

Università degli Studi del Piemonte Orientale

“Amedeo Avogadro”

Dipartimento di Scienze Mediche



**Dottorato di Ricerca
in
Medicina Molecolare**

Ciclo XXIII

**Sviluppo di un kit diagnostico per l'infezione da HBV
e di nuovi approcci molecolari per la modulazione
della funzione endoteliale e piastrinica**

Dott. Chiara Sarasso

Tutor: Dott. Annalisa Chiocchetti

Coordinatore: Prof. Umberto Dianzani

Indice

1. SVILUPPO DI UN KIT DIAGNOSTICO PER L'INFEZIONE DA HBV	4
1.1 INTRODUZIONE	4
1.1.1 EPIDEMIOLOGIA DELL'EPATITE B	4
1.1.2 VIE DI TRASMISSIONE	6
1.1.3 PREVENZIONE	7
1.1.4 I MARCATORI SIEROLOGICI DELL'INFEZIONE DA HBV	8
1.1.5 IL VIRUS DELL'EPATITE B	10
1.1.6 VARIABILITA' GENETICA	19
1.2 SCOPO DEL LAVORO	23
1.3 MATERIALI E METODI	25
1.3.1 FUNZIONAMENTO DELLO STRUMENTO LIAISON	25
1.3.2 REAGENTI UTILIZZATI NEL NUOVO KIT LIAISON	28
1.3.3 PRINCIPIO DELLA PROCEDURA	29
1.3.4 CLONAGGIO DI 10 MUTANTI HBSAG	30
1.4 RISULTATI	34
1.4.1 VALUTAZIONE DELLA CAPACITÀ DI LEGAME DEGLI ANTICORPI	36
1.4.2 VALUTAZIONE DELLA STABILITÀ DELLA FASE SOLIDA (CO-COATING)	39
1.4.3 CONSEGUIMENTO DEL MARCHIO CE	40
1.4.4 SUBCLONAGGIO DEL CDNA CODIFICANTE 10 DIVERSI MUTANTI DELL'HBSAG IN UN VETTORE DI ESPRESSIONE EUCARIOTICA	59
1.4.5 VALIDAZIONE DEL KIT LIAISON XL RISPETTO AL PANNELLO DI MUTANTI RICOMBINANTI	68
1.5 DISCUSSIONE	69
1.6 ALLEGATO 1	73
1.7 ALLEGATO 2	90
1.8 ALLEGATO 3	92
1.9 ALLEGATO 4	95
1.10 ALLEGATO 5	99
1.11 BIBLIOGRAFIA	103
2. LA STIMOLAZIONE DI B7H INIBISCE L'ADESIVITÀ DI CELLULE ENDOTELIALI VASCOLARI NEI CONFRONTI DI LINEE CELLULARI TUMORALI E POLIMORFONUCLEATI DI SANGUE PERIFERICO	107
2.1 INTRODUZIONE	107
2.1.1 L'ENDOTELIO NELLA RISPOSTA INFIAMMATOIA	107
2.1.2 LA MOLECOLA COSTIMOLATORIA H4/ICOS	110
2.2 SCOPO DEL LAVORO	113
2.3 ALLEGATO 6	114
2.4 BIBLIOGRAFIA	125

3. L'ENDOCANNABINOIDE 2-ARACHIDONOILGLICEROLO ATTIVA PIASTRINE UMANE ATTRAVERSO RECETTORI DI TIPO NON-CB1/CB2.....	129
3.1 INTRODUZIONE	129
3.2 SCOPO DEL LAVORO	136
3.3 ALLEGATO 7	137
3.4 BIBLIOGRAFIA	146
4. PUBBLICAZIONI	154

1. SVILUPPO DI UN KIT DIAGNOSTICO PER L'INFEZIONE DA HBV

1.1 INTRODUZIONE

1.1.1 EPIDEMIOLOGIA DELL'EPATITE B

L'Epatite B è una delle infezioni più comuni, ci sono infatti circa 400 milioni di portatori al mondo. Ogni anno un milione di persone muore per epatite cronica, cirrosi, epatocarcinoma, tutte patologie correlate a questa infezione. Si stima che approssimativamente 400.000 nuovi casi vengano diagnosticati ogni anno solo in America Latina.[1] La prevalenza dei portatori di Epatite B nella popolazione adulta apparentemente sana varia nelle diverse aree geografiche. Per questo motivo il mondo è stato suddiviso in tre zone in base alla prevalenza dell'infezione:

- **Regioni iperendemiche**, in cui l'infezione è praticamente universale: Sud-Est Asiatico (compresa la Cina), Pacifico Occidentale e Africa subsahariana. In queste zone il sovraffollamento nei singoli nuclei familiari e nelle comunità, la promiscuità e l'inosservanza delle più elementari norme igienico-sanitarie favoriscono la diffusione dell'infezione sia orizzontale, da soggetto malato a sano, sia verticale o perinatale, da madre a figlio. La percentuale di portatori in tali popolazioni è maggiore dell'8% (in rosso nella figura).
- **Regioni ad endemia intermedia** quali Nord Africa, Medio Oriente, parte dell'Europa meridionale ed orientale e Sud America con prevalenza di portatori di HBsAg variabile dal 2 al 7% della popolazione generale (in giallo nella figura).
- **Regioni a bassa prevalenza** che comprendono il nord Europa, la maggior parte dei paesi dell'Europa occidentale, gli Stati Uniti, il Canada, l'Australia e la Nuova Zelanda. In queste aree meno del 10% della popolazione generale ha evidenza sierologica di infezione da HBV e il tasso di portatori è pari o inferiore al 2%. Anche in questi paesi tuttavia, la prevalenza di infezione e di portatori può variare considerevolmente in base alle abitudini sociali, voluttuarie e sessuali

nonché in base ai gruppi etnici e ai movimenti migratori (in verde nella figura) .[2]



Fig. 1 Distribuzione dell'infezione da HBV nel mondo.

In particolare in Europa uno studio di sieroprevalenza ha permesso di tracciare una dettagliata mappa geografica sulla reale diffusione dell'infezione da HBV nei diversi paesi. L'analisi dell'insieme dei dati raccolti ha portato a suddividere l'Europa in tre pattern epidemiologici distinti:

- un primo rilevabile nei paesi scandinavi e nel Regno Unito si caratterizza per i bassissimi livelli di sieroprevalenza con una percentuale di portatori di HBsAg inferiore allo 0,1% e di marcatori globali d'infezione al di sotto del 5%;
- un secondo osservabile in molti paesi dell'Ovest europeo (quali la Francia, l'allora Repubblica Federale Tedesca e i Paesi Bassi) con percentuali di prevalenza del HBsAg variabili dallo 0,1 allo 0,5% e percentuali globali di marcatori dal 5 al 10%;
- un terzo riscontrabile in tutti i paesi del bacino del mediterraneo e dell'Est europeo, ove la percentuale di sieroprevalenza per l'HBsAg oscilla dall'1 al 5% e quelle globali d'infezione dal 10 al 20%.

L'Italia, paese ad endemia intermedia, si colloca in questa terza fascia con una prevalenza, nella popolazione generale, per uno o più marcatori di infezione da HBV, intorno al 20% ed una positività media per HBsAg del 3% (oscillazioni dallo 0,5% nelle regioni del Nord, al 5% nel Sud). [3]

Alla fine degli anni ottanta è stato condotto in Italia uno studio di sieroprevalenza su una popolazione di 65000 gestanti, uniformemente distribuite nel territorio nazionale. Secondo questa indagine, la prevalenza media del HBsAg è risultata del 2,4%, ma con una distribuzione alquanto disomogenea nelle diverse regioni: da percentuali bassissime, dello 0,5%, rilevate nel Trentino-Alto Adige, a percentuali del 5,2% in Sardegna e Campania e del 5,6%, in Puglia. Queste differenze si possono verosimilmente attribuire alle diverse abitudini di vita e alle più o meno precarie condizioni socio-sanitarie nel Centro-Sud Italia, rispetto al Nord. Sacche iperendemiche, con sieroprevalenza per HBsAg superiore al 7%, e talora sino al 10%, sono state riscontrate in alcune aree urbane del napoletano ad altissima densità di popolazione, così come in aree urbane del Nord-Italia, in particolare nelle province di Bergamo e Brescia.[4]

Se fino alla metà degli anni '80 l'infezione da HBV costituiva il più frequente fattore eziologico delle epatiti croniche, nell'ultimo decennio le migliorate condizioni socio-economiche ed igienico-sanitarie, il calo della natalità (con il conseguente minore affollamento delle aule scolastiche e dei nuclei familiari), l'utilizzo sempre più diffuso delle siringhe a perdere, hanno

progressivamente e considerevolmente modificato l'impatto dell'infezione da HBV nell'eziologia delle epatopatie croniche in Italia. Nell'ultimo quinquennio in Italia la percentuale di epatopatie croniche attribuibili ad infezione da HBV è ulteriormente scesa sino a livelli del 13,7%. [5]

1.1.2 VIE DI TRASMISSIONE

L'HBV si trasmette per via parenterale apparente o inapparente. Il contagio avviene per via percutanea o tramite il contatto diretto con le mucose, per la presenza del virus nei liquidi biologici di una persona infetta (questo vale sia per l'infezione cronica sia per la forma acuta). Il rischio di contrarre l'epatite è direttamente proporzionale alla quantità del liquido infetto che entra in circolo e al livello di contagiosità del portatore dell'HBV che funge da serbatoio dell'infezione. Tra le complessità che contraddistinguono il virus e la malattia esiste anche la variabilità della carica virale, che nei portatori dell'antigene HBsAg oscilla da un minimo di dieci virioni/ml al massimo di un miliardo di virioni/ml. Le più elevate concentrazioni del virus si registrano nel sangue, nei suoi derivati e nei fluidi sierosi, mentre nel seme, nel fluido vaginale e nella saliva sono decisamente più basse. Il sangue e i rapporti sessuali rappresentano quindi i modelli più efficienti di trasmissione del contagio. Seppure in bassissime concentrazioni l'antigene di superficie dell'HBV (HBsAg) è stato individuato anche in fluidi organici come le lacrime, il sudore, le urine, le feci, il colostro, il liquido cerebrospinale e sinoviale, i quali non sono stati però associati ad un reale rischio di trasmissione dell'infezione. Le principali vie di contagio per l'HBV sono quindi rappresentate da trasfusioni di sangue e suoi derivati, rapporti sessuali non protetti, trapianti di organi e tessuti, uso di siringhe e aghi contaminati, impiego di apparecchiature e strumenti sanitari non sterilizzati, trasmissione verticale. La trasmissione verticale è estremamente frequente nelle aree geografiche ad elevata endemia, così come la possibilità che il contagio venga trasmesso dalla puntura di insetti riguarda essenzialmente le zone tropicali e si può comunque considerare piuttosto remota. Le categorie particolarmente esposte al rischio di infezione da HBV sono pertanto i tossicodipendenti, i politrasfusi, gli emodializzati, gli omosessuali maschi, gli operatori sanitari.

I mutamenti sociali che stanno avvenendo nel nostro paese e una serie di abitudini e mode sembrano aver aumentato il propagarsi del contagio da HBV. Per cambiamenti sociali si intendono le numerose migrazioni dai paesi in cui l'HBV ha un andamento endemico, oppure i sempre più frequenti viaggi di svago in zone esotiche spesso appartenenti alla fascia dei paesi in cui è più elevato il rischio di contrarre il virus. Le abitudini considerate "pericolose" sono senza dubbio i rapporti sessuali promiscui, dal momento che l'epatite B va considerata una delle

malattie sessualmente trasmesse più diffuse, ma non sono da meno nuove mode sempre più diffuse quali tatuaggi e piercing.[6]

1.1.3 PREVENZIONE

L'allestimento di vaccini per la prevenzione dell'infezione da HBV rappresenta una delle principali conquiste della medicina moderna.

Esistono diversi tipi di vaccino:

- vaccini a base di HBsAg (Antigene di Superficie);
- vaccini contenenti l'HBsAg e gli Antigeni S e pre S;
- vaccini preparati con la tecnica del DNA ricombinante.[7,8]

Per la prima vaccinazione si consiglia di fare 3 inoculazioni per via intramuscolare, distanziate di 1 mese l'una dall'altra. Un primo richiamo a distanza di 1 anno dalla prima iniezione e successivamente un richiamo ogni 5 anni.

Per il vaccino ricombinante la distanza ottimale tra le dosi è: 0-1-6 mesi e non sono necessari i richiami.

In Italia la vaccinazione del neonato è obbligatoria (Legge n 165 del 27 maggio 1991) e va fatta, per i nati da madri HBsAg negative al 3°-5°-11° mese di vita contemporaneamente alle altre vaccinazioni obbligatorie (antidifterica, antitetanica, antipolio). Inoltre la vaccinazione anti-epatite B è obbligatoria anche per tutti gli adolescenti nel corso del 12° anno di vita (limitatamente ai 12 anni successivi all'entrata in vigore della legge). Infine è obbligatorio per legge lo screening per HBsAg di tutte le gravide nel corso del 3° trimestre di gestazione. Il vaccino è comunque consigliato ai gruppi ad alto rischio quali: individui sessualmente attivi con più di un partner sessuale in 6 mesi, maschi omosessuali o bisessuali, soggetti afferenti a centri per malattie sessualmente trasmesse, partner sessuali o contatti familiari di soggetti HBsAg positivi, tossicodipendenti per via endovenosa, pazienti affetti da coagulopatie/emopatie che necessitano di frequenti trasfusioni di sangue, emoderivati o fattori della coagulazione, emodializzati, soggetti che risiedono o lavorano in istituzioni per malati mentali o istituti di contenzione, operatori sanitari, soggetti che hanno in programma di risiedere per più di 6 mesi in aree ad endemia elevata.[9]

Il vaccino anti-HBV è sicuro ed efficace e induce la produzione di anticorpi diretti contro l'antigene di superficie (anti-HBs), che rappresentano gli anticorpi neutralizzanti protettivi. Si ritiene protettivo un titolo di anti-HBs ≥ 10 mIU/ml.[10] Questo titolo anticorpale si osserva di solito in più del 95% dei soggetti vaccinati. L'immunogenicità è ridotta negli individui che hanno

più di 40 anni e negli immunocompromessi. In presenza di non responsività al vaccino, si consiglia la rivaccinazione con 3 ulteriori dosi di vaccino. In questi casi, di solito, circa la metà dei pazienti sieroconverte, nei restanti casi non c'è nessuna indicazione a ripetere un nuovo ciclo vaccinale, ma si può tentare di indurre una risposta somministrando il vaccino con un adiuvante specifico di derivazione T linfocitaria ovvero in concomitanza con immunoglobuline specifiche (HBIg) o con immunostimolanti. Generalmente la persistenza di anti-HBs dopo la vaccinazione correla con l'entità del titolo anticorpale raggiunto dopo l'ultima dose di vaccino. L'anti-HBs scompare in un certo numero di soggetti vaccinati dopo 10 anni dal vaccino, ma l'immunità sembra persistere ancora per molti anni. [11]

1.1.4 I MARCATORI SIEROLOGICI dell'INFEZIONE da HBV

HBsAg e anti-HBs

L'HBsAg è l'indicatore sierologico più importante dell'infezione da HBV. Può essere rilevato nel siero di pazienti affetti da epatite B da 6 a 16 settimane dal contagio e di solito precede di 1-7 settimane l'aumento delle transaminasi e degli eventuali sintomi. L'HBsAg di solito diventa non determinabile dopo 4-6 mesi nei pazienti che vanno incontro a guarigione spontanea, mentre la sua persistenza per più di 6 mesi indica l'evoluzione verso una forma di infezione cronica. La scomparsa dell'HBsAg è seguita dalla comparsa del relativo anticorpo (anti-HBs). Nella maggior parte dei pazienti, l'anti-HBs persiste per anni o per tutta la vita, conferendo un'immunità a lungo termine. Alcuni pazienti, tuttavia, presentano il cosiddetto "periodo finestra" che corrisponde al periodo in cui l'HBsAg si negativizza, ma l'anti-HBs non è ancora determinabile in circolo. In questa fase il paziente non ha né l'antigene s, né l'anticorpo e quindi la diagnosi di infezione da HBV si basa sulla ricerca degli anticorpi anti antigene core di classe IgM (anti-HBc IgM). Circa il 25% dei soggetti infetti presenta nel siero sia HBsAg che anti-HBs. In taluni casi si tratta di portatori cronici nei quali gli anticorpi anti-HBs non sono in grado di neutralizzare i virioni circolanti. [12]

HBcAg e anti-HBc

L'antigene core dell'HBV (HBcAg) è un antigene intracellulare espresso negli epatociti infetti e quindi non presente nel siero. Il corrispondente anticorpo (anti-HBc) è presente nel siero per tutta la durata dell'infezione: in fase acuta si tratta di IgM che nella fase finestra rappresentano l'unico marcatore di infezione. In particolare, si ritiene che la presenza nel siero di IgM anti-HBc sia diagnostica di infezione acuta, nonostante che tali anticorpi possano rimanere determinabili nel siero anche per più di 2 anni dopo l'infezione acuta e possano ricomparire nelle fasi di

riesacerbazione delle epatiti croniche. Le IgG anti-HBc persistono insieme con gli anti-HBs nei pazienti che guariscono e insieme con l'HBsAg nei pazienti che cronicizzano. La presenza isolata di anti-HBc in assenza di HBsAg o anti-HBs, è stata riportata nello 0,4-1,7% dei donatori di sangue in aree a bassa prevalenza e nel 10-20% della popolazione nelle regioni endemiche. Questo riscontro è indicativo di tre situazioni: periodo finestra di un'epatite B acuta (in questo caso si tratta di anti-HBc di classe IgM), pregressa infezione da HBV guarita risalente a molti anni addietro (di conseguenza il titolo di anti-HBs è diminuito fino a non essere più determinabile); infezione cronica da HBV di lunghissima durata (di conseguenza il titolo di HBsAg è diminuito fino a non essere più determinabile). Ai fini della diagnosi differenziale può essere utile la determinazione dell'HBV-DNA che comunque, in alcuni pazienti con solo anti-HBc, può anche risultare negativo.[10]

HBeAg e anti-HBe

L'HBeAg è in genere considerato marcatore di attiva replicazione virale ed infettività. E' riscontrabile in circolo nella prima fase dell'epatite acuta B, cioè durante la fase di attiva replicazione virale, pochi giorni dopo la comparsa dell'HBsAg e la sua presenza si associa alla presenza di HBV-DNA nel siero. La maggior parte dei pazienti HBeAg positivi ha una malattia epatica attiva, a meno che non si tratti di pazienti con infezione perinatale che, in questo caso possono avere transaminasi normali e minima infiammazione nel fegato. La sierconversione da HBeAg al relativo anticorpo (anti-HBe) si associa di solito alla scomparsa dell'HBV-DNA nel siero e alla remissione della malattia. Tuttavia un certo numero di pazienti affetti da infezione cronica continua ad avere una malattia epatica attiva e la presenza di HBV-DNA nel siero nonostante la presenza di anticorpi anti-HBe. Questa tipologia di pazienti, prevalente nel bacino del Mediterraneo, è portatrice di una popolazione virale prevalente caratterizzata da una mutazione a livello della regione precore che previene la produzione di HBeAg (mutanti precore).[13]

HBV-DNA

La presenza di HBV-DNA nel siero è indicativa di replicazione virale. Questo marcatore può essere rilevato nel siero con metodiche quantitative o qualitative i cui limiti di sensibilità dipendono dal test utilizzato: da 10^5 a 10^6 equivalenti virali/ml in caso di tecniche di ibridizzazione o di amplificazione del segnale, fino a 10^2 - 10^3 equivalenti/ml in caso di polymerase chain reaction (PCR). La guarigione di una epatite B acuta si accompagna generalmente alla scomparsa dell'HBV-DNA rilevata mediante tecniche non-PCR. Con la PCR infatti, l'HBV-DNA può rimanere determinabile nel siero per molti anni dopo la guarigione. Questo dato suggerisce la persistenza del virus dopo guarigione verosimilmente contenuto

all'interno del sistema immune. Analogamente in pazienti con infezione cronica, la sieroconversione HBeAg ad anti-HBe, sia spontanea che indotta dal trattamento, si accompagna di solito alla scomparsa dell'HBV-DNA sierico determinata da metodiche non-PCR, che però permane positivo con la PCR a meno che il paziente non abbia sierconvertito da HBsAg ad anti-HBs.[14]

Il principale ruolo clinico della determinazione dell'HBV-DNA sta nella predittività della risposta alla terapia virale in pazienti con infezione cronica. In caso di infezione da virus selvaggio, i pazienti con elevati livelli sierici di HBV-DNA pre-trattamento hanno minori probabilità di rispondere alla terapia con interferone.[15] Non è chiaro se questo vale per la terapia con analoghi nucleosidici. Infine l'HBV-DNA, in quanto indice di replicazione virale, è utile nella selezione dei pazienti con epatopatia cronica HBV-relata da candidare al trapianto di fegato. I pazienti HBV-DNA positivi infatti hanno una probabilità elevatissima di reinfectare il fegato trapiantato con conseguente prognosi negativa per la sopravvivenza sia dell'organo che del paziente.[12]

1.1.5 IL VIRUS DELL'EPATITE B

Il virus dell'epatite B (hepatitis B virus: HBV) è il prototipo di una famiglia di virus a DNA di piccole dimensioni muniti di envelope denominati hepadnaviridae e caratterizzati da uno spiccato epatotropismo e da uno spettro d'ospite ristretto.

Oltre all'HBV questa famiglia comprende:

- il virus dell'epatite della marmotta (woodchuck hepatitis virus: WHV);
- il virus dell'epatite dello scoiattolo (ground squirrel hepatitis virus: GSHV);
- il virus dell'epatite B dell'anatra (duck hepatitis B virus: DHBV);
- altri virus ancora non bene caratterizzati capaci di infectare sia mammiferi (ad esempio alcune specie di scimmie) che uccelli (ad esempio l'airone).

