeier C., (1995) “Multiple essential functions of neuregulin in development.” *Nature* **378**, 386-390

15. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. (2001) “Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2.” *N.Engl.J.Med.* **344**, 783-792.

16. Kuus-Reichel K, Grauer LS, Karavodin LM, Knott C, Krusemeier M, Kay NE.(1994) “Will immunogenicity limit the use, efficacy, and future development of therapeutic monoclonal antibodies?” *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **1**,365-372.

17. De Lorenzo C, Tedesco A, Terrazzano G, Cozzolino R, Laccetti P, Piccoli R, D'Alessio G., (2004) "A human, compact, fully functional anti-ErbB2 antibody as a novel antitumour agent." *Br J cancer* **91**,1200-1204.
18. De Lorenzo C, Palmer DB, Piccoli R, Ritter MA, D'Alessio G. (2002) "A new human antitumor immunoreagent specific for ErbB2." *Clin Cancer Res* **8**,1710-1719.
19. De Lorenzo C, Cozzolino R, Carpentieri A, Pucci P, Laccetti P, D'Alessio G. (2005) "Biological properties of a human compact anti-ErbB2 antibody" *Carcinogenesis* **26**,1890-1895.
20. De Lorenzo C, Troise F, Cafaro V, D'Alessio G., (2007) "Combinatorial experimental protocols for Erbicin-derived immunoagents and Herceptin." *Br J cancer* in press.
21. Schneider JW, Chang AY, Rocco TP., (2001) "Cardiotoxicity in signal transduction therapeutics: erbB2 antibodies and the heart." *Seminars in Oncology* **28**,18-26.
22. Cardoso F, Piccart MJ, Durbecq V, Di Leo A.(2002) "Resistance to trastuzumab: a necessary evil or a temporary challenge?" *Clin Breast Cancer* **3**,247-57
23. Nahta R, Esteva FJ., "Herceptin: mechanisms of action and resistance." *Cancer Letter* 2006 **232**,123-138.
24. Nagy P, Friedlander E, Tanner M, Kapanen AI, Carraway KL, Isola J, Jovin TM., (2005) "Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line." *Cancer Res.* **65**,473-482.

25. De Lorenzo C, Arciello A, Cozzolino R, Palmer DB, Laccetti P, Piccoli R, D'Alessio G., (2004) "A fully human antitumor immunoRNase selective for ErbB-2-positive carcinomas." *Cancer Research* **64**,4870-4874.
26. De Lorenzo C, Di Malta C, Cali G, Troise F, Nitsch L, D'Alessio G, (2007) "Intracellular route and mechanism of action of ERB-hRNase, a human anti-ErbB2 anticancer immunoagent." *FEBS Letters* **581**,296–300.
27. Piccoli R, Di Gaetano S, De Lorenzo C, Grauso M, Monaco C, Spalletti-Cernia D, Laccetti P, Cinatl J, Matousek J, D'Alessio G., (1999) "A dimeric mutant of human pancreatic ribonuclease with selective cytotoxicity toward malignant cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**,7768-7773.
28. Chlopcikova S. Psotova J. Miketova P. "Neonatal rat cardiomyocytes-a model for the study of morphological, biochemical and electrophysiological characteristics of the heart", (2001) *Biomed Papers* **145**,49-55.
29. Sambrook K.J. et al., (1989) *Molecular cloning* **3**,A2.2
30. Sambrook K.J. et al., (1989) *Molecular cloning* **3**,A2.3
31. Laemmli U.K. (1970) *Nature* **227**,680-685 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
32. Opitz JG, Ciglic MI, Haugg M, Trautwein-Fritz K, Raillard SA, Jermann TM, Benner SA., (1998) "Origin of the catalytic activity of bovine seminal ribonuclease against double-stranded RNA." *Biochemistry* **37**,4023-4033.
33. Cafaro V, De Lorenzo C, Piccoli R, Bracale A, Mastronicola MR, Di Donato A, D'Alessio G. (1995) "The antitumor action of seminal ribonuclease and its quaternary conformations" *FEBS Lett.* **359**,31-34.
34. Force T, Krause DS, Van Etten RA. (2007) "Molecular mechanisms of cardiotoxicity of tyrosine kinase inhibition." *Nature Reviews.* **7**,332-344.