Tutti questi virus hanno una struttura simile, grossolanamente circolare, un genoma a DNA parzialmente bicatenario e una peculiare ed insolita strategia replicativa .[16]

Struttura

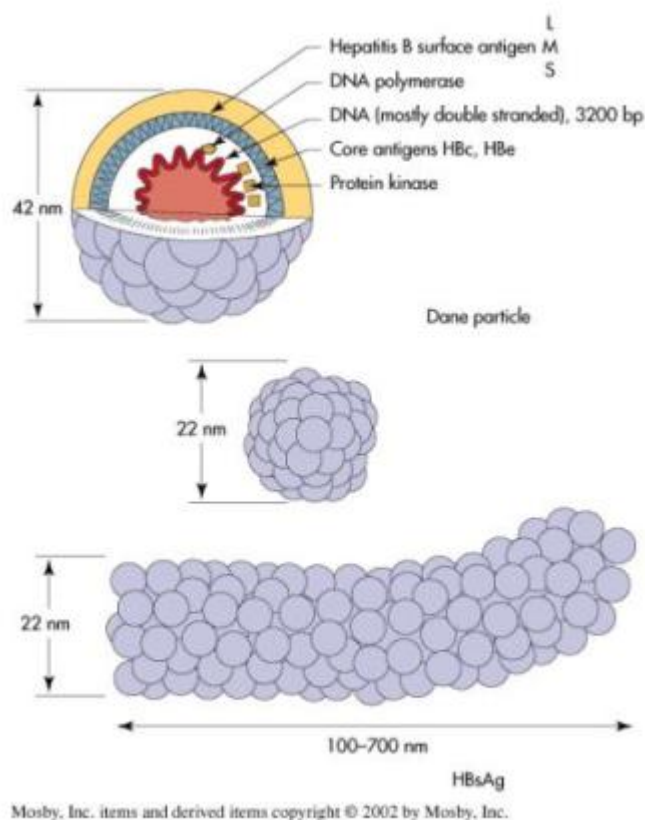


Fig. 2

Rappresentazione schematica delle particelle dell'HBV riscontrabili in sieri di pazienti infetti.

Al microscopio elettronico il siero di pazienti con infezione da HBV presenta diversi tipi di particelle virali strutturalmente ben distinte, alcune complete altre incomplete:

- "particelle di Dane": particelle sferoidali a doppio guscio di 42 nm;
- particelle sferiche di circa 22 nm;
- particelle filamentose del diametro di 22 nm e di lunghezza variabile.

Le "particelle di Dane" altro non sono che i virioni infettanti dell'HBV e la loro presenza nel siero è indicativa di attiva replicazione virale nel fegato. Sono costituite da un involucro esterno lipoproteico (envelope) di 7 nm, contenente tutti gli antigeni di superficie del virus e da un rivestimento proteico interno (capside) dotato di specificità antigenica (antigene core), che nel suo interno racchiude il genoma virale (HBV-DNA) e la DNA-polimerasi virus-specifica. Nel loro insieme le molecole proteiche del capsido, il genoma e la DNA-polimerasi formano il core della particella virale. Quest'ultimo di 28 nm di diametro, mostra alla microscopia elettronica

una configurazione esagonale a simmetria icosaedrica, con capsomeri, punte e spikes che aggettano dalla superficie del nucleocapside con prolungamenti di 7-10 nm di lunghezza terminanti con rigonfiamento distale bulbare.

Le particelle sferiche e filamentose sono costituite solo dall'involucro lipoproteico e mancano di nucleocapside e di genoma, di conseguenza non sono infettanti. Anche se in differente percentuale fra loro costituiscono le forme preponderanti in circolo potendo raggiungere, nel siero dei pazienti infetti, concentrazioni elevatissime, sino a 10^{13} per ml.[17]

L'involucro del virione è formato dal doppio strato lipidico proveniente dalle cellule dell'ospite e da tre glicoproteine virali chiamate proteine di superficie small (S), middle (M) e large (L). Il rivestimento esterno dei diversi tipi di particelle virus-relate presenti nel siero è costituito principalmente dalla proteina S, mentre le proteine M e L sono presenti in minor quantità. La proteina di superficie S rappresenta pertanto un antigene di frequente riscontro chiamato antigene di superficie dell'epatite B (hepatitis B surface antigen: HBsAg). Una delle caratteristiche peculiari dell'HBV è l'enorme eccesso con cui vengono prodotte alcune proteine virali (in particolare le proteine di superficie e la forma secretoria della proteina nucleocapsidica). L'esubero di sintesi delle proteine di superficie fa sì che solo una piccola porzione di esse vengano utilizzate per la costituzione del rivestimento del virione, la maggior parte viene invece secreta sottoforma di particella (sferica o filamentosa) difettiva, che pur presentando la reattività "HBsAg", non è infettiva in quanto non contiene l'acido nucleico virale.[18]

Organizzazione

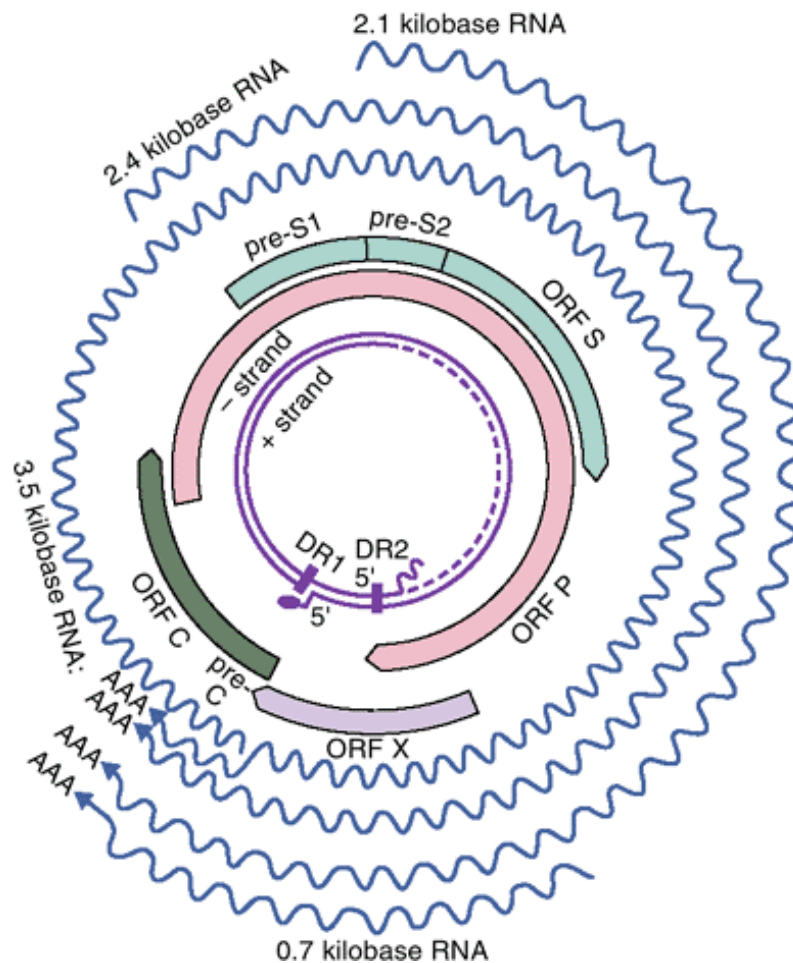


Fig. 3
Rappresentazione schematica del DNA del virus dell'Epatite B

Il genoma dell'HBV è costituito da una molecola di DNA circolare a doppia elica incompleta, del peso molecolare di $2,3 \times 10^6$ dalton. Il doppio anello è formato da un filamento lungo a polarità negativa di dimensioni costanti (minus strand) e da un filamento corto a polarità positiva che può variare dal 15 al 60% della lunghezza della forma circolare (plus strand).

Il genoma dell'HBV ha un'organizzazione molto compatta, vale a dire che ogni nucleotide si trova in una regione codificante e più della metà del genoma è tradotto da più moduli di lettura aperta (open reading frames, ORFs).[19] Questa estrema compattezza dunque determina inevitabili sovrapposizioni delle regioni che codificano le proteine virali, con lettura a partire da codoni di inizio parzialmente sfalsati. Questo tipo di architettura risulta molto vantaggiosa, in

questo modo infatti l'HBV può contare su un genoma poco ingombrante, ma particolarmente duttile, visto che la mutazione di un singolo nucleotide può cambiare più di una proteina virale. L'analisi di sequenza del DNA virale (HBV) ha portato all'identificazione di quattro ORFs localizzati tutti sul minus strand:

- ORF pre-S/S che codifica per gli antigeni di superficie (pre-S1, pre-S2 e S);
- ORF pre-C/C che codifica per le proteine strutturali del core e per l'antigene e (HBcAg);
- gene P che codifica per la polimerasi virale;
- gene X che codifica per una proteina il cui ruolo nel ciclo biologico del virus rimane tuttora ignoto.[18]

Proteine di superficie

L'ORF che codifica per le proteine strutturali dell'involucro esterno della particella di Dane è costituito da un unico modulo di lettura che comprende sia il gene S sia due altre regioni contigue che lo precedono nello stesso modulo definite pre-S1 e pre-S2. Il genoma può così codificare per le tre diverse proteine di superficie: S, M ed L: la proteina L è il prodotto dell'intero ORF (preS1 + preS2 + S), la M del gene S e della sequenza preS2 situate a monte di S e la S codificata solo dal gene S.

Tutte e tre le proteine sono costituenti essenziali dell'involucro esterno dell'HBV ove sono stabilmente rappresentate e sembrano svolgere importanti funzioni quali ad esempio l'assemblaggio del core a livello citoplasmatico, l'adesione alle membrane plasmatiche delle cellule dell'ospite e la penetrazione della particella virale all'interno della cellula epatica.

Nel siero dei pazienti infettati da HBV l'espressione delle tre proteine di superficie è estremamente variabile e dipende dalla fase della malattia (acuta o cronica) e dall'attività replicativa del virus.[19,20]

Proteine del core

Come per l'ORF pre-S/S, anche per l'ORF del core sono presenti due distinti codon di inizio della trascrizione che permettono di identificare due regioni: pre-C e C (2). Il prodotto del gene C è la proteina del core (HBcAg) che costituisce l'unità fondamentale del nucleocapside e sintetizzata nel citoplasma della cellula ospite, ritorna nel nucleo concorrendo poi all'assemblaggio della particella virale infettiva. La proteina HBcAg contiene una sequenza carbossiterminale protamino-simile di 38 amminoacidi ricca in arginina e ritenuta responsabile, in quanto altamente basica, del legame tra l'antigene e l'acido nucleico virale.[21]

Se il segnale di trascrizione inizia a livello del primo codone in posizione 1814, si ha la sintesi di una proteina di 25 Kd (espressione dell'intero modulo di lettura pre-C/C) che differisce dall'HBcAg per la presenza all'estremo N-terminale di 29 aminoacidi tradotti dalla regione pre-C. Questa regione contiene un piccolo peptide che ha la funzione di sito di riconoscimento per il trasporto della proteina di 25 Kd nel reticolo endoplasmatico della cellula ospite. In seguito all'eliminazione di tale peptide nel lume dello stesso reticolo endoplasmatico, residua una proteina intermedia di 22 kd che può o essere liberata come tale nel citoplasma o essere ulteriormente clivata all'estremo C-terminale dando origine ad una proteina di 17 Kd chiamata antigene "e" (HBeAg). L'HBeAg è pertanto un antigene nucleocapsidico non strutturale del virus, fisicamente e antigenicamente distinto dall'HBcAg. L'HBeAg non sembra indispensabile per le funzioni biologiche e vitali del virus, come dimostrato dal fatto che le mutazioni virali coinvolgenti la produzione di proteine precoci non hanno alcun effetto sulla replicazione virale. Pur non essendo fondamentale per il completamento del ciclo biologico del virus, la produzione dell'HBeAg è stata mantenuta in tutti gli hepadnavirus. E' possibile che ciò tragga ragione dal suo ruolo di modulatore dell'interazione virus/sistema immune dell'ospite, come dimostrato da evidenze sperimentali.[22]

Proteina P

Il prodotto codificato dal gene P, una proteina basica ricca in istidina di 90000-950000 dalton, si caratterizza per le sue molteplici attività funzionali, prima fra tutte quella svolta nel processo di replicazione del virus, ma anche quella di più recente individuazione che assegna un ruolo importante nelle varie fasi di packaging dell'RNA genomico all'interno della primitiva particella del core.

L'analisi di sequenza del genoma ha rivelato l'esistenza, all'interno dell'ORF P, di quattro distinti domains. Un amminoterminale detto primase che codifica per la proteina e funge da primer per la sintesi del minus strand del DNA virale. A questo segue un secondo dominio di incerto significato, definito spacer intercalato tra il primo e il terzo, il quale codifica per la DNA-polimerasi virale. Tale enzima svolge un ruolo chiave nel processo di replicazione del virus ed è dotato di differenti funzioni: antigene, enzima di riparazione per la chiusura del tratto spaiato del plus strand nel momento dell'ingresso del virione nel nucleo dell'epatocita infettato e infine attività di trascrittasi inversa indispensabile per dirigere la sintesi del DNA virale a partire dall'RNA pregenomico sintetizzato da una polimerasi dell'ospite. Un quarto dominio, localizzato all'estremità 3' dell'ORF codifica per un H-ribonucleasi che serve a degradare

l'oligoribonucleotide posto all'estremità 5' una volta che questo ha svolto la sua funzione, ovvero funzionare da primer per la copia del plus strand all'interno del core immaturo.[23,24]

Proteina X

L'ORF X codifica per una proteina non strutturale del virus la cui esatta funzione rimane ancora per certi aspetti da chiarire. Sembra si tratti di una proteina dalle spiccate proprietà transattivanti in grado di promuovere la trascrizione di diversi geni, non solo dell'HBV (sul quale agisce regolando e/o potenziando le varie fasi del processo replicativo), ma anche di altri virus e delle cellule dell'ospite.[25] In particolare la proteina X agirebbe su oncogeni e fattori di crescita quali c-myc, c-fos c-jun, TGF- α esercitando così una spinta proliferativa sulla cellula che, se non opportunamente controregolata e bilanciata dall'attività di altri geni ad effetto opposto (antioncogeni), può portare a situazioni estreme quali la trasformazione neoplastica. [26]

La proteina X ha inoltre potere immunogeno ed è quindi capace di indurre nel soggetto infettato da HBV una risposta anticorpale. Tale risposta, fugace e abortiva nel soggetto con epatite acuta autolimitantesi, può persistere a titoli abbastanza elevati nell'epatite cronica HBsAg-positiva con persistente replicazione virale.

Replicazione

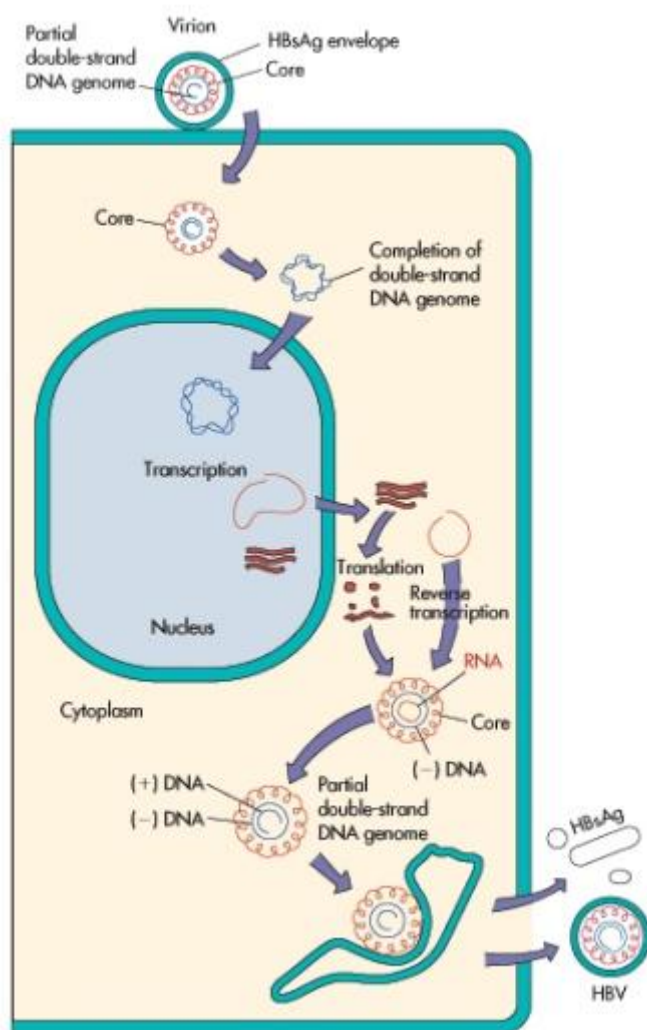


Fig.4

Rappresentazione schematica del ciclo replicativo dell'Epatite B.

Il ciclo vitale dell'HBV è particolare e unico nel suo genere. L'HBV, pur essendo un virus a DNA, replica come un retrovirus: la duplicazione del proprio genoma prevede infatti la sintesi di un pre-genoma ad RNA intermedio successivamente retroscritto, ad opera della trascrittasi inversa, nel corrispondente DNA.[27]

Le tappe del ciclo vitale sono le seguenti:

- **adesione e ingresso nella cellula ospite:**

gli eventi più precoci del ciclo dell'HBV sono ancora in gran parte ignoti per l'assenza di modelli cellulari in vitro. Il migliore modello sperimentale è rappresentato dall'infezione di epatociti di

anatra con DHBV: su queste cellule sono stati dimostrati almeno 10^4 siti di legame ad alta affinità. Il legame specifico a questi siti saturabili si accompagna all'adesione del virus a siti di legame non saturabili e a bassa affinità. Sulla base delle evidenze sperimentali si ritiene che, sia per l'HBV che per il DHBV, i siti recettoriali responsabili dell'interazione virus-ospite siano situati all'interno del domain pre-S della proteina di superficie L. Resta comunque sconosciuta la natura dei recettori cellulari, anche se nel modello degli epatociti di anatra è stata descritta una glicoproteina di 180 kd sulla superficie cellulare appartenente alla famiglia delle carbossipeptidasi D in grado di legare le particelle virali con elevata affinità. Questa proteina transmembrana sarebbe il recettore responsabile del riconoscimento e dell'internalizzazione del virus, tuttavia sarebbe necessario un secondo fattore dell'ospite per completare l'ingresso del virus nella cellula.

Una volta avvenuto il legame con i recettori cellulari, la tappa successiva prevede la liberazione del genoma e degli altri costituenti virali nel citoplasma della cellula ospite. Per l'HBV sembra che ciò avvenga per endocitosi. Una volta nel citoplasma il DNA genomico deve raggiungere il nucleo, come questo trasporto possa avvenire è oggetto di numerosi studi. Le evidenze più recenti supportano il ruolo della polimerasi virale che sarebbe in grado di legare le molecole di DNA all'interno del nucleo, mentre le particelle del core sarebbero coinvolte nel trasporto nucleare.

Una volta nel nucleo il genoma circolare parzialmente a doppia elica si trasforma in una nuova forma di DNA virale chiamato DNA circolare chiuso covalentemente (cccDNA). Il cccDNA rappresenta lo stampo per la trascrizione del genoma virale.[28]

- **replicazione del genoma:**

la prima tappa della replicazione del genoma è la formazione del cccDNA che viene successivamente amplificato di circa 50 volte. La trasformazione del DNA virale in cccDNA e la successiva amplificazione prevedono una serie di reazioni enzimatiche che necessitano dell'intervento di fattori dell'ospite e della proteina virale L. Il cccDNA è il primo intermedio replicativo a comparire dopo l'infezione e rappresenta la principale forma di DNA presente nel nucleo.

Il cccDNA viene quindi trascritto ad opera di una RNA-polimerasi DNA-dipendente della cellula dell'ospite, in forme multiple di RNA genomico e subgenomico tutte a polarità positiva, le quali si distinguono per la differente lunghezza e funzione. Nell'evolversi del ciclo riproduttivo, una parte dell'RNA genomico migra nel citoplasma ove viene utilizzato come RNA messaggero (mRNA) per dirigere la sintesi delle proteine virali strutturali e non, mentre un'altra parte rimane

temporaneamente sequestrata nel nucleo dell'epatocita per poi migrare verso il citoplasma e fungere da stampo per la sintesi di nuovo DNA virale.

L'RNA destinato alla replicazione virale, definito pre-genomico (pgRNA), viene incapsidato in particelle core immature all'interno delle quali viene poi retrotrascritto ad opera della DNA polimerasi virale nella catena minus strand del DNA virale. Man mano che il minus strand si allunga, il pgRNA viene degradato ad opera della DNA-polimerasi virale che possiede anche attività ribonucleasica. Una volta completato il minus strand, questo servirà da stampo per la sintesi della catena corta (plus strand) che ha luogo sempre all'interno della particella virale immatura.[27,29]

- **assemblaggio delle particelle virali e liberazione in circolo:**

Per essere secreto il virus deve assolutamente possedere l'involucro, in particolare deve avere le proteine di superficie. L'assemblaggio delle particelle del core con le proteine dell'envelope avviene nel citoplasma attraverso una complessa interazione che genera virioni con involucro. Le particelle così assemblate vengono trasportate nel reticolo di Golgi e quindi secrete mediante trasporto vescicolare.

1.1.6 VARIABILITA' GENETICA

Rispetto ad altri virus il genoma dell'HBV sembra essere relativamente stabile con un tasso di variabilità circa 100-1000 volte più basso rispetto ai virus a RNA, ma 100 volte più alto rispetto agli altri virus a DNA. Questo dato si può verosimilmente imputare al fatto che le modalità di replicazione dell'HBV prevedono la sintesi di un pre-genoma ad RNA quindi ritrascritto in DNA, la fase di retro-trascrizione pertanto giustificherebbe una variabilità genomica piuttosto elevata. Al contrario il numero di mutazioni dell'HBV pari a 2×10^5 sostituzioni/per sito/per anno è nettamente inferiore a quello di altri virus con meccanismi replicativi simili quali l'HIV. E' verosimile che l'estrema compattezza del genoma virale sia uno dei fattori limitanti per la produzione di mutanti biologicamente efficienti. [30,31]

Le varianti dell'HBV negli ultimi anni hanno suscitato notevole interesse non solo virologico, ma anche clinico di conseguenza mutazioni a carico dei differenti geni virali (regioni core e precore, regione S e regione P) sono state studiate in relazione a specifiche condizioni cliniche.

- In riferimento alla regione pre-S/S che codifica per le proteine di superficie, la presenza di regioni ipervariabili e quindi suscettibili di mutazioni nelle due porzioni idrofiliche del gene S, giustifica il riscontro di diversi sottotipi virali e la possibilità nell'ambito

degli stessi, di frequenti mutazioni con sostituzioni aminoacidiche senza però comportare importanti ripercussioni sulla biologia o sulla patogenicità dell'HBV. Mutazioni puntiformi e delezioni delle regioni pre-S1 pre-S2 possono invece riflettersi rispettivamente sull'assemblaggio del virione e sulle potenzialità oncogene del virus. [32,33]

Sul piano clinico la variazione più importante a carico del gene S è quella riguardante il domain gruppo-specifico "a" altamente immunogeno, in particolare la regione tra gli aa 124 e 147. Tale domain presente in tutti i sottotipi virali dell'HBV, rappresenta il bersaglio verso cui è diretta la risposta anticorpale neutralizzante antiHBs, in grado di conferire protezione nei confronti dei diversi sottotipi del virus.[34] Questa mutazione fu inizialmente descritta in un bambino italiano infettatosi dalla madre HBeAg-positiva nonostante avesse già sviluppato, a seguito della profilassi vaccinale, anticorpi anti-HBs a titolo elevato (il bambino divenne HBsAg e HBeAg positivo portatore di epatite cronica). [35] Questa stessa mutazione è stata successivamente evidenziata sia in bambini sottoposti a profilassi passiva-attiva anti-HBV [36,37], sia nei trapiantati d'organo dopo profilassi con globuline umane specifiche iperimmuni.[38,39] Tale mutazione consiste nella sostituzione in posizione 145, dell'aminoacido glicina con l'aminoacido arginina, questo determina la selezione di un mutante virale biologicamente attivo in grado di riprodursi e di sfuggire all'azione neutralizzante degli anticorpi anti-HBs, in quanto la sostituzione Gly>Arg altera la struttura conformazionale dell'epitopo immunodominante "a" riducendo o annullando la capacità di legame degli anticorpi monoclonali o policlonali specifici. [34]

Ogni tipo di mutazione del gene pre-S/S può portare ad errori diagnostici soprattutto quando sono utilizzate metodiche di rilevamento dell'HBsAg basate sulla cattura dell'antigene o che si avvalgono dell'uso di anticorpi monoclonali antiHBs che possono non legarsi al mutante HBsAg. Pertanto i pazienti portatori di un infezione da varianti HBV con mutazioni nella regione del gene pre-S/S potrebbero risultare falsamente negativi.[40]

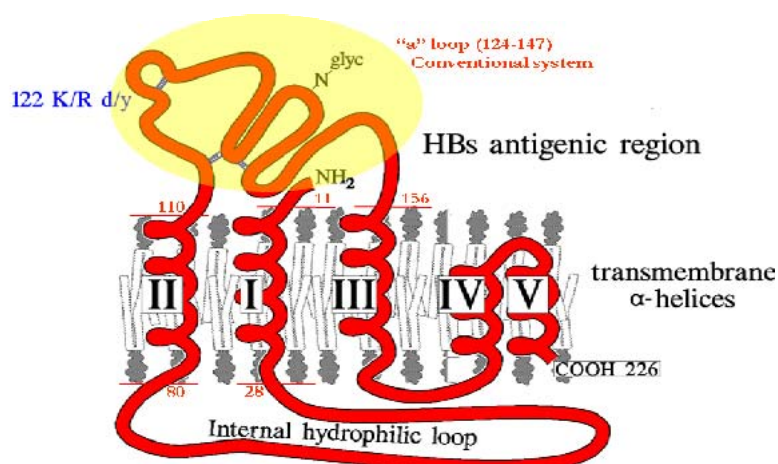


Fig.5 Rappresentazione schematica della proteina HBsAg del virus dell'Epatite B. Nel cerchio giallo è evidenziata la regione variabile.

- Le varianti della regione preC si caratterizzano per l'incapacità di esprimere l'antigene nucleocapsidico "e" che rappresenta, assieme all'antigene del core, il naturale bersaglio della risposta cellulomediata dell'ospite, mantenendo comunque conservate le più importanti funzioni biologiche del virus quali la capacità di riprodursi e il potenziale patogenico. La mutazione osservata con maggiore frequenza nella regione pre-C è rappresentata dalla sostituzione, in corrispondenza del nucleotide 1896, di un'adenosina al posto di una guanosina (G>A), con conseguente conversione di un codone 28, che nel ceppo selvaggio codifica per il triptofano, in un codone di stop che impedisce la trascrizione provocando così l'arresto della sintesi della proteina virale.[41,42,43] In altre parole, in presenza di questo tipo di mutazione, la sintesi della proteina nucleocapsidica avviene come di norma, ma l'antigene "e" non viene sintetizzato per la presenza di una mutazione tra i due codon di inizio. L'antigene "e" è un importante bersaglio della risposta immune sia cellulo-mediata sia umorale, pertanto la sua perdita può consentire al virus di sfuggire al sistema immune dell'ospite. In termini clinici la sierconversione dell'antigene "e" con comparsa del relativo anticorpo è classicamente ritenuto un segno di marcata riduzione dell'attiva replicativa. Alcuni pazienti e portatori cronici del virus tuttavia, sviluppano l'anti-HBe, ma continuano a presentare replicazione del virus ad alto titolo. Questi pazienti sono appunto portatori della mutazione pre-core che è diventata prevalente nei paesi del bacino del Mediterraneo. Subito dopo la sua prima descrizione, si riteneva che tale mutazione determinasse una rapida progressione dell'infezione verso forme fulminanti o croniche ad elevata attività. Osservazioni successive non hanno confermato questo dato essendo stati descritti portatori asintomatici di tale mutazione.[44]
- Molto importanti sul piano clinico sono le mutazioni del gene C propriamente detto che tendono a raggrupparsi in porzioni ristrette del genoma virale (tra le sequenze 48-60 e 84-101) codificanti per epitopi strutturali riconosciuti dai linfociti T, sia helper sia citotossici. Tali mutazioni correlano solitamente con la severità della malattia epatica, verosimilmente tramite un migliore riconoscimento degli epatociti infettanti da parte dei linfociti T citotossici e talora possono essere responsabili del riscontro di insoliti pattern sierovirologici, quali presenza di HBsAg e assenza di anti-HBc nello stesso campione o addirittura presenza di HBsAg e di HBeAg e assenza di anti-HBc. [45,46]

- Mutazioni nel motivo conservato YMDD del sito catalitico della trascrittasi inversa codificata dal gene P alterano la sintesi del DNA virale e sono state correlate alla resistenza alla lamivudina, un farmaco antivirale utilizzato per la terapia delle epatopatie HBV-relate. Sempre a carico del gene P altre mutazioni puntiformi sembrano interferire con la sintesi delle catene di DNA.
- Rare e ancora senza particolare significato sono le mutazioni a carico del gene X in corrispondenza del quale sono state descritte sequenze integrate troncate, associate a delezioni, fusioni con il gene C e sviluppo di carcinoma epatocellulare.[37]

1.2 SCOPO DEL LAVORO

Questo lavoro, svolto in collaborazione tra il laboratorio di Immunologia del Dipartimento di Scienze Mediche di Novara, il laboratorio di Chimica del Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze di Milano-Bicocca e l'Advanced Life Science Institute Inc. a Saitama, Giappone, nasce da precise esigenze di mercato della ditta DiaSorin spa (Saluggia).

Analisi interne del marketing DiaSorin hanno infatti evidenziato l'esigenza di aumentare le prestazioni dei loro test diagnostici per infezioni da HBV migliorando nello specifico:

- la sensibilità analitica del test nei confronti del riconoscimento del marker HBsAg alla fine del periodo di incubazione
- la sensibilità generale rispetto ai differenti genotipi
- la specificità generica dello screening
- la sensibilità nel riconoscimento dei vari mutanti HBsAg
- il livello di automazione dell'analisi
- il numero di analisi previste dal test.

A livello generale i test diagnostici HBV si basano sull'utilizzo di anticorpi monoclonali o policlonali contro l'epitopo dominante "a" dell'HBsAg.

La specificità mediamente supera il 99.5%, ma falsi positivi possono essere osservati in campioni eparinizzati o dovuti ad interferenze dipendenti da emoglobina o bilirubina. Generalmente il maggior numero di falsi positivi viene rilevato nelle donne in gravidanza, in pazienti con infezioni acute o croniche, o con malattie autoimmuni o ancora malattie croniche del fegato.

La sensibilità dei test HBsAg è in continuo incremento, tanto che il limite di *detection* delle nuove licenze rilasciate in Europa è al di sotto dei 0,16 ng/ml.

Tuttavia l'HBsAg può non essere rilevato in alcune circostanze:

- durante il periodo finestra alla fine del periodo di incubazione prima che abbia inizio la sintesi dell'HBsAg
- in presenza di bassi livelli di HBV
- in casi di risoluzione della malattia, che corrispondono con un progressivo decadimento dei livelli di HBsAg al disotto dei limiti di rilevabilità dei test in pazienti con infezione HBV cronica
- in presenza di mutanti e varianti della regione S

Lo scopo di questo lavoro è stato quindi mettere a punto un nuovo kit diagnostico che migliorasse le qualità di quello già in commercio risultando in grado di riconoscere tutti i mutanti HBsAg noti e che avesse un valore soglia più basso in modo da rilevare le piccole quantità di

HBsAg presenti in campioni di portatori considerati “Low-level”, mostrando di fatto di essere paragonabile o migliore rispetto ai kit dei più importanti competitor sul mercato. Inoltre che rispondesse alle caratteristiche definite dalla Commissione Europea per permetterne l’immediata commercializzazione nei paesi appartenenti alla comunità.

COMPETITOR		sensibilità	specificità	metodo
Abbot	ARCHITECT	0.05 IU/ml	99.87%	CMIA
Siemens	Advia Centaur	100%	99.94%	CLIA
BioMerieux	Vidas	0.12ng/ml	100%	IA
Ortho	Vitros	0,16 ng/ml	100%	IA
Roche	Elecsis	0.1 IU/ml	99.88%	IA

Fig. 6 Tabella che mostra le percentuali di sensibilità e specificità dei test diagnostici per HBsAg dei principali competitor presenti sul mercato.

1.3 MATERIALI E METODI

1.3.1 FUNZIONAMENTO DELLO STRUMENTO LIAISON



Fig.7 Lo strumento automatizzato LIAISON della DiaSorin spa.

Lo strumento Liaison è in grado di eseguire in modo automatico l'analisi di campioni di fluidi biologici, quali ad esempio sangue o plasma. Esso è in grado di riconoscere ed identificare automaticamente sia i campioni quando questi portino un opportuno codice a barre, sia i reattivi da impiegare per l'analisi richiesta, quando questi siano stati caricati a bordo.

L'uso di contenitori esclusivi per lo svolgimento della reazione immunochimica e di reagenti opportunamente confezionati e calibrati e l'impossibilità da parte dell'utente di modificare le procedure operative o i protocolli ne fanno uno strumento chiuso, su cui non è possibile eseguire analisi con materiali prodotti da altri fabbricanti, al contrario di quanto può ad esempio accadere con un lettore di micropiastre.

La tecnologia applicata per l'analisi è di tipo immunometrico, in cui l'esito della reazione analitica è evidenziato da un'emissione chemiluminescente che perdura nel tempo per alcuni secondi (il massimo dell'emissione di luce si realizza entro i primi tre secondi dall'attivazione del substrato): questo garantisce al tempo stesso una buona sensibilità alle basse dosi, un ampio campo di variazione del segnale (range dinamico, esteso fino a 3-4 ordini di grandezza utili) e valori bassi di legame aspecifico e di rumore di fondo.

L'uso di microparticelle magnetiche come fase solida per supportare reattivi specifici da un lato consente le reazioni rapide tipiche dei sistemi omogenei e dall'altro rende particolarmente efficaci i passaggi di separazione del libero dal legato.

Lo strumento è costituito da due unità, entrambe tali da trovare posto su un banco.

La prima è un personal computer con schermo sensibile (touch screen), nel quale risiede il software con l'interfaccia utente, i protocolli di saggio, le banche dati delle varie cartucce di reagenti (integral), le banche dati dei campioni eseguiti, in corso di esecuzione o da eseguire, la storia delle calibrazioni e dei controlli e le interfacce di comunicazione con la rete ospite del laboratorio ove questa sia presente.

La seconda unità costituisce l'analizzatore vero e proprio, in grado di eseguire l'analisi dei campioni a partire dal tubo primario fino all'ottenimento ed alla lettura del segnale finale.

Varie parti, ciascuna con una sua funzione, compongono l'analizzatore. Tra queste le fondamentali sono:

Loader e stacker delle cuvette: due cinghie di trasporto consentono il caricamento continuo dei moduli di reazione all'estrema sinistra dello strumento. I moduli caricati vengono impilati in un raccoglitore multipiano (7 livelli).

Area campioni: un vano è ricavato sulla sinistra per alloggiare fino a 12 rack portacampioni. Un lettore di codice a barre consente, quando siano etichettati, l'identificazione dei campioni.

Area reagenti: un vano refrigerato a +15°C è ricavato sulla destra con fessure per ospitare fino a 15 integral. Un apposito dispositivo mantiene le microparticelle in sospensione per tutto il tempo che l'integral è a bordo della macchina. Un lettore di codice a barre consente l'identificazione dell'integral quando sia etichettato.

Bracci robotici: portano un ago di dispensazione ciascuno. Quello di sinistra gestisce in genere i campioni, mentre quello di destra dispensa i reattivi. Eseguita l'aspirazione della specie di interesse, entrambi i bracci muovono ad una delle due stazioni di dispensazione. I due bracci hanno stazioni di lavaggio indipendenti.

Incubatore: termostattizzato a +36°C ospita le cuvette nel corso delle varie incubazioni.

Stazione di lavaggio: è al tempo stesso in grado di separare la fase solida per applicazione di un campo magnetico e di eseguire l'aspirazione del liquido di reazione e la dispensazione di un opportuno tampone di lavaggio. Il numero dei lavaggi può essere determinato a piacere.

Area di lettura: ospita i dispositivi di iniezione dei due reattivi di attivazione (trigger o starter reagents) e un tubo fotomoltiplicatore con il relativo sistema ottico.

All'esterno si trovano ancora quattro taniche, due per i liquidi di lavaggio e di sistema e due per lo scarico. Le taniche delle due coppie non sono tra loro equivalenti.

In base al programma di funzionamento utilizzato, i campioni vengono prelevati direttamente dalle provette dal braccio sinistro dello strumento e vengono portati all'interno delle cuvette di reazione. Contemporaneamente il braccio destro dispensa la fase solida (MP) coattata con specifici anticorpi o antigeni a seconda della tipologia di test. Viene quindi effettuato uno step di incubazione a cui seguono dei lavaggi durante i quali le micro particelle vengono attratte di lato alla provetta da appositi magneti, per consentire l'aspirazione del liquido. In seguito viene dispensato il reattivo tracciante costituito da anticorpi monoclonali o policlonali marcati con amminobutil-etil-isoluminolo (A.B.E.I., questa molecola reagisce in presenza di H₂O₂ liberando energia di legame sottoforma di luce). Segue un secondo step di incubazione ed lavaggio. Infine le provette vengono sospinte nella camera di lettura dove vengono dispensati i reagenti starter (posizionati in una cameretta esterna) che fanno avvenire la reazione luminosa. La luce emessa viene letta da un Luminometro ovvero un fotomoltiplicatore che, per effetto fotoelettrico, trasformerà i fotoni emessi dalla sostanza luminescente, in un segnale elettrico che viene via via amplificato. L'intensità del segnale elettrico è naturalmente proporzionale alla quantità di fotoni emessi dalla sostanza luminescente e quindi al tracciante legatosi alla fase solida. Una semplice elaborazione del segnale permetterà quindi di ottenere il dato di concentrazione del campione da determinare. Il segnale analitico viene espresso come **Relative Light Units** ossia **RLUs**.

I campioni vengono solitamente analizzati in triplo e lo strumento oltre alle RLU fornisce anche un cv (coefficiente di variazione = deviazione standard/media RLU) che indica quanto le tre letture fatte per lo stesso campione si discostino una dall'altra, più è basso più l'analisi è buona..

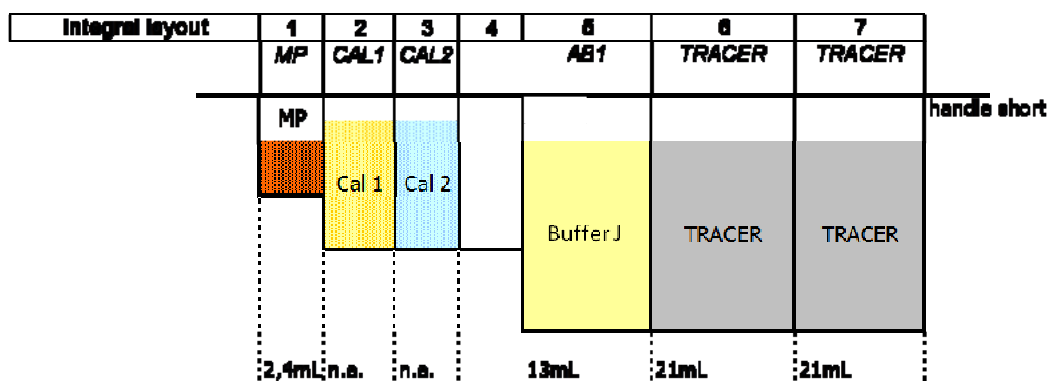


Fig.8 Schema di un comune integral utilizzato su LIAISON

In figura è mostrato un Integral tipo in cui si possono distinguere:

- MP ovvero le micro particelle coattate con l'antigene o gli anticorpi specifici in buffer salino
- Cal1 ovvero il calibratore a concentrazione minore del test

- Cal2 ovvero il calibratore a concentrazione maggiore del test

Questi consentono di tarare il singolo integrale rispetto ad una curva di taratura interna allo strumento ottenendo una corretta lettura dei campioni analizzati.

- Buffer ovvero il diluente dei campioni che vengono analizzati (spesso è necessario impostare lo strumento in modo che produca delle diluizioni dei campioni da analizzare)
- TRACER ovvero gli anticorpi monoclonali o policlonali marcati

1.3.2 REAGENTI UTILIZZATI NEL NUOVO KIT LIAISON

MP: Microparticelle magnetiche coattate con anticorpi monoclonali anti-HBsAg in grado di riconoscere sia il sottotipo “ad” che “ay” , BSA biotinilata, streptavidina, PBS, sodio azide <0,1%

<i>IgG ID</i>	<i>Use</i>	<i>a.a. epitope</i>	<i>HBs region</i>
5C3	Solid Phase	124-147 conformational	“a loop”
121	Solid Phase	151-170 linear	Transmembrane
163	Solid Phase	31-50 linear	Inner hydrophilic

Fig.9 Nome e caratteristiche dei tre anticorpi utilizzati nella fase solida del nuovo kit prototipo per HBsAg

Calibratore 1: Concentrazione bassa di HBsAg ricombinante (ad e ay), BSA, buffer fosfato, EDTA, detergenti, 0,2% di ProCiclin 300 ed un colorante giallo inerte. La concentrazione del calibratore (IU/mL) è stata calcolata utilizzando uno standard dell’NIBSC (code number 00/588; WHO Second International Standard for HBsAg, subtype adw2, genotype A).

Calibratore 2: Concentrazione alta di HBsAg ricombinante (ad e ay), BSA, buffer fosfato, EDTA, detergenti, 0,2% di ProCiclin 300 ed un colorante giallo inerte. La concentrazione del calibratore (IU/mL) è stata calcolata utilizzando uno standard dell’NIBSC (code number 00/588; WHO Second International Standard for HBsAg, subtype adw2, genotype A).

Buffer J: IgG di topo non specifiche, BSA, Caseina, TRIS buffer, EDTA, detergenti, 0,2% di ProCiclin 300 e conservanti.

Tracer: Anticorpi monoclonali anti-HBsAg aventi reattività per entrambi I sottotipi ad e ay, coniugati con un derivato dell'isoluminolo (ABEI), siero/plasma umano non reattivo per i marker HBV, siero di capra e bovino, IgG non specifiche (mouse polyclonal), BSA, buffer fosfato, detergenti, 0.2% ProClin® 300 e conservanti.

<i>IgG ID</i>	<i>Use</i>	<i>a.a. epitope</i>	<i>HBs region</i>
124	Conjugate	124-147 conformational	“a loop”
320	Conjugate	124-147 conformational	“a loop”
128	Conjugate	121-130 linear	Surface (Mainly conserved)
111	Conjugate	61-69 linear	Inner hydrophilic

Fig.10 Nome e caratteristiche degli anticorpi monoclonali utilizzati come traccianti nel nuovo kit prototipo per HBsAg

1.3.3 PRINCIPIO DELLA PROCEDURA

Il metodo per la determinazione quantitative di HBsAg è un saggio diretto chemiluminescente (CLIA) a sandwich a due step. Confrontabile sensibilità per la rilevazione dei differenti mutanti e genotipi è assicurata dall'utilizzo di anticorpi monoclonali di topo diretti verso epitopi della regione altamente conservata interna dell'HBsAg, cui possono legarsi quando utilizzati in combinazione con un complesso mix di detergenti.

Questi anticorpi monoclonali sono utilizzati per coattare le particelle magnetiche (fase solida), mentre una differente miscela di anticorpi monoclonali diretti verso epitopi differenti è legata ad un derivato dell'isoluminolo. Durante la prima incubazione, l'HBsAg presente nei calibratori, campioni o controlli si lega alla fase solida. Durante la seconda incubazione, gli anticorpi coniugati regiscono con l'HBsAg legato alla fase solida. . Dopo questa incubazione il materiale non legato viene rimosso tramite un ciclo di lavaggio.

Infine i reagenti starter vengono aggiunti per indurre una reazione chemiluminescente. Il segnale luminoso è misurato mediante un fotomoltiplicatore come RLU (relative light units) ed è

direttamente proporzionale alla concentrazione di HBsAg presente nei calibratori, nei campioni e nei controlli.

1.3.4 CLONAGGIO DI 10 MUTANTI HBsAg

Antigeni mutanti HBsAg forniti dalla DIASORIN spa

- HBsAg D144A (**404**)
 - HBsAg G145R (**393**)
 - HBsAg P142L-G145R (**421**)
 - HBsAg P142S-G145R (**422**)
 - HBsAg T123N (**011**)
 - HBsAg T123N-T124S (**012**)
 - HBsAg P142L-F/Y143H-D144E-G145R (**013**)
 - HBsAg I110R-S117I-G119R-T123N (**014**)
 - HBsAg 122+DT (**015**)
 - HBsAg 122+DT-G145R (**016**)
- in pGA4

Linee cellulari eucariotiche

HeLa: cellule tumorali immortalizzate altamente stabilizzate derivanti da un cancro della cervice uterina. Crescono in adesione in terreno DMEM 10% FBS.

HEK 293 T: cellule embrionali di rene umano che contengono stabilmente integrato nel genoma la sequenza genica codificante l'antigene T del Virus Vacuolante della Scimmia (SV40), necessaria per un'efficiente replicazione dei vettori plasmidici recanti l'origine di replicazione di SV40.

Vettori di espressione eucariotici

In questo lavoro tutte le proteine ricombinanti sono state clonate in pcDNA3.1 (Invitrogen)

Digestione enzimatica e ligasi

I 10 mutanti forniti dalla DiaSorin in pGA4 e il vettore di espressione eucariotico pcDNA3.1 sono stati digeriti per 2 ore 37°C con i seguenti enzimi di restrizione:

- ✓ XbaI
- ✓ BamHI

I frammenti di DNA ottenuti sono stati separati tramite elettroforesi su gel di agarosio (2%), purificati mediante QIAquick Gel Extraction (QIAGEN) e successivamente ligati mediante azione della T4 DNA ligasi (1-2 U; Invitrogen).

La reazione di ligasi è stata condotta a 22° C per 2 ore.

Trasformazione batterica

Come recipiente dei plasmidi originati è stato utilizzato il ceppo batterico *Escherichia coli*, specie JM109 (Promega). A 100 µl di batteri competenti sono stati aggiunti 10 µl del prodotto di ligazione e incubati 10' in ghiaccio. Successivamente è stato indotto uno shock termico a 42°C per 45''. Le cellule sono state poi incubate 2' in ghiaccio e 30' con 900 µl di LB broth a 37°C. Infine sono state piastrate su piastre Petri contenenti terreno selettivo (LB-agar-ampicillina 50 µg/ml) e lasciate crescere 12-18 ore a 37°C.

Le colonie cresciute sono state scrinate mediante PCR.

L'estrazione del DNA plasmidico è stata effettuata tramite QIAGEN Plasmid Midi (QIAGEN).

PCR

Per amplificare i frammenti di DNA corrispondenti agli antigeni HBsAg mutanti clonati in pcDNA3.1 sono stati utilizzati 2 primers specifici per il plasmide:

- For -TGGGAGGTCTATATAAGCAGA-
- Rev -GCAACTAGAAGGCACAGTCGA-

in una miscela di reazione composta dal tampone di reazione (200mM Tris-HCl pH 8.4, 500mM KCl), 0,5 µM di ciascun oligonucleotide, 0,2 mM di una miscela dei quattro nucleotidi, e 1,25 U Taq DNA polimerasi (5U/µl) (Invitrogen) e 2mM di MgCl₂.

Le condizioni di amplificazione utilizzate sono le seguenti:

94° 5'
 94° 30''
 TD 60-50° 30'' } 35 cicli
 72 1'
 72 10'

I prodotti di amplificazione sono stati controllati su gel di agarosio (1%)

Sequenziamento automatico

I prodotti di PCR sono stati purificati dall'eccesso di primers e di nucleotidi non incorporati utilizzando gli enzimi EXO e SAP (ditta USB) tramite un ciclo di incubazione di 20' a 37°C e uno di 20' a 80°C.

Le reazioni di sequenziamento sono quindi state ottenute servendosi del kit specifico ABI PRISM

BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosistem) seguendo il protocollo consigliato dalla ditta e utilizzando i seguenti cicli di amplificazione:

96°C 5' 1 ciclo
 96°C 20'' }
 50°C 5'' } 25 cicli
 60°C 3' }

Il prodotto della reazione è stato purificato mediante il kit Montage SEQ96 Sequencing Reaction Cleanup (Montage) e addizionato di formammide, denaturato (3' a 95°C) ed infine caricato su piastra ottica per la successiva analisi al sequenziatore automatico.

Trasfezione

Il giorno prima della trasfezione le cellule HeLa/293T sono state piastrate in capsule Petri, in terreno DMEM + 10% FBS, alla concentrazione di 4×10^6 . Sono poi state trasfettate con metodo calcio/fosfato: 20 µg di DNA sono stati miscelati a 50 µl di CaCl₂ (0,2M) e portati al volume di 500 µl con acqua milli Q. Alla soluzione di calcio e DNA sono stati poi aggiunti goccia a goccia su vortex, 500 µl di tampone HBS (NaCl 280mM, Hepes 50mM, Na₂HPO₄ 1,5mM). La miscela di trasfezione (1ml finale) è stata aggiunta al terreno di coltura. I surnatanti sono stati analizzati dopo 72 ore dalla trasfezione.

Saggio ELISA

ETI-MAK-4 (DiaSorin)

Per valutare la positività all'HBsAg dei surnatanti ottenuti dopo la trasfezione, i campioni sono stati analizzati tramite un kit ELISA prodotto e fornito direttamente dalla ditta DiaSorin.

Il metodo per la determinazione qualitativa di HBsAg, di tipo immunoenzimatico si configura come un dosaggio *sandwich* diretto. La presenza di HBsAg media il legame del tracciante alla fase solida: l'attività enzimatica risulta pertanto proporzionale alla concentrazione di HBsAg presente nei campioni.

- **Pozzetto** sensibilizzato con anticorpi **anti-HBs** (monoclonali di topo)
- **Tracciante enzimatico:** anticorpo anti-HBs (pecora) coniugato con perossidasi di rafano (HRP)

La misura dell'attività enzimatica viene eseguita ponendo a contatto una soluzione incolore di cromogeno/substrato che, in seguito all'azione dell'enzima, produce una colorazione misurabile mediante fotometro.

Il protocollo seguito è quello consigliato dal kit.

Per dosare il contenuto in HBsAg dei vari surnatanti raccolti risultati positivi al primo screening, le assorbanze dei campioni sono state confrontate con quelle ottenute analizzando mediante lo stesso kit, una curva di sieri HBsAg positivi a concentrazione nota forniti dalla stessa

DIASORIN spa:

- ✓ 5,36ng/ml
- ✓ 1,89ng/ml
- ✓ 0,68ng/ml
- ✓ 0,21ng/ml

La curva è stata a sua volta determinata confrontando i valori delle assorbanze con quelli ottenuti analizzando un pannello di diluizioni di antigene HBsAg fornito dalla ditta BBI

Diagnostics:

- PHA808-11
- PHA808-12
- PHA808-14
- PHA808-16
- PHA808-18
- PHA808-19

1.4 RISULTATI

La ditta DiaSorin spa aveva già in commercio un kit diagnostico per HBV in grado di riconoscere la presenza del marker specifico HBsAg in sieri umani studiato per la tecnologia LIAISON. Tale kit si basava sull'utilizzo di 3 anticorpi monoclonali di topo diretti verso la regione variabile "a" della molecola HBsAg nella fase solida e di anticorpi policlonali di capra in grado di riconoscere entrambi i sottotipi Ad e Ay della molecola, direttamente marcati con il tracciante. Proprio l'uso di anticorpi diretti verso la porzione variabile dell'HBsAg rendeva il test poco sensibile per via dei numerosi mutanti del virus HBV individuati negli ultimi anni.

Studi di mercato hanno quindi indirizzato l'azienda verso lo sviluppo di un nuovo test con prestazioni migliori rispetto al vecchio sia per sensibilità che per specificità, in modo da rendersi più competitivi sul mercato internazionale.

Per prima cosa è stato indispensabile prevedere per il nuovo kit (che d'ora in avanti chiamerò kit prototipo) l'utilizzo di anticorpi che garantissero maggiore sensibilità al test. Questo è stato possibile attraverso la collaborazione con l'ALSI in Giappone, che ha messo a punto un nuovo pannello di 3 anticorpi monoclonali di topo in grado di riconoscere rispettivamente una porzione della regione variabile dell'HBsAg, un epitopo della regione idrofilica interna costante ed una porzione del dominio transmembrana.

<i>IgG ID</i>	<i>Use</i>	<i>a.a. epitope</i>	<i>HBs region</i>
5C3	Solid Phase	124-147 conformational	"a loop"
121	Solid Phase	151-170 linear	Transmembrane
163	Solid Phase	31-50 linear	Inner hydrophilic

Fig.11 Nome e caratteristiche dei tre anticorpi utilizzati nella fase solida del nuovo kit prototipo per HBsAg

Gli anticorpi forniti dall'ALSI hanno la peculiarità di mantenere la loro reattività nei confronti dell'antigene all'interno di un particolare buffer in grado di rompere le membrane lipidiche e quindi permette il legame antigene-anticorpo anche con le porzioni della proteina HBsAg che normalmente risulterebbero inaccessibili, poiché interne alla particella dell'HBV.

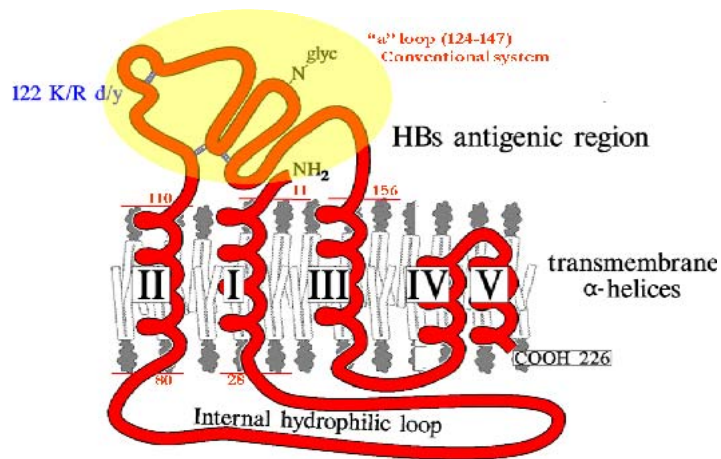


Fig.12 Rappresentazione schematica della proteina HBsAg del virus dell'Epatite B.

1.4.1 VALUTAZIONE DELLA CAPACITÀ DI LEGAME DEGLI ANTICORPI

Per ottenere performance ottimali della fase solida, le sole porzioni Fab degli anticorpi sono state coattate sulle micro particelle magnetiche dopo essere state biotinilate:

- 5C3 = Fab1
- 121 = Fab2
- 163 = Fab3

I tre anticorpi sono stati testati su LIAISON secondo il seguente schema:

- Fab 1 + micro particelle
- Fab 2 + micro particelle
- Fab 3 + micro particelle
- (Fab 1 + micro particelle)+(Fab 2 + micro particelle)+(Fab 3 + micro particelle)
- (Fab1+Fab2+Fab3)+micro particelle

utilizzando il protocollo base del test commerciale, su 5 campioni positivi e 5 negativi.

Il termine di riferimento è costituito da quanto ottenuto con il kit commerciale.

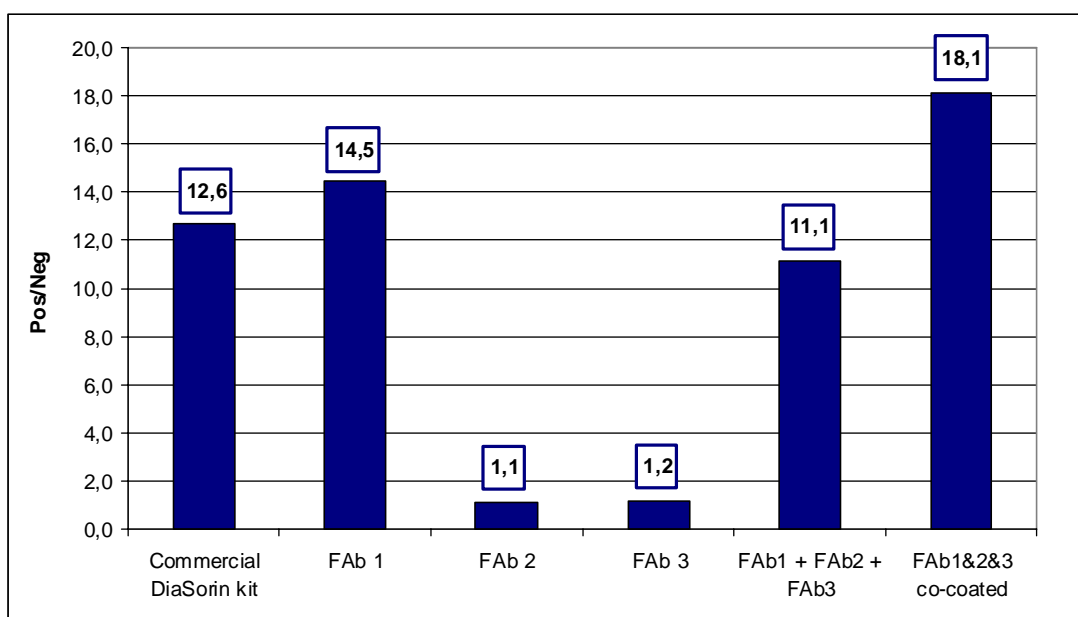


Fig. 13 Il grafico riporta i risultati ottenuti in termini di media RLUpos/media RLUneg

I risultati riportati nel grafico precedente (Fig.13) mostrano come l'utilizzo del solo Fab1 sia già in grado di migliorare le prestazioni del kit rispetto a quello commerciale (prima colonna). Utilizzando solo il Fab2 o solo il Fab3 il rapporto tra le RLUpos e RLUneg è molto basso come

atteso, infatti i due anticorpi che sono diretti verso la porzione transmembrana ed interna dell'HBsAg non sono in condizione di legare l'antigene. La quinta colonna mostra il risultato ottenuto dopo aver coattato i tre anticorpi separatamente sulle particelle creando solo successivamente una miscela di particelle. Come si può osservare il risultato è paragonabile con quello ottenuto con il kit commerciale. Il migliore risultato è stato ottenuto applicando una metodica che nei laboratori DiaSorin aveva già permesso di aumentare le performance di diversi kit diagnostici, ovvero utilizzare una miscela di anticorpi per coattare le particelle magnetiche (co-coating). Per questo motivo si è deciso di procedere nelle prove utilizzando questa metodica di coating nella messa a punto del nuovo kit prototipo per l'identificazione dell'HBsAg.

Per poter sfruttare la capacità del Fab2 e Fab3 di legare porzioni della proteina costanti per tutti le varianti del virus, l'ALSI ha sviluppato in contemporanea agli anticorpi un nuovo buffer (che d'ora in avanti chiamerò diluent) in grado di disgregare il doppio strato lipidico grazie all'utilizzo di ottimizzate percentuali di detergenti e rendere così disponibile all'attacco degli anticorpi anche le porzioni transmembrana e idrofilica interna dell'HBsAg. Gli stessi anticorpi sono quindi stati sviluppati secondo un protocollo coperto da brevetto, in modo da essere compatibili con i detergenti presenti nel buffer e mantenere la loro reattività nei confronti dell'antigene.

Per verificare le performance degli anticorpi nel nuovo diluent sono state fatte delle prove su LIAISON utilizzando il protocollo standard del kit commerciale analizzando 5 campioni positivi e cinque negativi secondo il seguente schema:

- 1- kit commerciale tal quale (coating-buffer-tracciante)
- 2- co-coating Fab1+Fab2+Fab3 e reagenti kit commerciale (buffer-tracciante)
- 3- kit commerciale (coating-tracciante) e nuovo buffer diluent
- 4- coating Fab1+Fab2+Fab3, nuovo buffer diluent e tracciante del kit commerciale

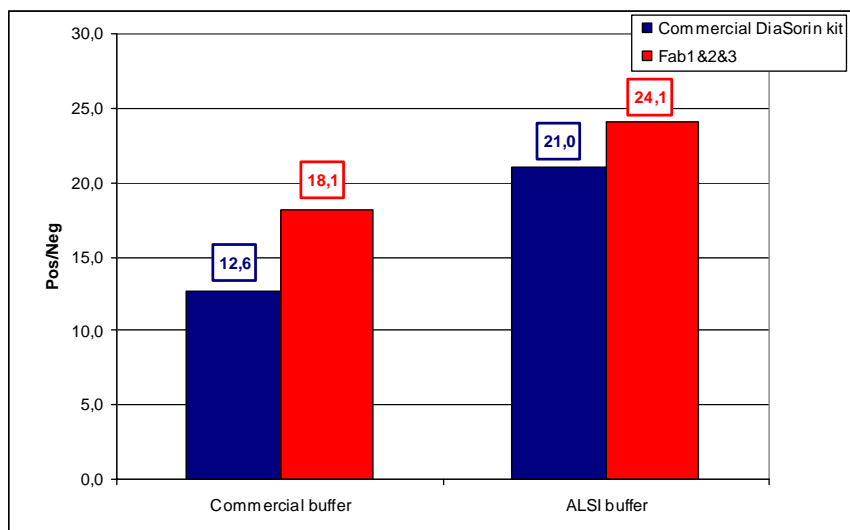


Fig. 14 Il grafico riporta i risultati ottenuti in termini di media RLUpos/media RLUneg

Come si può osservare nel grafico (Fig.14) l'utilizzo del nuovo buffer diluent, che di fatto permette l'esposizione degli epitopi transmembrana e idrofilico interno normalmente non disponibili al legame con anticorpi, ha migliorato in maniera evidente le prestazioni del test sia commerciale (in blu) sia prototipo (rosso) rispetto a quanto ottenuto con il buffer commerciale. Inoltre, osservando le due colonne di destra, il kit prototipo come atteso ha dato un risultato migliore rispetto a quanto ottenuto utilizzando il kit commerciale. Sebbene in questo caso la differenza possa sembrare minima, bisogna tenere conto del fatto che i 5 campioni positivi per HBsAg non fanno parte di un pannello di mutanti, analizzando il quale la differenza risulterebbe sicuramente più marcata.

1.4.2 VALUTAZIONE DELLA STABILITÀ DELLA FASE SOLIDA (CO-COATING)

Una volta verificata e messa a punto la formulazione del kit prototipo in termini di anticorpi utilizzati, diluent e assemblamento dell'integral prototipo, è stato necessario procedere con le tappe di validazione indispensabili per la successiva commercializzazione.

Per fare questo all'inizio è stato fondamentale verificare la stabilità del co-coating nel tempo.

I test di stabilità conformi alle metodiche interne aziendali prevedono l'analisi di 5 campioni positivi utilizzando il reagente da valutare, in questo caso la fase solida costituita dalle particelle magnetiche co-coattate con i tre anticorpi, dopo conservazione a 4°C (normale metodica di conservazione), a 37°C e a 45°C per 3 e 5 giorni.

Allo scadere di tale periodo di incubazione sono state lanciate le prove su LIASION utilizzando il protocollo standard del kit commerciale.

Il grafico sotto riportato mostra i risultati ottenuti dopo 5 giorni di conservazione alle tre temperature previste. Come si può osservare la fase solida non mostra perdite di reattività in seguito a shock termico, essendo i valori di RLU (Relative Light Units) rilevati dopo conservazione a 37°C e a 45°C del tutto paragonabili a quelli ottenuti dopo conservazione a 4°C. I dati relativi alla stabilità dopo conservazione a 37°C e 45°C per 3 giorni hanno fornito lo stesso risultato che dopo 5 giorni (dati non mostrati).

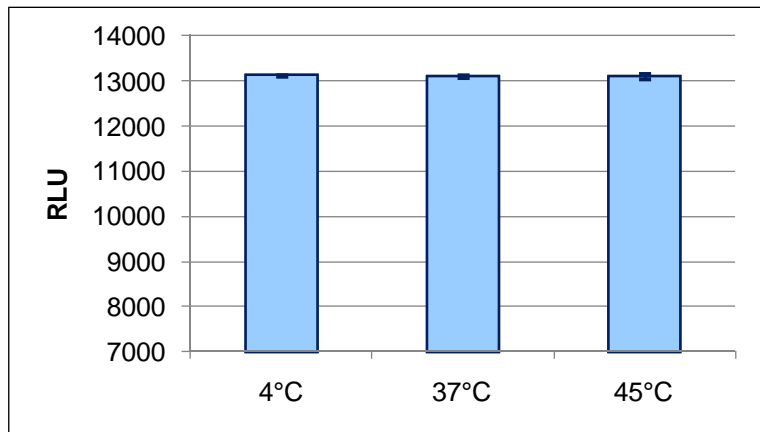


Fig. 15 Il grafico riporta i risultati ottenuti in termini RLU (Relative Light Units) media.

La stessa prova è stata condotta per valutare la stabilità del buffer diluent, utilizzando particelle magnetiche co-coattate con i tre nuovi anticorpi, analizzando 5 campioni HBsAg positivi. Anche in questo caso il risultato delle tre prove è stato del tutto paragonabile dimostrando un'ottima stabilità anche del diluent. (dati non mostrati)

1.4.3 CONSEGUIMENTO DEL MARCHIO CE

Dopo aver verificato la stabilità dei reagenti da utilizzare nel kit prototipo (che d'ora in avanti chiameremo LIAISON XL), per garantirsi la possibilità, una volta lanciato sul mercato il kit LIAISON XL, di poterlo commercializzare nei paesi appartenenti alla Comunità Europea è stato necessario validarlo in base a quanto specificato in un decreto della Commissione Europea: 2009/565/CE riguardante le caratteristiche fondamentali di sensibilità e specificità dei test diagnostici. (ALLEGATO 1)

Nella tabella sottostante sono riportate le richieste di validazione riguardanti i test diagnostici per HBsAg.

Diagnostic sensitivity	Positive specimens	400 Including subtype-consideration
	Seroconversion panel	20 panels 10 further panels (at Notified Body or manufacturer)
Analytical sensitivity	Standards	0,130 IU/ml (Second International Standard for HBsAg, subtype adw2, genotype A NIBSC code: 00/588)
Specificity	Unselected donors (including first-time donors)	5000
	Hospitalised patients	200
	Potentially cross-reacting blood-specimens (RF+, related viruses, pregnant women, etc.)	100

Fig. 16 La tabella tratta dall'ALLEGATO 1 riporta le condizioni di validazione di test diagnostici per HBsAg. Sono colorate le caselle relative alle analisi di seguito riportate

“Diagnostic sensitivity-Positive specimens”

Campioni di pazienti sieropositivi per HBsAg sono stati raccolti presso i laboratori BIOMNIS-Lione, Francia, con cui la DiaSorin collabora per la realizzazione di numerosi progetti.

I metodi di riferimento utilizzati in questa serie di analisi, indispensabili come conferma dei dati presentati, sono stati Roche Modular E 170 HBsAg II o Abbot ARCHITECT HBsAg.

Nello specifico sono stati analizzati con il kit LIAISON XL un totale di 424 campioni HBsAg positivi, 61 dei quali classificati come sottotipo Ay, 25 come sottotipo Ad.

Oltre a questi sono stati analizzati:

- 22 campioni con sottotipo definito, raccolti e conservati nel deposito DiaSorin
- HBsAg Qualification Panel, Seracare BBI - QHA711 (ALLEGATO 2)
- HBV Genotype Performance Panel, Seracare BBI - PHD350 (ALLEGATO 3)
- HBsAg Low Titer Performance Modified Panel, Seracare BBI - PHA106(M) (ALLEGATO 4)
- HBsAg Mixed Titer Performance Panel, Seracare BBI - PHA206 (ALLEGATO 5)

I risultati sono stati valutati secondo i seguenti parametri:

- campioni con concentrazione inferiore a 0,05 IU/mL sono stati classificati come negativi (non reactive)
- campioni con concentrazione uguale o maggiore di 0,05 IU/mL sono stati classificati come positivi (reactive)

A. Campioni sieropositivi

I 424 campioni sieropositivi per HBsAg raccolti presso i laboratori BIOMNIS a Lione, sono stati analizzati utilizzando la tecnologia LIAISON con il kit LIAISON XL. Tutti i risultati sono stati paragonati con quelli ottenuti utilizzando le metodiche di riferimento (Roche Modular E 170 HBsAg II o Abbot ARCHITECT HBsAg).

LIAISON XL	Reference method		Total
	Positive	Negative	
Positive	424	0	424
Negative	0	0	0
Total	424	0	424

Diagnostic sensitivity	95% confidence interval
100% (424/424)	99.14 – 100.0%

Fig. 17 La tabella mostra i risultati ottenuti relativamente ai campioni sieropositivi. Sotto è inoltre riportata la sensibilità diagnostica con il relativo intervallo di tolleranza

Come si può chiaramente osservare nella tabella (Fig. 17), i campioni analizzati con il kit LIAISON XL hanno fornito risultati del tutto concordi con quelli ottenuti con i metodi di riferimento, dimostrando una sensibilità del 100%.

Per completezza nel grafico successivo sono mostrate le frequenze di distribuzione dei campioni nei diversi intervalli di concentrazione.

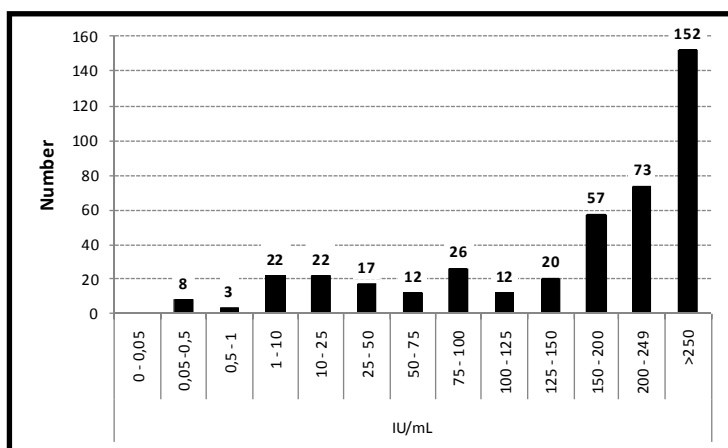


Fig. 18 Il grafico mostra il numero di campioni (y) rispetto alla concentrazione di HBsAg (x) in termini di IU/mL (International Units/mL)

B. Campioni con sottotipo definito

22 campioni precedentemente tipizzati presso la DiaSorin spa mediante metodiche certificate interne, sono stati analizzati con il kit LIAISON XL ed le metodiche di riferimento (expected positive).

Come si può osservare nella tabella seguente (Fig. 19) tutti i campioni sono stati valutati come positivi dal test, ovvero la loro concentrazione è stata definita come uguale o superiore a 0,05 IU/ml.

Antigen Subtype	Number of samples	Expected positive	LIAISON XL positive results
ad	6	6	6/6
ay	6	6	6/6
Ayw2	1	1	1/1
Ayw4	1	1	1/1
Adq4w-	1	1	1/1
Adrq-	1	1	1/1
Ayw3+?	1	1	1/1
Ayw1	1	1	1/1
Adrq+1	1	1	1/1
Ayw3	1	1	1/1
Adw2	1	1	1/1
Ayr	1	1	1/1
Total	22	22	22/22 (100%)

Fig. 19 La tabella mostra i risultati ottenuti relativamente ai campioni con sottotipo definito.

C. HBsAg Qualification panel QHA711

Questo pannello fornito dalla Seracare BBI è costituito da 6 campioni, 5 dei quali a reattività nota in test per la presenza di HBsAg ed un negativo. I risultati ottenuti analizzando questo pannello con il kit LIAISON XL sono riportati nella tabella sottostante (Fig. 20).

Tutti i campioni hanno mostrato reattività nell'analisi tranne l'unico campione negativo che è risultato non reattivo come atteso.

Panel ID	Antigen Subtype	HBsAg reactivity	LIAISON XL IU/mL
QHA711-06	ay	Reactive	1,3 (+)
QHA711-05	ad	Reactive	3,5 (+)
QHA711-04	ay	Reactive	0,83 (+)
QHA711-03	nrg	Nonreactive	0,00 (-)
QHA711-02	ad	Reactive	4,3 (+)
QHA711-01	ad	Reactive	1,4 (+)

Fig. 20 La tabella mostra i risultati ottenuti relativamente ai campioni del pannello QHA711. in grigio è evidenziato il campione negativo.

D. HBV Genotype Performance Panel PHD350

Questo pannello è composto da campioni di plasma di pazienti infettati da diversi genotipi di HBV.

I campioni analizzati con il kit LIAISON XL hanno fornito i risultati riportati nella tabella (Fig. 21) che sono del tutto concordanti con quanto atteso.

Panel ID	HBV Genotype	LIAISON XL IU/mL
PHD350-15	B	29 (+)
PHD350-14	B	100 (+)
PHD350-13	A	1,9 (+)
PHD350-12	H	>250 (+)
PHD350-11	G	>250 (+)
PHD350-10	F	>250 (+)
PHD350-09	C	>250 (+)
PHD350-08	E	>250 (+)
PHD350-07	E	>250 (+)
PHD350-06	E	>250 (+)
PHD350-05	A	230 (+)
PHD350-04	C	>250 (+)
PHD350-03	F	220 (+)
PHD350-02	D	>250 (+)
PHD350-01	D	>250 (+)
Total	15	

Fig. 21 La tabella mostra i risultati ottenuti relativamente ai campioni del pannello PHD350.

E. HBsAg Low Titer Performance Modified Panel

Questo pannello è costituito da 12 campioni di plasma con concentrazione di HBsAg prossima ai limiti di sensibilità del test (0,05 IU/ml) e comprende inoltre un campione non reattivo incluso come controllo negativo.

I risultati ottenuti analizzando questi campioni con il kit LIAISON XL sono riportati nella tabella seguente (Fig. 22) insieme a quelli ottenuti con le metodiche di riferimento.

Panel ID	LIAISON XL IU/mL	HBsAg IU/mL*	ABBOTT ARCHITECT S/CO	ROCHE COBAS S/CO
PHA106-13	0,28 (+)	0,3	6,4 (+)	3,3 (+)
PHA106-12	0,067 (+)	0,1	2,6 (+)	1,3 (+)
PHA106-11	0,4 (+)	0,2	7,6 (+)	1,3 (+)
PHA106-10	0,5 (+)	0,4	6,2 (+)	2,9 (+)
PHA106-09	0,16 (+)	0,1	2,6 (+)	1,5 (+)
PHA106-08	0,36 (+)	0,4	6 (+)	3 (+)
PHA106-07	0,00 (-)	***	***	***
PHA106-06	0,61 (+)	0,6	6,8 (+)	5,1
PHA106-05	0,13 (+)	0,1	1,4 (+)	1,0 (+)
PHA106-04	0,33 (+)	0,3	2,8 (+)	2,6 (+)
PHA106-03	0,42 (+)	0,4	4,4 (+)	4,1 (+)
PHA106-02	0,14 (+)	0,1	2,6 (+)	1,2 (+)
PHA106-01	0,11 (+)	0,05	1,2 (+)	0,7

Fig. 22 La tabella mostra i risultati ottenuti relativamente ai campioni del pannello PHA106. In grigio è evidenziato il campione negativo.

In particolare i risultati ottenuti con i metodi di riferimento sono la media di due analisi espressa come segnale su cut off (s/co). Un valore maggiore o uguale a 1.0 è da considerarsi come positivo.

Tutti i campioni analizzati con il kit LIAISON XL hanno fornito un risultato concorde con quanto ottenuto con almeno uno dei metodi di riferimento.

F. HBsAg Mixed Titer Performance Panel PHA206

Questo pannello è costituito da 23 campioni di plasma provenienti da pazienti che hanno contratto naturale infezione da HBV, con una reattività che va da debole (0,1 per ARCHITECT) a forte (2,7 per ARCHITECT). Sono inclusi inoltre due campioni negativi come controllo.

Nella tabella (Fig. 23) sotto riportata sono mostrati i risultati ottenuti analizzando questi campioni con il kit LIAISON XL, mentre i dati relativi ai metodi di riferimento sono trascritti come riportati dal data sheet del pannello.

Panel ID	LIAISON XL IU/mL	ABBOTT ARCHITECT IU/mL	ROCHE COBAS S/CO	Bayer Advia Centaur Index
PHA206-25	0,00 (-)	0 (-)	0,2 (-)	0,1 (-)
PHA206-24	0,075 (+)	0,1 (+)	1,2 (+)	2,6 (+)
PHA206-23	0,15 (+)	0,1 (+)	2,1 (+)	4,5 (+)
PHA206-22	0,1 (+)	0,1 (+)	0,5 (-)	1,6 (+)
PHA206-21	0,54 (+)	0,5 (+)	5,7 (+)	14,3 (+)
PHA206-20	0,37 (+)	0,3 (+)	4,6 (+)	6,5 (+)
PHA206-19	0,48 (+)	0,4 (+)	2,7 (+)	9,8 (+)
PHA206-18	0,69 (+)	0,2 (+)	2,2 (+)	8,5 (+)
PHA206-17	0,13 (+)	0,1 (+)	1,2 (+)	2,7 (+)
PHA206-16	0,21 (+)	0,3 (+)	4,9 (+)	4,2 (+)
PHA206-15	0,36 (+)	0,3 (+)	3,6 (+)	12,5 (+)
PHA206-14	0,71 (+)	0,7 (+)	7,8 (+)	15,8 (+)
PHA206-13	0,7 (+)	0,8 (+)	10,6 (+)	25,7 (+)
PHA206-12	0,7 (+)	1,2 (+)	16 (+)	28,4 (+)
PHA206-11	0,84 (+)	0,8 (+)	9,8 (+)	27,5 (+)
PHA206-10	0,43 (+)	0,8 (+)	10,8 (+)	16,3 (+)
PHA206-09	2,1 (+)	2,7 (+)	32,8 (+)	48,4 (+)
PHA206-08	3 (+)	2 (+)	25,3 (+)	66,2 (+)
PHA206-07	4,1 (+)	2,7 (+)	44,6 (+)	81,8 (+)
PHA206-06	>250 (+)	>250 (+)	74,5 (+)	>1000 (+)
PHA206-05	>250 (+)	>250 (+)	74,5 (+)	>1000 (+)
PHA206-04	>250 (+)	>250 (+)	74,5 (+)	>1000 (+)
PHA206-03	2,7 (+)	3,4 (+)	47,4 (+)	59,9 (+)
PHA206-02	5,6 (+)	4,2 (+)	59 (+)	150,9 (+)
PHA206-01	0,00 (-)	0 (-)	0,2 (-)	<0,1 (-)

Fig. 23 La tabella mostra i risultati ottenuti relativamente ai campioni del pannello PHA206. In grigio sono evidenziati i due campioni negativi, mentre in rosa un campione considerato negativo con il metodo COBAS-ROCHE

Anche in questo caso tutti i risultati ottenuti con il kit LIAISON XL sono in linea con quanto atteso.

Diagnostic sensitivity	Positive specimens	400 Including subtype-consideration
	Seroconversion panel	20 panels 10 further panels (at Notified Body or manufacturer)
Analytical sensitivity	Standards	0,130 IU/ml (Second International Standard for HBsAg, subtype adw2, genotype A NIBSC code: 00/588)
Specificity	Unselected donors (including first-time donors)	5000
	Hospitalised patients	200
	Potentially cross-reacting blood-specimens (RF+, related viruses, pregnant women, etc.)	100

Fig. 24 La tabella tratta dall'ALLEGATO 1 riporta le condizioni di validazione di test diagnostici per HBsAg. Sono colorate le caselle relative alle analisi di seguito riportate

Diagnostic sensitivity-Seroconversion panel

32 pannelli di sieroconversioni sono stati acquistati da due diversi fornitori: Seracare BBI e Zeptometrix. Questi pannelli rappresentano singoli campioni (sottotipi Ad o Ay). Ogni pannello comprende un diverso numero di campioni di plasma provenienti da singoli donatori raccolti ad intervalli intorno al tempo di sieroconversione ed include campioni critici con una bassa concentrazione di HBsAg per un totale di 261 campioni che sono stati testati con il kit LIAISON XL e con il metodo di riferimento Abbot ARCHITECT HBsAg, mentre i dati relativi alla metodica Ortho EIA sono riportati dal data sheet.

I risultati ottenuti con il kit LIAISON XL sono stati considerati come segue:

- campioni con concentrazione al di sotto di 0,05 IU/ml sono stati considerati come non reattivi ovvero negativi al test
- campioni con concentrazione uguale o superiore a 0,05 IU/ml sono stati considerati come reattivi ovvero positivi al test.

Il criterio di accettabilità concordato con l'ufficio marketing dell'azienda per il kit LIAISON XL era che fosse in grado di individuare l'infezione da Epatite B nei primi momenti della sieroconversione, ovvero di identificare i campioni positivi in maniera paragonabile al metodo di riferimento.

Il criterio di accettabilità definito dal decreto della Commissione Europea è che il test diagnostico non debba mai fornire risultati totalmente negativi per tutti i punti di una singola sieroconversione.

I risultati ottenuti sono presentati nella tabella (Fig. 25) in fondo alla quale è indicato uno score di sensibilità per ogni test utilizzato, ovvero la somma di tutti i campioni positivi rilevati tra i diversi punti delle sieroconversioni. Come si può osservare nella tabella, il kit LIAISON XL ha sempre riconosciuto come positivo almeno un punto per ogni sieroconversione, inoltre il totale di positivi rilevati è paragonabile con il metodo di riferimento, come richiesto dai criteri di accettabilità definiti per questa prova.

Panel ID	samples	DiaSorin Kit LIAISON XL	Abbot ARCHITECT	Ortho EIA
		Positive samples	Positive samples	Positive samples
PHM904	3	2	2	1
PHM906	5	4	4	3
PHM908	8	3	3	2
PHM909	6	4	3	2
PHM910	6	4	4	3
PHM912	9	2	2	2
PHM917	3	1	1	1
PHM918	3	2	2	1
PHM920	6	4	4	4
PHM921	6	6	6	6
PHM924	5	3	3	2
PHM925	5	3	3	2
PHM926	8	6	5	3
PHM927	6	5	5	3
PHM928	7	4	4	3
PHM929	9	5	5	3
PHM930	5	4	4	3
PHM931	6	4	4	2
PHM932	16	8	7	7
PHM933	5	4	4	3
PHM934	6	6	6	5
PHM935A	15	10	9	9
6271	5	3	3	3
6272	25	7	6	3
6274	7	6	6	6
6275	7	3	3	3
6276	8	1	1	2
6277	9	2	3	2
6279	7	3	3	1
6283	11	3	4	4
6284	19	7	7	7
6285	15	6	6	6
Score	-	135	132	107

Fig. 25 La tabella mostra i risultati ottenuti relativamente alle sier conversionsi del pannello PHM e Zeptomatrix

Diagnostic sensitivity	Positive specimens	400 Including subtype-consideration
	Seroconversion panel	20 panels 10 further panels (at Notified Body or manufacturer)
Analytical sensitivity	Standards	0,130 IU/ml (Second International Standard for HBsAg, subtype adw2, genotype A NIBSC code: 00/588)
Specificity	Unselected donors (including first-time donors)	5000
	Hospitalised patients	200
	Potentially cross-reacting blood-specimens (RF+, related viruses, pregnant women, etc.)	100

Fig. 26 La tabella tratta dall'ALLEGATO 1 riporta le condizioni di validazione di test diagnostici per HBsAg. Sono colorate le caselle relative alle analisi di seguito riportate

Specificity- Unselected donors

I campioni per questo studio sono stati raccolti presso due siti francesi: 2661 presso Rouen-Bois Guillaume e 2540 presso Lille per un totale di 5201 sieri, mentre il metodo di riferimento è stato Abbot PRISM HBsAg assay .

Tutti i campioni sono stati analizzati con il kit LIAISON XL e i risultati ottenuti sono stati considerati come segue:

- campioni con concentrazione al di sotto di 0,05 IU/ml sono stati considerati come non reattivi ovvero negativi al test
- campioni con concentrazione uguale o superiore a 0,05 IU/ml sono stati considerati come reattivi ovvero positivi al test.

Il criterio di accettabilità è una specificità diagnostica del 99.9%.

LIAISON XL	Expected results			Total
	Positive	Indeterm.	Negative	
Positive	0	0	1	1
Negative	0	0	5200	5200
Total	0	0	5201	5201

Diagnostic specificity	95% confidence interval
99.98% (5200/5201)	99.89 – 100.00%

Fig. 27 La tabella mostra i risultati ottenuti relativamente ai campioni di donatori sani. Sotto è inoltre riportata la sensibilità diagnostica con il relativo intervallo di tolleranza

Come si può vedere nella tabella (Fig. 27) il kit LIAISON XL ha rilevato un campione discorde rispetto al metodo di riferimento, ma il criterio di accettabilità è stato comunque raggiunto.

Diagnostic sensitivity	Positive specimens	400 Including subtype-consideration
	Seroconversion panel	20 panels 10 further panels (at Notified Body or manufacturer)
Analytical sensitivity	Standards	0,130 IU/ml (Second International Standard for HBsAg, subtype adw2, genotype A NIBSC code: 00/588)
Specificity	Unselected donors (including first-time donors)	5000
	Hospitalised patients	200
	Potentially cross-reacting blood-specimens (RF+, related viruses, pregnant women, etc.)	100

Fig. 28 La tabella tratta dall'ALLEGATO 1 riporta le condizioni di validazione di test diagnostici per HBsAg. Sono colorate le caselle relative alle analisi di seguito riportate

I campioni necessari per testare il kit LIAISON XL su di una popolazione aperta e rispetto possibili cross-reattivi, sono stati raccolti presso differenti siti:

- Pazienti ospedalizzati, BIOMNIS – Lione, Francia
- Pazienti in dialisi, BocaBiologics – Coconut Creek, FL, USA o BIOMNIS – Lione, Francia
- Donne in gravidanza, ProMedDx – Norton, MA, USA
- Popolazione di soggetti ad alto rischio, Bay State Biologicals – Franklin, MA, USA
- Campioni potenzialmente cross-reattivi, TRINA Bioreactives – Naenikon, Zurigo, Svizzera o BIOMNIS – Lione, Francia

I metodi utilizzati come riferimento in questo studio sono stati ETI-MAK-4 o LIAISON HBsAg (kit commerciale) entrambi della DiaSorin. I risultati ottenuti con il kit LIAISON XL sono stati considerati come segue:

- campioni con concentrazione al di sotto di 0,05 IU/ml sono stati considerati come non reattivi ovvero negativi al test

- campioni con concentrazione uguale o superiore a 0,05 IU/ml sono stati considerati come reattivi ovvero positivi al test.

I criteri di accettabilità per la specificità diagnostica su di una popolazione aperta sono del 99,5%.

Specificity- Hospitalised patients

LIAISON XL	Reference method		
	Positive	Negative	Total
Positive	4	0	4
Negative	0	386	386
Total	4	386	390

Diagnostic specificity	95% confidence interval
100.0% (386/386)	99.05 – 100.0%

Fig. 29 La tabella mostra i risultati ottenuti relativamente ai campioni di pazienti ospedalizzati. Sotto è inoltre riportata la sensibilità diagnostica con il relativo intervallo di tolleranza

Specificity- Potentially cross-reacting blood-specimens

Pregnant women

LIAISON XL	Reference method		Total
	Positive	Negative	
Positive	0	0	0
Negative	0	100	100
Total	0	100	100

Diagnostic specificity	95% confidence interval
100% (100/100)	96.38 – 100%

Fig. 30 La tabella mostra i risultati ottenuti relativamente ai campioni di donne in gravidanza. Sotto è inoltre riportata la sensibilità diagnostica con il relativo intervallo di tolleranza

Dialysis patients

LIAISON XL	Reference method			Total
	Positive	Indeterm.	Negative	
Positive	2	1	0	3
Negative	0	0	275	275
Total	2	1	275	278

Diagnostic specificity	95% confidence interval
99.64% (277/278)	98.00 – 100.0%

Fig. 31 La tabella mostra i risultati ottenuti relativamente ai campioni di pazienti in dialisi. Sotto è inoltre riportata la sensibilità diagnostica con il relativo intervallo di tolleranza

High Risk Subject Population

LIAISON XL	Reference method			Total
	Positive	Indeterm.	Negative	
Positive	4	0	1	5
Negative	0	0	138	138
Total	4	0	139	143

Diagnostic specificity	95% confidence interval
99.28% (138/139)	96.05 – 99.98%

Fig. 32 La tabella mostra i risultati ottenuti relativamente ai campioni di una popolazione a rischio. Sotto è inoltre riportata la sensibilità diagnostica con il relativo intervallo di tolleranza

Come si può osservare nelle tabelle sopra riportate (Fig. 29-32) relative ai risultati ottenuti sulla popolazione aperta, il kit LIAISON XL ha dimostrato una specificità diagnostica media del 99,73% , ovvero nell'intervallo di accettabilità richiesto.

Cross Reactions

Il kit LIAISON XL è stato infine utilizzato per analizzare campioni di plasma prelevati da pazienti aventi malattie causate da patogeni potenzialmente cross-reattivi, come testimoniato da quanto riportato sui data sheet di diversi test diagnostici per HBsAg sul mercato. La tabella (Fig.33) mostra assenza di cross-reazioni in tutti i campioni analizzati.

Condition	Number of expected negative samples	LIAISON XL positive result
Parvovirus B19	15	0
Rubella virus	15	0
VZV	14	0
EBV VCA	15	0
HSV-1/2	11	0
Toxoplasma	10	0
Borrelia	7	0
CMV	10	0
Anti-nuclear (ANA)	10	0
Syphilis total Ab	16	0
HAV total Ab	7	0
HIV Ag / Ab	14	0
HCV total Ab	6	0
HAMA	20	0
HTLV-I/II (+)	8	0
Rheumatoid factor	8	0
Total	186	0

Fig. 33 La tabella mostra i risultati ottenuti relativamente ai campioni di pazienti con patologie potenzialmente cross-reattive.

Infine per completare la validazione del kit è stato necessario verificare la sua reattività anche rispetto ad un pannello di mutanti dell'HBsAg. In letteratura sono ormai documentate diverse mutazioni dell'antigene HBsAg ed è proprio nel riconoscere queste che molti test già sul mercato risultano poco sensibili.

Per dimostrare che il kit LIAISON XL fosse in grado di riconoscere come positivi campioni di sieri di pazienti infettati da ceppi mutanti di HBV, come dovrebbe essere dal momento che gli anticorpi utilizzati nella fase solida sono rivolti verso la porzione costante della proteina antigenica, si è deciso di produrre un pannello di 10 tra i più comuni mutanti identificati ricombinanti. La decisione di produrre mutanti ricombinanti deriva dalla oggettiva difficoltà di reperire campioni naturali di sieri contenenti l'antigene mutato.

La DiaSorin ha quindi richiesto il clonaggio di 10 mutanti identificati dal marketing come i più significativi, all'interno di un vettore di espressione che permettesse la produzione delle proteine ricombinanti da una linea cellulare eucariotica. L'obiettivo richiesto è stato di consegnare all'azienda 30 ml di surnatante di coltura con concentrazione di antigene ricombinante di 1 µg/ml.

1.4.4 SUBCLONAGGIO DEL CDNA CODIFICANTE 10 DIVERSI MUTANTI DELL'HBsAg IN UN VETTORE DI ESPRESSIONE EUCARIOTICA.

MUTAZIONE	PANEL ID
HBsAg T123N	# 1/10
HBsAg T123N-T124S	# 2/10
HBsAg P142L-F/Y143H-D144E-G145R	# 3/10
HBsAg I110R-S117I-G119R-T123N	# 4/10
HBsAg 122+DT	# 5/10
HBsAg 122+DT-G145R	# 6/10
HBsAg G145R	# 7/10
HBsAg D144A	# 8/10
HBsAg P142L-G145R	# 9/10
HBsAg P142S-G145R	# 10/10

Fig. 34 In tabella sono elencati i 10 mutanti utilizzati per lo studio, la codifica utilizzata e la mutazione.

I 10 mutanti elencati nella tabella (Fig.34) sono stati forniti dalla ditta DiaSorin clonati nel vettore di espressione pGA4.

Per sub-clonare i mutanti dell'antigene HBsAg nel vettore di espressione eucariotica pcDNA3.1 è stato innanzitutto necessario individuare gli enzimi di restrizione migliori.

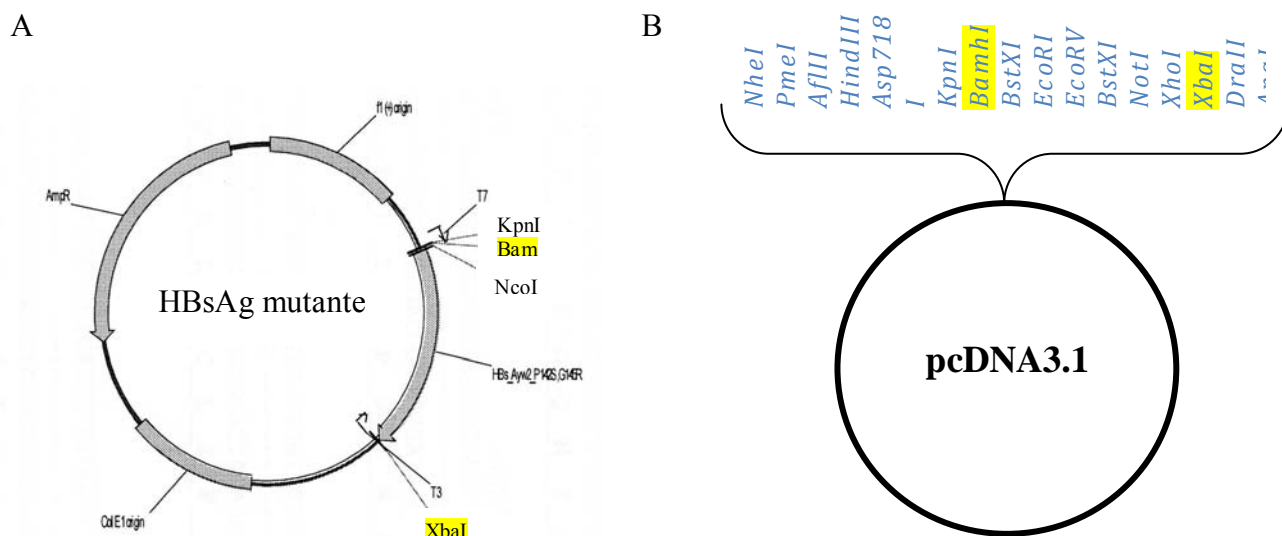


Fig. 35 La figura A rappresenta uno schema del clonaggio dei 10 mutanti HBsAg in pGA4. In giallo sono evidenziati gli enzimi di restrizione scelti per il sub clonaggio in pcDNA3.1 B) Rappresenta uno schema del polylinker di pcDNA3.1 con evidenziati in giallo gli enzimi di restrizione scelti per il sub clonaggio dei 10 mutanti HBsAg.

Una volta scelti come enzimi per il clonaggio BamHI e XbaI:

- Entrambi i DNA sono stati digeriti;
- Gli inserti codificanti per i mutanti HBsAg e i vettori pcDNA3.1 sono stati purificati da gel;
- Inserti e vettori sono stati ligati;
- con il prodotto di ligazione sono stati trasformati batteri competenti fatti crescere su terreno selettivo;
- le colonie cresciute sono state analizzate tramite PCR utilizzando primers specifici per pcDNA3.1. (Fig.2)

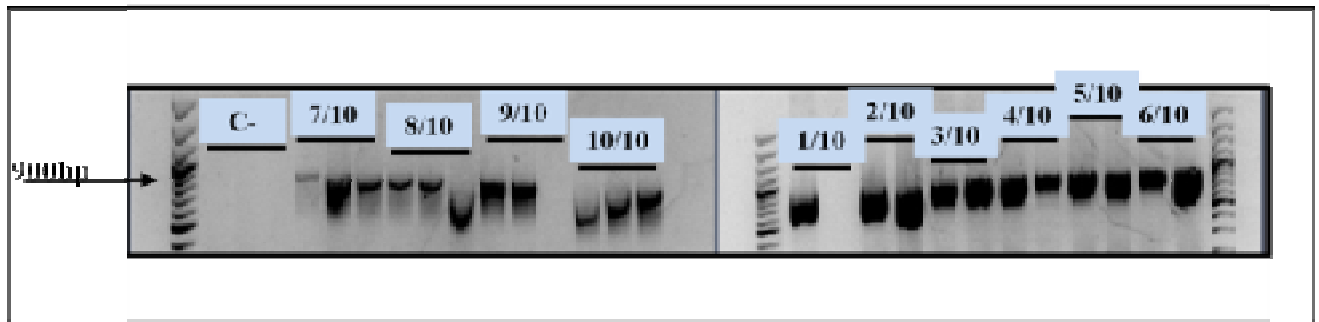


Fig. 36 In figura è mostrato il risultato delle PCR effettuate su 24 colonie cresciute su terreno selettivo, 3 per i mutanti 7-8-9-10/10 e 2 per i mutanti 1-2-3-4-5-6/10. Le bande presenti all'altezza di 900 bp indicano che la colonia è da considerarsi positiva.

La lunghezza attesa dell'amplificato era di circa 900 bp tenendo conto della posizione di appaiamento dei primers sul vettore e dell'effettiva lunghezza dell'inserto. Quasi tutte le colonie analizzate sono risultate positive. Una colonia positiva per ogni mutante è stata fatta crescere su terreno selettivo ed è stato estratto il DNA plasmidico.

Il risultato finale è il clonaggio della regione codificante per i 10 mutanti dell'HBsAg nel vettore di espressione eucariotico pcDNA3.1

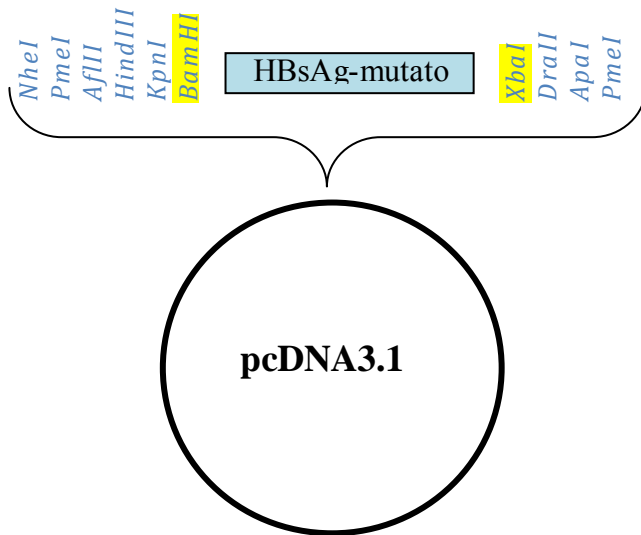


Fig.37 La figura mostra lo schema del subclonaggio del cDNA codificante le proteine mutanti HBsAg.

Identificazione della linea eucariotica che meglio si presta alle condizioni di espressione delle proteine ricombinanti dell'HBsAg

Per esprimere i mutanti HBsAg è stato necessario identificare la linea cellulare eucariotica che desse i migliori risultati di espressione in termini di concentrazione della proteina dopo trasfezione.

Sono quindi state trasfettate tre diverse linee cellulari eucariotiche: HeLa, 293T, HepG2 (le prime due abitualmente utilizzate nel nostro laboratorio per il clonaggio di diversi costrutti ricombinanti; le ultime, in quanto derivanti da una linea epatocitaria) con il DNA codificante per la proteina ricombinante HBsAg-G145R portatrice della più comune mutazione documentata. A 48 ore dalla trasfezione il surnatante raccolto è stato analizzato mediante il kit ELISA ETIMAK-4 fornito dalla DiaSorin, in grado di rilevare la presenza dell'antigene HBsAg.

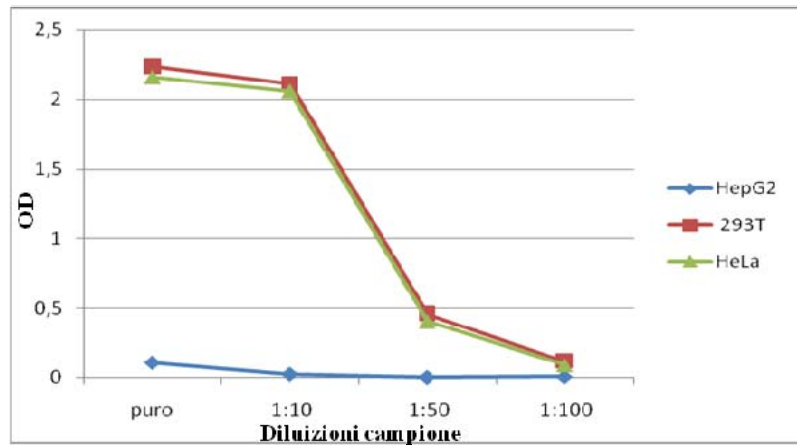


Fig. 38 Il grafico mostra l'espressione della proteina HBsAg-G145R in tre linee cellulari eucariotiche (HeLa; 293T; HepG2) sotto forma di assorbanza valutata tramite ETIMAK-4.

Tutti i campioni sono stati analizzati puri e diluiti 1:10, 1:50 e 1:100 per poter meglio discriminare il segnale nel caso in cui il puro risultasse a plateau.

Il grafico sopra riportato (Fig. 38) evidenzia come la linea cellulare epatocitaria HepG2 esprima livelli molto bassi della proteina d'interesse essendo il valore dell'assorbanza rilevato leggermente al di sopra del valore soglia ($OD = 0,04$) solo nel campione puro. Per quanto riguarda invece le linee HeLa e 293T si può osservare una buona e del tutto confrontabile capacità di espressione della proteina ricombinante essendo tutti valori delle assorbanze superiori al valore soglia del kit anche nella diluizione 1:100. Essendo però ipotizzabile la realizzazione a lungo termine di cloni stabili esprimenti i mutanti HBsAg per poter garantire una fonte continua di queste molecole ricombinanti, sono state scelte le HeLa come linea cellulare più adatta, in quanto le 293T sono solo debolmente adese alla plastica e per tale ragione meno adatte allo scopo.

Valutazione della migliore tempistica di trasfezione per ottenere la concentrazione maggiore di proteina ricombinante nel surnatante.

Una volta identificata nelle HeLa la linea cellulare da utilizzare per l'espressione dei mutanti HBsAg, è stato necessario mettere a punto anche la tempistica di trasfezione, al fine di ottenere la migliore resa in produzione delle proteine ricombinanti. Infatti se è vero che con il passare del tempo le proteine ricombinanti si accumulano nel surnatante di coltura delle cellule trasfettate, è anche possibile che con il tempo vengano degradate e quindi la concentrazione risulti infine più bassa. Inoltre dopo la trasfezione le cellule continuano a replicarsi ma dopo circa 72 ore comunque iniziano ad andare incontro a morte, cosa che rende sconsigliabile proseguire la coltura per via del rilascio nel surnatante di numerose proteasi. Le cellule sono quindi state piastrate e trasfettate con quattro dei mutanti HBsAg (7-8-9-10/10) ed i surnatanti raccolti dopo 24-48-72 ore dalla trasfezione per ogni mutante testato.

I livelli di espressione delle proteine ricombinanti sono quindi stati valutati per mezzo del kit ELISA ETIMAK-4 fornito dalla ditta DiaSorin.

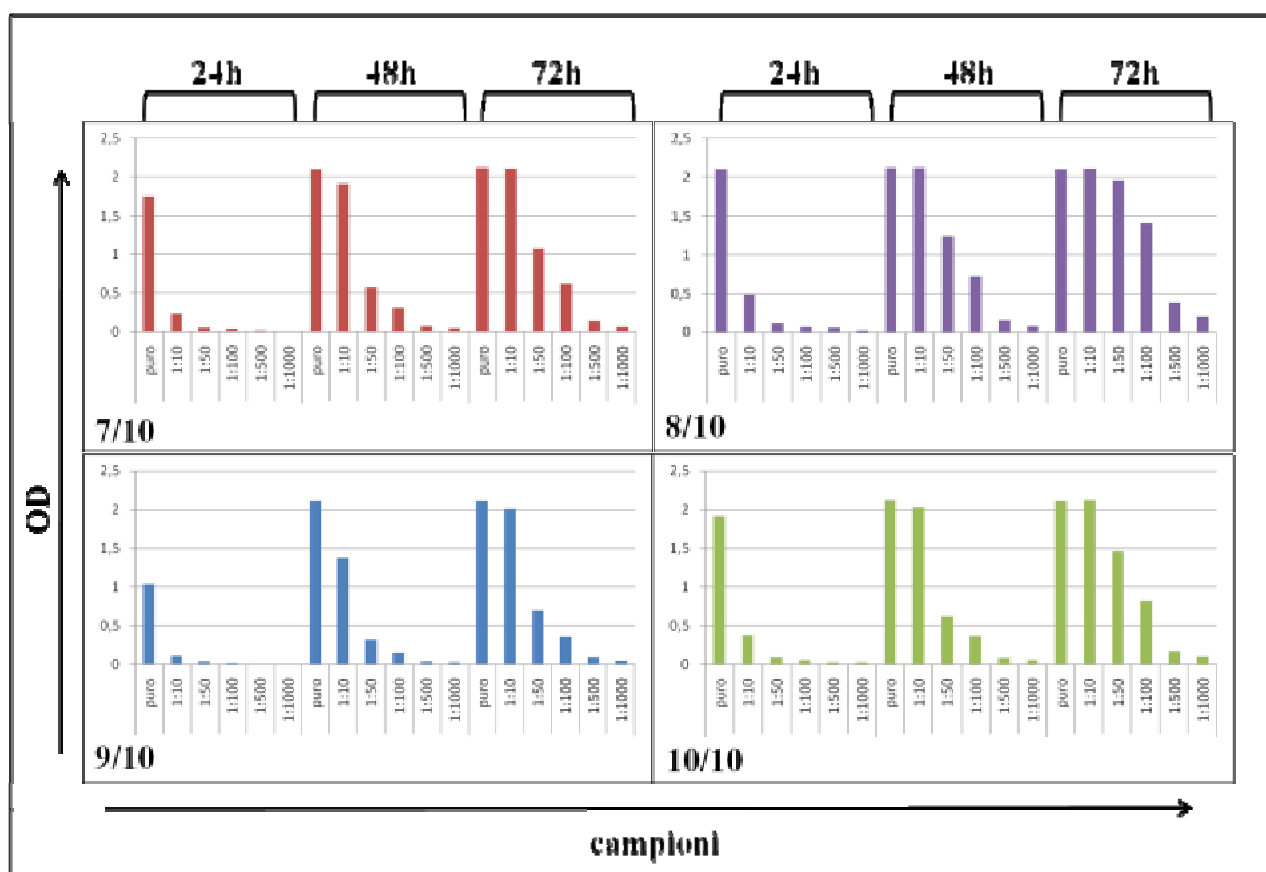


Fig. 39 I 4 grafici mostrano i livelli di espressione di ogni mutante ricombinante (7-8-9-10/10) nei surnatanti raccolti a 24, 48, 72 ore dalla trasfezione, valutati come densità ottica del campione utilizzando in kit ETIMAK-4.

Come si può vedere nei grafici sopra riportati (Fig.39), il maggior livello di espressione delle proteine ricombinanti nel surnatante è stato ottenuto, per tutti e quattro i mutanti analizzati, a 72 ore dalla trasfezione.

Le 72 ore sono quindi state scelte come tempistica ottimale del protocollo di trasfezione .

Espressione in cellule di mammifero dei 10 mutanti HBsAg quantificazione dei surnatanti

Cellule HeLa sono quindi state trasfettate con il DNA codificante per tutti e 10 i mutanti HBsAg concordati. I surnatanti sono stati raccolti a 72 h dalla trasfezione e quantificati mediante kit ELISA ETIMAK-4 fornito dalla DiaSorin confrontando le assorbanze ottenute con quelle di una curva standard a concentrazione nota di antigene.

MUTAZIONE	PANEL ID	ng/ml
HBsAg T123N	# 1/10	1800
HBsAg T123N-T124S	# 2/10	210
HBsAg P142L-F/Y143H-D144E-G145R	# 3/10	26
HBsAg I110R-S117I-G119R-T123N	# 4/10	106
HBsAg 122+DT	# 5/10	978
HBsAg 122+DT-G145R	# 6/10	57
HBsAg G145R	# 7/10	2303
HBsAg D144A	# 8/10	2936
HBsAg P142L-G145R	# 9/10	2847
HBsAg P142S-G145R	# 10/10	2701

Fig.40 La tabella riporta le quantificazioni di tutti i surnatanti raccolti per ogni mutante HBsAg. In rosa sono evidenziati i mutanti la cui concentrazione risulta insufficiente

Come si può vedere nella tabella sopra riportata (Fig. 40) le concentrazioni ottenute per i mutanti 1-5-7-8-9-10/10 sono risultate in linea con le richieste della DiaSorin (1 µg/ml) mentre le concentrazioni medie calcolate in 3 diversi test ELISA su surnatanti raccolti dopo tre diverse trasfezione con i mutanti 2-3-4-6/10 sono di molto inferiori all'obbiettivo.

Per indagare le ipotesi che potessero spiegare tale risultato è stato necessario 1) verificare lo stato del DNA codificante per le proteine, in maniera da escludere un possibile danneggiamento dello stesso, 2) accertarsi che il problema non fosse legato ad una minor efficienza di espressione di questi mutanti da parte delle cellule trasfettate.

Valutazione delle condizioni di conservazione del DNA.

Per valutare un possibile danno del DNA codificante le proteine ricombinanti HBsAg sono state pianificate 2 tipologie di analisi: la prima volta ad escludere fenomeni di ricombinazione o mutazioni, la seconda volta a valutare la qualità della preparazione del DNA.

1) Tutti i DNA codificanti per i mutanti sono quindi stati sequenziati ex-novo. Il DNA che codifica per i mutanti HBsAg in questione non ha mostrato nessuna mutazione o delezione nucleotidica.

2) Per verificare il grado di purezza del DNA la preparazione di ciascun plasmide è stato letto allo spettrofotometro a due diverse lunghezze d'onda: 260 nm per quantificare gli acidi nucleici, 280 per le proteine. Il rapporto delle assorbanze ottenute a queste lunghezze d'onda per ogni DNA ha mostrato un valore di purezza di $1,9 \pm 0,1$ (purezza massima: $260/280 = 2$).

Valutazione della capacità di espressione dei mutanti da parte delle cellule HeLa

Per verificare se le cellule esprimessero con diversa efficienza i mutanti in questione, i surnatanti delle cellule trasfettate sono stati analizzati in Western blot. Tale metodica infatti identifica una proteina di interesse con l'ausilio di un solo anticorpo, diversamente da quanto accade in ELISA in cui vengono utilizzati due anticorpi (uno di cattura e un tracciante) motivo per cui se uno dei due non fosse in grado di riconoscere l'antigene, nel nostro caso a causa delle mutazioni, il test risulterebbe negativo.

I 4 campioni che hanno mostrato in ELISA una concentrazione non accettabile sono stati caricati su gel di acrilamide insieme ad uno dei campioni a concentrazione più alta come controllo positivo. Come anticorpi primari sono stati utilizzati tre anticorpi forniti dalla DiaSorin:

- IgG anti HBsAg H2 (monoclonale) 2 μ g/ml
- MoAb 4b5 anti HBsAg 2 LIA (monoclonale) 2 μ g/ml
- IgG antiHBs (policlonale) 2 μ g/ml

che sono gli stessi utilizzati come cattura (i primi due) o tracciante (il terzo) nel kit ETIMAK-4 e nel kit commerciale HBsAg per LIAISON della DiaSorin.

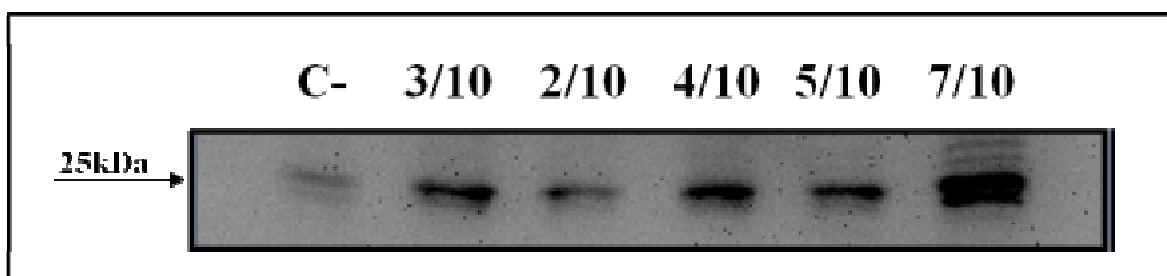


Fig. 41 La figura mostra il risultato di un Western blot con MoAb 4b5 anti HBsAg 2 LIA (monoclonale) 2 µg/ml. Il campione 7/10 è stato considerato come controllo positivo.

Come si può osservare nella figura sopra riportata tutti i campioni colorati con MoAb 4b5 anti HBsAg 2 LIA hanno dato un segnale evidente, che pur essendo inferiore rispetto a quello ottenuto nel controllo positivo (7/10) e nonostante la presenza di una debole aspecificità nel controllo negativo, è tuttavia decisamente superiore rispetto a quanto atteso in base alla quantificazione ottenuta in ELISA, dove ad esempio il campione 2/10 risultava 5 volte più concentrato del 3/10.

Gli anticorpi IgG anti HBsAg H2 e IgG antiHBs non hanno colorato la membrana.

Non essendo poi stato possibile comprendere quale fosse la concentrazione dell'anticorpo MoAb 4b5 effettivamente coattata sulla piastra ELISA poiché utilizzato in pull con altri monoclonali, è stato in un primo momento ipotizzato che una diversa concentrazione dell'anticorpo all'interno dei pozzetti avesse reso la quantificazione dei mutanti HBsAg imprecisa.

Successivamente studi condotti utilizzando diversi test commerciali per la valutazione della presenza della proteina HBsAg, hanno evidenziato una diversa reattività nei confronti dei surnatanti in esame, avvalorando l'ipotesi che la bassa concentrazione di alcuni mutanti non fosse effettiva ma test dipendente (dati non riportati). Per questo motivo i surnatanti contenenti i 10 mutanti sono stati comunque consegnati alla DiaSorin e successivamente utilizzati per l'ultimo step di validazione del kit proprototipo HBsAg per LIAISON.

1.4.5 VALIDAZIONE DEL KIT LIAISON XL RISPETTO AL PANNELLO DI MUTANTI RICOMBINANTI

Per ultimare le validazioni necessarie per il lancio sul mercato del kit LIAISON XL è stato necessario verificare la reattività del test nei confronti di un pannello di mutanti noti della proteina antigene HBsAg.

I 10 mutanti ricombinanti concordati sono stati analizzati con il kit commerciale (Liaison HBsAg), con il kit Liaison XL e con il metodo usato come riferimento in tutti gli altri test di validazione ovvero ARCHITECT HBsAg della ditta Abbot, considerato il maggiore competitor presente sul mercato internazionale.

Panel ID	mutation	LIAISON XL IU/mL	ABBOTT ARCHITECT IU/mL	LIAISON HBsAg code 310100 Index
ID #1/10	T123N	0.92 (+)	0,07 (+)	13 (+)
ID #2/10	T123N-T124S	0.24 (+)	0,03 (-)	0.62 (-)
ID #3/10	P142L-F/Y143H- D144E-G145R	0.31 (+)	0,02 (-)	4.2 (+)
ID #4/10	I110R-S117I- G119R-T123N	0.81 (+)	0,06 (+)	13 (+)
ID #5/10	122+DT	1.0 (+)	0,08 (+)	13 (+)
ID #6/10	122+DT-G145R	1.6 (+)	0,11 (+)	<<0.01 (-)
ID #7/10	G145R	0.36 (+)	0,24 (+)	2.8 (+)
ID #8/10	D144A	0.53 (+)	0,37 (+)	9.7 (+)
ID #9/10	P142L-G145R	0.50 (+)	0,2 (+)	3.4 (+)
ID #10/10	P142S-G145R	0.45 (+)	0,19 (+)	3.4 (+)

Fig. 42 La figura mostra i risultati ottenuti analizzando i dieci mutanti con il kit LIAISON XL, con il kit già in commercio LIAISON HBsAg e con il competitor ARCHITECT.

La tabella (Fig 42) mostra che come atteso il nuovo kit LIAISON XL è stato in grado di identificare come positivi tutti i mutanti HBsAg presi in esame, confermando le migliori performance legate all'utilizzo di anticorpi rivolti verso la regione costante dell'antigene. Infatti sia al kit commerciale che il competitor della Abbot non sono stati in grado di riconoscere come positivi due dei mutanti analizzati, evidenziando l'incapacità degli anticorpi che utilizzano nella fase solida di riconoscere le mutazioni T123N-T124S e 122+DT-G145R, e T123N-T124S e P142L-F/Y143H-D144E-G145R rispettivamente.

1.5 DISCUSSIONE

Un'indagine di marketing della DiaSorin spa, azienda che si occupa principalmente della messa a punto e della commercializzazione di kit diagnostici, ha messo in risalto l'esigenza, per diventare maggiormente competitivi sul mercato, di migliorare i propri prodotti riguardanti l'identificazione della molecola antigenica HBsAg marker precoce delle infezioni da HBV.

La small protein, meglio conosciuta come HBsAg, è una molecola di superficie che costituisce l'involucro lipoproteico del virus dell'Epatite B e contiene il sito maggiormente immunodominante del virus. Questo sito denominato determinante "a" è comune a tutti i sierotipi e genotipi del virus insieme con gli epitopi sierotipici che determinano i maggiori sottotipi dell'HBV: *dw*, *yw*, *dr* e *yr*. [48]

Il determinante "a" è localizzato tra gli aminoacidi 124 e 147 all'interno della regione idrofila maggiore (MHR) [51]. La sua struttura terziaria è cruciale per il riconoscimento da parte del sistema immunitario.

Variazioni naturali, dovute all'eterogenicità genetica, o mutazioni in quest'area, documentate in bambini vaccinati, trapiantati di fegato che ricevono immunoprofilassi anti-HBs e portatori cronici [52], che causano cambiamenti nella struttura terziaria della proteina, inducono una minore affinità di legame con gli anticorpi HBsAg-specifici. Tali mutanti possono quindi sfuggire all'identificazione da parte di analisi diagnostiche basate sul legame antigene-anticorpo causando la determinazione di falsi-negativi. [30,49]

Anticorpi monoclonali contro HBsAg sono largamente utilizzati in test diagnostici immunologici, tuttavia la maggior parte di questi test non è in grado di evidenziare tutti i casi di infezione con varianti virali che portano mutazioni nella regione MHR. L'aumento del numero di mutanti deriva proprio dalla necessità del virus di eludere il sistema immunitario. Questi mutanti hanno perciò vantaggi selettivi per la propagazione e la trasmissione verticale e orizzontale in individui vaccinati. [50]

Tra gli innumerevoli test diagnostici per HBV presenti sul mercato, in seguito ad un'accurata analisi dell'ufficio marketing dell'azienda, è stato identificato come principale competitor per il nuovo kit LIAISON XL per HBsAg il metodo HBsAg ARCHITECT della Abbot.

Si tratta di un sandwich a due step che utilizza la tecnologia CMIA (Chemiluminescent Microparticle ImmunoAssay) per ottenere una determinazione quantitativa dell'HBsAg presente in siero e plasma mediante la strumentazione automatizzata ARCHITECT. Nello specifico il test utilizza due anticorpi monoclonali di topo nella fase solida ed un anticorpo policlonale di capra marcato come tracciante.

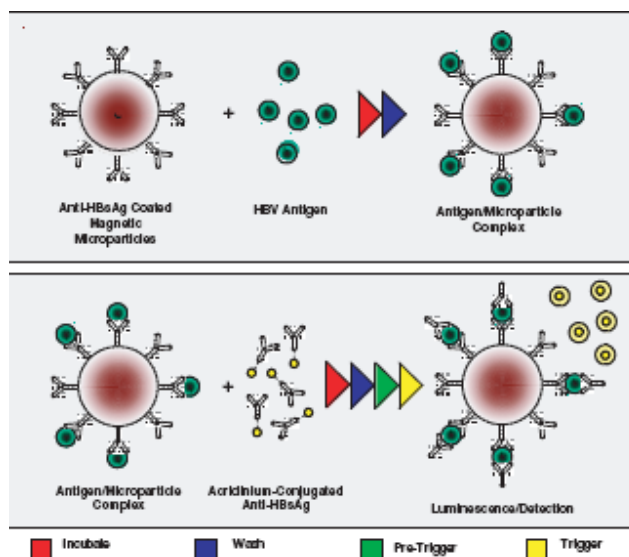


Fig. 43 Schema del funzionamento del test ARCHITECT.

Il test è in grado di fornire una quantificazione dei campioni da 0,05 a 250 IU/ml e fornisce una specificità del 99,86% nei confronti di donatori di sangue, del 100% nei confronti di pazienti ospedalizzati ed una sensibilità del 100%.

I criteri di accettabilità interni all'azienda definiti dal marketing per la messa a punto di un kit LIAISON XL per l'identificazione della molecola antigenica HBsAg, si sono pertanto basati sulle performance del competitor HBsAg ARCHITECT ovvero: una sensibilità analitica uguale o inferiore a 0,05 IU/ml, una specificità superiore al 99 % ed infine una sensibilità del 100%.

Per poter poi avere la possibilità di un'immediata commercializzazione del kit LIAISON XL per l'identificazione dell'HBsAg almeno a livello europeo è stato indispensabile rispondere anche alle caratteristiche richieste dal decreto della Commissione Europea 2009/565/CE, che prevede l'analisi di un cospicuo numero di campioni sia positivi che negativi.

Per migliorare le caratteristiche di sensibilità del kit già in commercio, è stato indispensabile prendere in considerazione l'utilizzo di un nuovo pannello di anticorpi monoclonali, che contrariamente a quelli comunemente utilizzati nei test diagnostici per il riconoscimento dell'HBsAg, fosse in grado di riconoscere porzioni costanti della proteina e che quindi eliminasse la possibilità di andare incontro all'identificazione di falsi negativi, dipendente dall'incapacità di riconoscere determinate mutazioni della proteina. L'obiettivo non è stato di facile realizzazione poiché anticorpi in grado di riconoscere porzioni costanti dell'HBsAg, notoriamente poste nel dominio transmembrana o interno alla particella, sarebbero dovuti sopravvivere all'interno di un buffer contenente detergenti in grado di rendere disponibili gli epitopi di interesse, al fine di rendere la metodica compatibile con uno strumento automatizzato come LIAISON.

Anticorpi aventi le caratteristiche sopra indicate sono stati messi a punto dall'ALSI in Giappone, che ha protetto la ricetta del buffer ed il protocollo di crescita degli anticorpi ponendo entrambi sotto brevetto.

Ottenuta la miscela di anticorpi monoclonali composta da un anticorpo rivolto verso la porzione immunogenica "a", uno verso il dominio transmembrana ed uno verso la porzione idrofilica costante interna ed il diluent in grado di disgregare il doppio strato lipidico rendendo disponibile al riconoscimento anticorpale le porzioni costanti della proteina HBsAg, si è potuto procedere con tutti gli step di validazione del prodotto.

E' stata quindi messa a punto la migliore miscela di coating (co-coating) con cui trattare la fase solida del kit, utilizzando nello specifico solo le porzioni Fab degli anticorpi in modo da diminuire l'eventuale ingombro sterico e migliorare la possibilità di legame tra antigene ed anticorpo, dimostrando una migliore efficienza degli anticorpi.

Sia la fase solida che il diluent sono stati utilizzati dopo essere stati sottoposti a shock termico per verificarne la stabilità in base a quanto definito dalle normali procedure di accettabilità interne all'azienda. Entrambi i reagenti sono risultati stabili anche dopo conservazione per 5 giorni a 45°C .

In base a quanto riportato dalle tabelle per la commercializzazione di test diagnostici per HBsAg del decreto 2009/565/CE della Commissione Europea si è poi proceduto con la validazione del kit LIAISON XL riguardo alla sensibilità, analizzando un totale di più di 500 campioni positivi tra campioni di sieri di pazienti e pannelli commerciali, dimostrando infine una sensibilità del 100%. Inoltre sono stati analizzati 32 pannelli di sieroconversioni per le quali il kit LIAISON XL ha rispettato pienamente i criteri di accettabilità riuscendo sempre a riconoscere almeno un campione per pannello di sieroconversione analizzato, ma anche identificando un numero di campioni positivi totale paragonabile a quello ottenuto con il competitor ARCHITECT.

Per la validazione del kit LIAISON XL rispetto alla specificità indicata dalla CE sono stati analizzati:

- 5201 campioni di donatori negativi ad HBsAg
- 390 campioni di pazienti ospedalizzati negativi ad HBsAg
- 278 campioni di pazienti in dialisi
- 100 campioni di donne incinte
- 143 campioni di categorie ad alto rischio
- 186 campioni di possibili cross-reattivi

Anche in questo caso i risultati ottenuti hanno dimostrato una specificità paragonabile a quella ottenuta dal competitor ARCHITECT.

Infine per completare la validazione del kit LIAISON XL è stato indispensabile analizzare anche un pannello di campioni di mutanti HBsAg. Per l'oggettiva difficoltà nel reperire sieri di pazienti positivi ad HBsAg mutati, è stato creato un pannello di 10 mutanti ricombinanti in collaborazione con il Dipartimento di Scienze Mediche, che sono stati analizzati con il kit per HBsAg LIAISON XL, con il kit commerciale LIAISON e con il competitor ARCHITECT.

Il risultato ha dimostrato l'efficacia degli anticorpi utilizzati nella fase solida del kit LIAISON XL nel riconoscimento dei mutanti HBsAg sia rispetto al kit DiaSorin commerciale ma soprattutto nei confronti del competitor ARCHITECT poiché entrambi questi ultimi non sono stati in grado di riconoscere come positivi due campioni aventi le mutazioni T123N-T124S e 122+DT-G145R, e T123N-T124S e P142L-F/Y143H-D144E-G145R rispettivamente.

In conclusione si può affermare che il kit LIAISON XL risulta avere tutte le caratteristiche richieste per portare il marchio CE e di essere almeno paragonabile al competitor identificato dall'azienda DiaSorin, che è quindi pronta al lancio sul mercato europeo del kit sostituendolo a quello già in commercio.

1.6 ALLEGATO 1

II

(Acts adopted under the EC Treaty/Euratom Treaty whose publication is not obligatory)

DECISIONS

COMMISSION

COMMISSION DECISION

of 3 February 2009

amending Decision 2002/364/EC on common technical specifications for *in vitro*-diagnostic medical devices

(notified under document number C(2009) 565)

(Text with EEA relevance)

(2009/108/EC)

THE COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES,

Having regard to the Treaty establishing the European Community,

Having regard to Directive 98/79/EC of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on *in vitro*-diagnostic medical devices⁽¹⁾, and in particular the second subparagraph of Article 5(3) thereof,

Whereas:

(1) The common technical specifications for *in vitro*-diagnostic medical devices are laid down in Commission Decision 2002/364/EC⁽²⁾.

(2) In the interest of public health and in order to reflect technical progress including the evolution in the performance and analytical sensitivity of devices, it is appropriate to revise the common technical specifications laid down in Decision 2002/364/EC.

(3) The definition of rapid test should be refined in order for it to be more precise. For the sake of clarity further definitions should be included.

(4) To bring the common technical specifications in line with current scientific and technical practices it is necessary to update a number of scientific and technical references.

(5) The requirements for HIV screening assays should be clarified. In order to ensure that the performance criteria appropriate to today's technology is reflected in the common technical specifications it is necessary to add requirements for HIV antibody/antigen combined tests and further specification of the sample requirements for certain assays.

(6) The Annex to Decision 2002/364/EC should therefore be amended accordingly and, for the purpose of clarity, be replaced.

(7) Manufacturers whose devices are already on the market should be given a transition period in order to adapt to the new common technical specifications. On the other hand, in the interest of public health, manufacturers who so wish should be able to apply the new common technical specifications before the expiry of the transition period.

(8) The measures provided for in this Decision are in accordance with the opinion of the committee set up by Article 6(2) of Council Directive 90/385/EEC⁽³⁾.

⁽¹⁾ OJ L 331, 7.12.1998, p. 1.

⁽²⁾ OJ L 131, 16.5.2002, p. 17.

⁽³⁾ OJ L 189, 20.7.1990, p. 17.

HAS ADOPTED THIS DECISION:

Article 1

The Annex to Decision 2002/364/EC is replaced by the text in the Annex to this Decision.

Article 2

This Decision shall apply from 1 December 2010 for those devices first placed on the market prior to 1 December 2009.

It shall apply from 1 December 2009 for all other devices.

However, Member States shall allow manufacturers to apply the requirements set out in the Annex before the dates set out in the first and second paragraph.

Article 3

This Decision is addressed to the Member States.

Done at Brussels, 3 February 2009.

For the Commission

Günter VERHEUGEN

Vice-President

ANNEX

ANNEX

COMMON TECHNICAL SPECIFICATIONS (CTS) FOR *IN VITRO*-DIAGNOSTIC MEDICAL DEVICES

1. SCOPE

The common technical specifications set out in this Annex shall apply for the purposes of Annex II List A to Directive 98/79/EC.

2. DEFINITIONS AND TERMS

(Diagnostic) sensitivity

The probability that the device gives a positive result in the presence of the target marker.

True positive

A specimen known to be positive for the target marker and correctly classified by the device.

False negative

A specimen known to be positive for the target marker and misclassified by the device.

(Diagnostic) specificity

The probability that the device gives a negative result in the absence of the target marker.

False positive

A specimen known to be negative for the target marker and misclassified by the device.

True negative

A specimen known to be negative for the target marker and correctly classified by the device.

Analytical sensitivity

Analytical sensitivity may be expressed as the limit of detection, i.e. the smallest amount of the target marker that can be precisely detected.

Analytical specificity

Analytical specificity means the ability of the method to determine solely the target marker.

Nucleic acid amplification techniques (NAT)

The term "NAT" is used for tests for the detection and/or quantification of nucleic acids by either amplification of a target sequence, by amplification of a signal or by hybridisation.

Rapid test

"Rapid test" means qualitative or semi-quantitative *in vitro*-diagnostic medical devices, used singly or in a small series, which involve non-automated procedures and have been designed to give a fast result.

Robustness

The robustness of an analytical procedure means the capacity of an analytical procedure to remain unaffected by small but deliberate variations in method parameters and provides an indication of its reliability during normal usage.

Whole system failure rate

The whole system failure rate means the frequency of failures when the entire process is performed as prescribed by the manufacturer.

Confirmation assay

Confirmation assay means an assay used for the confirmation of a reactive result from a screening assay.

Virus typing assay

Virus typing assay means an assay used for typing with already known positive samples, not used for primary diagnosis of infection or for screening.

Seroconversion HIV samples

Seroconversion HIV samples mean:

- p24 antigen and/or HIV RNA positive, and
- recognised by all of the antibody screening tests, and
- positive or indeterminate confirmatory assays,

Early seroconversion HIV samples

Early seroconversion HIV samples mean:

- p24 antigen and/or HIV RNA positive, and
- not recognised by all of the antibody screening tests, and
- indeterminate or negative confirmatory assays.

3. COMMON TECHNICAL SPECIFICATIONS (CTS) FOR PRODUCTS REFERRED TO IN ANNEX II, LIST A OF DIRECTIVE 98/79/EC

3.1. **CTS for performance evaluation of reagents and reagent products for the detection, confirmation and quantification in human specimens of markers of HIV infection (HIV 1 and 2), HTLV I and II, and hepatitis B, C, D**

General Principles

- 3.1.1. Devices which detect virus infections placed on the market for use as either screening or diagnostic tests, shall meet the requirements for sensitivity and specificity set out in Table 1. See also principle 3.1.11 for screening assays.
- 3.1.2. Devices intended by the manufacturer for testing body fluids other than serum or plasma, e.g. urine, saliva, etc. shall meet the same CTS requirements for sensitivity and specificity as serum or plasma tests. The performance evaluation shall test samples from the same individuals in both the tests to be approved and in a respective serum or plasma assay.
- 3.1.3. Devices intended by the manufacturer for self-test, i.e. home use shall meet the same CTS requirements for sensitivity and specificity as respective devices for professional use. Relevant parts of the performance evaluation shall be carried out (or repeated) by appropriate lay users to validate the operation of the device and the instructions for use.
- 3.1.4. All performance evaluations shall be carried out in direct comparison with an established state-of-the-art device. The device used for comparison shall be one bearing CE marking, if on the market at the time of the performance evaluation.
- 3.1.5. If discrepant test results are identified as part of an evaluation, these results shall be resolved as far as possible, for example:
- by evaluation of the discrepant sample in further test systems,
 - by use of an alternative method or marker,
 - by a review of the clinical status and diagnosis of the patient, and
 - by the testing of follow-up-samples.
- 3.1.6. Performance evaluations shall be performed on a population equivalent to the European population.
- 3.1.7. Positive specimens used in the performance evaluation shall be selected to reflect different stages of the respective disease(s), different antibody patterns, different genotypes, different subtypes, mutants, etc.
- 3.1.8. Sensitivity with true positives and seroconversion samples shall be evaluated as follows:
- 3.1.8.1. Diagnostic test sensitivity during seroconversion has to represent the state of the art. Whether further testing of the same or additional seroconversion panels is conducted by the notified body or by the manufacturer the results shall confirm the initial performance evaluation data (see Table 1). Seroconversion panels should start with a negative bleed(s) and should have narrow bleeding intervals.

- 3.1.8.2. For blood screening devices (with the exception of HBsAg and anti-HBc tests), all true positive samples shall be identified as positive by the device to be CE marked (Table 1). For HBsAg and anti-HBc tests the new device shall have an overall performance at least equivalent to that of the established device (see 3.1.4).
- 3.1.8.3. Regarding HIV tests:
- all seroconversion HIV samples shall be identified as positive, and
 - at least 40 early seroconversion HIV samples shall be tested. Results should conform to the state of the art.
- 3.1.9. Performance evaluation of screening assays shall include 25 positive (if available in the case of rare infections) "same day" fresh serum and/or plasma samples (\leq 1 day after sampling).
- 3.1.10. Negative specimens used in a performance evaluation shall be defined so as to reflect the target population for which the test is intended, for example blood donors, hospitalised patients, pregnant women, etc.
- 3.1.11. For performance evaluations for screening assays (Table 1) blood donor populations shall be investigated from at least two blood donation centres and consist of consecutive blood donations, which have not been selected to exclude first-time donors.
- 3.1.12. Devices shall have a specificity of at least 99,5 % on blood donations, unless otherwise indicated in the accompanying tables. Specificity shall be calculated using the frequency of repeatedly reactive (i.e. false positive) results in blood donors negative for the target marker.
- 3.1.13. Devices shall be evaluated to establish the effect of potential interfering substances, as part of the performance evaluation. The potential interfering substances to be evaluated will depend to some extent on the composition of the reagent and configuration of the assay. Potential interfering substances shall be identified as part of the risk analysis required by the essential requirements for each new device but may include, for example:
- specimens representing "related" infections,
 - specimens from multipara, i.e. women who have had more than one pregnancy, or rheumatoid factor positive patients,
 - for recombinant antigens, human antibodies to components of the expression system, for example anti-E. coli, or anti-yeast,
- 3.1.14. For devices intended by the manufacturer to be used with serum and plasma the performance evaluation must demonstrate serum to plasma equivalency. This shall be demonstrated for at least 50 donations (25 positive and 25 negative).
- 3.1.15. For devices intended for use with plasma the performance evaluation shall verify the performance of the device using all anticoagulants which the manufacturer indicates for use with the device. This shall be demonstrated for at least 50 donations (25 positive and 25 negative).
- 3.1.16. As part of the required risk analysis the whole system failure rate leading to false-negative results shall be determined in repeat assays on low-positive specimens.
- 3.1.17. If a new *in vitro*-diagnostic medical device belonging to Annex II List A is not specifically covered by the common technical specification, the common technical specification for a related device should be taken into account. Related devices may be identified on different grounds, e.g. by the same or similar intended use or by similar risks.
- 3.2. **Additional Requirements for HIV antibody/antigen combined tests**
- 3.2.1. HIV antibody/antigen combined tests intended for anti-HIV and p24 antigen detection which include claims for single p24 antigen detection shall follow Table 1 and Table 5, including criteria for analytical sensitivity for p24 antigen.
- 3.2.2. HIV antibody/antigen combined tests intended for anti-HIV and p24 detection which do not include claims for single p24 detection shall follow Table 1 and Table 5, excluding criteria for analytical sensitivity for p24.
- 3.3. **Additional Requirements for Nucleic Acid Amplification Techniques (NAT)**
- The performance evaluation criteria for NAT assays can be found in Table 2.
- 3.3.1. For target sequence amplification assays, a functionality control for each test sample (internal control) shall reflect the state of the art. This control shall as far as possible be used throughout the whole process, i.e. extraction, amplification/hybridisation, detection.

- 3.3.2. The analytical sensitivity or detection limit for NAT assays shall be expressed by the 95 % positive cut-off value. This is the analyte concentration where 95 % of test runs give positive results following serial dilutions of an international reference material for example a WHO standard or calibrated reference material.
- 3.3.3. Genotype detection shall be demonstrated by appropriate primer or probe design validation and shall also be validated by testing characterised genotyped samples.
- 3.3.4. Results of quantitative NAT assays shall be traceable to international standards or calibrated reference materials, if available, and be expressed in international units utilised in the specific field of application.
- 3.3.5. NAT assays may be used to detect virus in antibody negative samples, i.e. pre-seroconversion samples. Viruses within immune-complexes may behave differently in comparison to free viruses, for example during a centrifugation step. It is therefore important that during robustness studies, antibody-negative (pre-seroconversion) samples are included.
- 3.3.6. For investigation of potential carry-over, at least five runs with alternating high-positive and negative specimens shall be performed during robustness studies. The high positive samples shall comprise of samples with naturally occurring high virus titres.
- 3.3.7. The whole system failure rate leading to false-negative results shall be determined by testing low-positive specimens. Low positive specimens shall contain a virus concentration equivalent to three times the 95 % positive cut-off virus concentration.
- 3.4. **CTS for the manufacturer's release testing of reagents and reagent products for the detection, confirmation and quantification in human specimens of markers of HIV infection (HIV 1 and 2), HTLV I and II, and hepatitis B, C, D (immunological assays only)**
- 3.4.1. The manufacturer's release testing criteria shall ensure that every batch consistently identifies the relevant antigens, epitopes, and antibodies.
- 3.4.2. The manufacturer's batch release testing for screening assays shall include at least 100 specimens negative for the relevant analyte.
- 3.5. **CTS for performance evaluation of reagents and reagent products for determining the following blood group antigens: ABO blood group system ABO1 (A), ABO2 (B), ABO3 (A,B); Rh blood group system RH1 (D), RH2 (C), RH3 (E), RH4 (c), RH5 (e); Kell blood group system KEL1 (K)**
- Criteria for performance evaluation of reagents and reagent products for determining the blood groups antigens: ABO blood group system ABO1 (A), ABO2 (B), ABO3 (A,B); Rh blood group system RH1 (D), RH2 (C), RH3 (E), RH4 (c), RH5 (e); Kell blood group system KEL1 (K) can be found in Table 9.
- 3.5.1. All performance evaluations shall be carried out in direct comparison with an established state-of-the-art device. The device used for comparison shall be one bearing CE marking, if on the market at the time of the performance evaluation.
- 3.5.2. If discrepant test results are identified as part of an evaluation, these results shall be resolved as far as possible, for example:
- by evaluation of the discrepant sample in further test systems,
 - by use of an alternative method,
- 3.5.3. Performance evaluations shall be performed on a population equivalent to the European population.
- 3.5.4. Positive specimens used in the performance evaluation shall be selected to reflect variant and weak antigen expression.
- 3.5.5. Devices shall be evaluated to establish the effect of potential interfering substances, as part of the performance evaluation. The potential interfering substances to be evaluated will depend to some extent on the composition of the reagent and configuration of the assay. Potential interfering substances shall be identified as part of the risk analysis required by the essential requirements for each new device.
- 3.5.6. For devices intended for use with plasma the performance evaluation shall verify the performance of the device using all anticoagulants which the manufacturer indicates for use with the device. This shall be demonstrated for at least 50 donations.
- 3.6. **CTS for the manufacturer's release testing of reagents and reagent products for determining the blood group antigens: ABO blood group system ABO1 (A), ABO2 (B), ABO3 (A,B); Rh blood group system RH1 (D), RH2 (C), RH3 (E), RH4 (c), RH5 (e); Kell blood group system KEL1 (K)**
- 3.6.1. The manufacturer's release testing criteria shall ensure that every batch consistently identifies the relevant antigens, epitopes, and antibodies.
- 3.6.2. Requirements for manufacturer's batch release testing are outlined in Table 10.

Table 1
 "Screening" assays: anti-HIV 1 and 2, anti-HTLV I and II, anti-HCV, HBsAg, anti-HBc

	Anti-HIV-1/2	Anti-HTLV-I/II	Anti-HCV	HBsAg	Anti-HBc
Diagnostic sensitivity	400 HIV-1 100 HIV-2 including 40 non-B- subtypes, all available HIV-1 subtypes should be represented by at least 3 samples per subtype	300 HTLV-I 100 HTLV-II	400 (positive samples) Including samples from different stages of infection and reflecting different antibody patterns: Genotype 1-4; > 20 samples per genotype (including non-a sub-types of genotype 4); 5: > 5 samples; 6: if available	400 Including subtype- consideration	400 Including evaluation of other HBV-markers
Seroconversion panels	20 panels 10 further panels (at Notified Body or manufacturer)	To be defined when available	20 panels 10 further panels (at Notified Body or manufacturer)	20 panels 10 further panels (at Notified Body or manufacturer)	To be defined when available
Analytical sensitivity	Standards			0.130 IU/ml (Second International Standard for HBsAg, subtype adv2, genotype A, NIBSC code: 00/588)	
Specificity	Unselected donors (including first-time donors)	5 000	5 000	5 000	5 000
	Hospitalised patients Potentially cross-reacting blood specimens (RF+, related viruses, pregnant women, etc.)	200 100	200 100	200 100	200 100

Table 2
NAT assays for HIV1, HCV, HBV, HTLV I/II (qualitative and quantitative; not molecular typing)

NAT	HIV1		HCV		HBV		HTLV I/II		Acceptance criteria
	qualitative	quantitative	qualitative	quantitative As for HIV quantitative	qualitative	quantitative As for HIV quantitative	qualitative	quantitative As for HIV quantitative	
Sensitivity Detection limit Detection of analytical sensitivity (IU/ml; defined on WHO standards or calibrated reference materials)	According to EP validation guideline (1); several dilution series into borderline concentration; statistical analysis (e.g. Probit analysis) on the basis of at least 24 replicates; 95 % cut-off value	Detection limit: as for qualitative tests; Quantification limit: dilutions (half-log10 or less) of calibrated reference preparations, definition of lower, upper limit, precision, accuracy, "linear" measuring range, "dynamic range". Reproducibility at different concentration levels to be shown.	According to EP validation guideline (1); several dilution series into borderline concentration; statistical analysis (e.g. Probit analysis) on the basis of at least 24 replicates; 95 % cut-off value	As for HIV quantitative	According to EP validation guideline (1); several dilution series into borderline concentration; statistical analysis (e.g. Probit analysis) on the basis of at least 24 replicates; 95 % cut-off value	As for HIV quantitative	According to EP validation guideline (1); several dilution series into borderline concentration; statistical analysis (e.g. Probit analysis) on the basis of at least 24 replicates; 95 % cut-off value	As for HIV quantitative	
Genotype/subtype detection/ quantification efficiency	At least 10 samples per subtype (as far as available)	Dilution series of all relevant genotypes/ subtypes, preferably of reference materials, as far as available	At least 10 samples per genotype (as far as available)		As far as calibrated reference materials are available		As far as calibrated reference materials are available		

NAT	HIV1		HCV		HBV		HTLV (I/II)		Acceptance criteria	
	qualitative	quantitative	qualitative	quantitative As for HIV quantitative	qualitative	quantitative As for HIV quantitative	qualitative	quantitative As for HIV quantitative		
	Cell culture supernatants (could substitute for rare HIV-1 subtypes)	Transcripts or plasmids quantified by appropriate methods may be used.	According to EP validation guideline (?) as far as calibrated subtype reference materials are available; <i>in vitro</i> transcripts could be an option	According to EP validation guideline (?) as far as calibrated subtype reference materials are available; <i>in vitro</i> transcripts could be an option	According to EP validation guideline (?) as far as calibrated subtype reference materials are available; <i>in vitro</i> transcripts could be an option	According to EP validation guideline (?) as far as calibrated subtype reference materials are available; <i>in vitro</i> transcripts could be an option	According to EP validation guideline (?) as far as calibrated subtype reference materials are available; <i>in vitro</i> transcripts could be an option	500 blood donors	500 individual blood donations	
Diagnostic specificity negative samples	500 blood donors	100 blood donors	500 blood donors	500 blood donors	500 blood donors	500 blood donors	500 blood donors			
Potential cross-reactive markers	By suitable assay design evidence (e.g. sequence comparison) and/or testing of at least 10 human retrovirus (e.g. HTLV)-positive samples	As for qualitative tests	By assays design and/or testing of at least 10 human flavivirus (e.g. HGV, YFV) positive samples	By assays design and/or testing of at least 10 other DNA virus positive samples	By assays design and/or testing of at least 10 human retrovirus (e.g. HIV-) positive samples	By assays design and/or testing of at least 10 human retrovirus (e.g. HIV-) positive samples	By assays design and/or testing of at least 10 human retrovirus (e.g. HIV-) positive samples			
Robustness		As for qualitative tests								

NAT	HIV1		HCV		HBV		HTLV I/II		Acceptance criteria
	qualitative	quantitative	qualitative	quantitative As for HIV quantitative	qualitative	quantitative As for HIV quantitative	qualitative	quantitative As for HIV quantitative	
Cross-contamination	At least 5 runs using alternating high positive (known to occur naturally) and negative samples		At least 5 runs using alternating high positive (known to occur naturally) and negative samples		At least 5 runs using alternating high positive (known to occur naturally) and negative samples		At least 5 runs using alternating high positive (known to occur naturally) and negative samples		
Inhibition	Internal control preferably to go through the whole NAT procedure		Internal control preferably to go through the whole NAT procedure		Internal control preferably to go through the whole NAT procedure		Internal control preferably to go through the whole NAT procedure		
Whole system failure rate leading to false-neg results	At least 100 samples virus-spiked with 3 x the 95 % pos cut-off concentration		At least 100 samples virus-spiked with 3 x the 95 % pos cut-off concentration		At least 100 samples virus-spiked with 3 x the 95 % pos cut-off concentration		At least 100 samples virus-spiked with 3 x the 95 % pos cut-off concentration		99/100 assays positive

(1) European Pharmacopoeia guideline.

Note: Acceptance criteria for "whole system failure rate leading to false-neg results" is 99/100 assays positive.

For quantitative NAT's a study shall be performed on at least 100 positive specimens reflecting the routine conditions of users (e.g. no pre-selection of specimens). Comparative results with another NAT test system shall be generated in parallel.

For qualitative NAT's a study on diagnostic sensitivity shall be performed using at least 10 seroconversion panels. Comparative results with another NAT test system shall be generated in parallel.

Table 3
 Rapid tests: anti-HIV 1 and 2, anti-HCV, HBsAg, anti-HBc, anti-HTLV I and II

	Anti-HIV 1/2	Anti-HCV	HBsAg	Anti-HBc	anti-HTLV I/II	Acceptance criteria
Diagnostic sensitivity	Positive specimens	Same criteria as for screening assays	Same criteria as for screening assays	Same criteria as for screening assays	Same criteria as for screening assays	Same criteria as for screening assays
	Serocconversion panels	Same criteria as for screening assays	Same criteria as for screening assays	Same criteria as for screening assays	Same criteria as for screening assays	Same criteria as for screening assays
Diagnostic specificity	Negative specimens	1 000 blood donations 200 clinical specimens 200 samples from pregnant women 100 potentially interfering samples	1 000 blood donations 200 clinical specimens 200 samples from pregnant women 100 potentially interfering samples	1 000 blood donations 200 clinical specimens 100 potentially interfering samples	1 000 blood donations 200 clinical specimens 200 samples from pregnant women 100 potentially interfering samples	≥ 99 % (anti-HBc; ≥ 96 %)

Table 4
Confirmatory/supplementary assays for anti-HIV 1 and 2, anti-HTLV 1 and 2, anti-HCV, HBSAg

	Anti-HIV Confirmatory Assay	Anti-HTLV Confirmatory Assay	HCV Supplementary Assay	HBSAg Confirmatory Assay	Acceptance criteria
Diagnostic sensitivity	200 HIV-1 and 100 HIV-2 Including samples from different stages of infection and reflecting different antibody patterns	200 HTLV-I and 100 HTLV-II	300 HCV (positive samples) Including samples from different stages of infection and reflecting different antibody patterns. Genotypes 1 – 4; > 20 samples (including non-a sub-types of genotype 4); 3: > 5 samples; 6: if available	300 HBSAg Including samples from different stages of infection and reflecting different antibody patterns. 20 "high pos" samples (> 26 IU/ml); 20 samples in the cut-off range	Correct identification as positive (or indeterminate), not negative
Analytical sensitivity	Seroconversion panels Standards		15 seroconversion panels/low titre panels	15 seroconversion panels/low titre panels Second International Standard for HBSAg, subtype adw2, genotype A, NIBSC code: 00/588	
Diagnostic specificity	Negative specimens	200 blood donation 200 clinical samples including pregnant women 50 potentially interfering samples including indeterminate results in other confirmatory assays	200 blood donations 200 clinical samples including pregnant women 50 potentially interfering samples with indeterminate results in other supplementary assays	10 false positives as available from the performance evaluation of the screening assay. (†) 50 potentially interfering samples	No false-positive results (†) no neutralisation

(†) Acceptance criteria no neutralisation for HBSAg confirmatory assay.

Table 5
HIV 1 Antigen

	Positive specimens	HIV-1 Antigen Assay	Acceptance criteria
Diagnostic sensitivity		50 HIV-1 Ag-positive 50 cell culture supernatants including different HIV-1 subtypes and HIV-2	Correct identification (after neutralisation)
Analytical sensitivity	Seroconversion panels	20 seroconversion panels/low titre panels	
Diagnostic specificity	Standards	HIV-1 p24 Antigen, 1st International Reference Reagent, NIBSC code: 90/036	≤ 2 IU/ml
		200 blood donations	$\geq 99,5$ % after neutralisation
		200 clinical samples	
		50 potentially interfering samples	

Table 6
Serotyping and Genotyping Assay: HCV

	Positive specimens	HCV Serotyping and Genotyping Assay	Acceptance criteria
Diagnostic sensitivity		200 (positive samples) Including samples from different stages of infection and reflecting different antibody patterns. Genotypes 1 – 4; ≥ 20 samples (including non-a sub-types of genotype 4); 5: ≥ 5 samples; 6: if available	≥ 95 % agreement between serotyping and genotyping ≥ 95 % agreement between genotyping and sequencing
Diagnostic specificity	Negative specimens	100	

Table 7
HBV Markers: anti-HBs, anti-HBc, IgM, anti-HBc, HBcAg

	Anti-HBs	Anti-HBc- IgM	Anti-HBc	HBcAg	Acceptance criteria
Diagnostic sensitivity	Positive specimens 100 vaccinees 100 naturally infected persons	200 Including samples from different stages of infection (acute/chronic, etc.) The acceptance criteria should only be applied on samples from acute infection stage.	200 Including samples from different stages of infection (acute/chronic, etc.)	200 Including samples from different stages of infection (acute/chronic, etc.)	≥ 98 %
	Seroconversion panels	When available			
Analytical sensitivity	Standards	10 follow-ups or anti-HBs seroconversions WHO 1st International Reference Preparation 1977; NIBSC, United Kingdom		HBc – Referenzarztigen 82; PEI Germany	Anti-HBs: < 10 mIU/ml
Diagnostic specificity	Negative specimens	500 Including clinical samples 50 potentially interfering samples	200 blood donations 200 clinical samples 50 potentially interfering samples	200 blood donations 200 clinical samples 50 potentially interfering samples	≥ 98 %

Table 8
HDV markers anti-HDV, anti-HDV IgM, Delta Antigen

	Anti-HDV	Anti-HDV IgM	Delta Antigen	Acceptance criteria
Diagnostic sensitivity	100 Specifying HBV-markers	50 Specifying HBV-markers	10 Specifying HBV-markers	≥ 98 %
Diagnostic specificity	200 Including clinical samples 50 potentially interfering samples	200 Including clinical samples 50 potentially interfering samples	200 Including clinical samples 50 potentially interfering samples	≥ 98 %

Table 9
Blood group antigens in the ABO, Rh and Kell blood group systems

	1	2	3
Specificity	Number of tests per recommended method	Total number of samples to be tested for a launch product	Total number of samples to be tested for a new formulation, or use of well-characterised reagents
Anti-ABO1 (anti-A), anti-ABO2 (anti-B), anti-ABO3 (anti-A,B)	500	3 000	1 000
Anti-RH1 (anti-D)	500	3 000	1 000
Anti-RH2 (anti-C), anti-RH4 (anti-e), anti-RH3 (anti-E)	100	1 000	200
Anti-RH5 (anti-e)	100	500	200
Anti-KEL1 (anti-K)	100	500	200

Acceptance criteria:

All of the above reagents shall show comparable test results with established reagents with acceptable performance with regard to claimed reactivity of the device. For established reagents, where the application or use has been changed or extended, further testing should be carried out in accordance with the requirements outlined in column 1 (above).

Performance evaluation of anti-D-reagents shall include tests against a range of weak RH: (D) and partial RH: (D) samples, depending on the intended use of the product.

Qualification:

Clinical samples: 10 % of the test population
Nonrenal specimens: > 2 % of the test population
ABO samples: > 40 % A, B positives
 weak D: > 2 % of RH1 (D) positives

Table 10

Batch release criteria for reagents and reagent products to determine blood group antigens in the ABO, Rh and Kell blood group systems

Specificity Testing Requirements on each reagent

1. Test reagents

Blood Group Reagents	Minimum number of control cells to be tested						
	Positive reactions				Negative reactions		
	A1	A2B	Ax		B	0	
Anti-ABO1 (anti-A)	2	2	2 (*)		2	2	
	B	A1B			A1	0	
Anti-ABO2 (anti-B)	2	2			2	2	
	A1	A2	Ax	B	0		
Anti-ABO3 (anti-A,B)	2	2	2	2	4		
	R1r	R2r	WeakD		r'r	r'r	rr
Anti-RH1 (anti-D)	2	2	2 (*)		1	1	1
	R1R2	R1r	r'r		R2R2	r'r	rr
Anti-RH2 (anti-C)	2	1	1		1	1	1
	R1R2	R1r	r'r		R1R1		
Anti-RH4 (anti-c)	1	2	1		3		
	R1R2	R2r	r'r		R1R1	r'r	rr
Anti-RH3 (anti-E)	2	1	1		1	1	1
	R1R2	R2r	r'r		R2R2		
Anti-RH5 (anti-e)	2	1	1		3		
	kk				kk		
Anti-KEL1 (anti-K)	4				3		

(*) Only by recommended techniques where reactivity against these antigens is claimed.

Note: Polyclonal reagents must be tested against a wider panel of cells to confirm specificity and exclude presence of unwanted contaminating antibodies.

Acceptance Criteria:

Each batch of reagent must exhibit unequivocal positive or negative results by all recommended techniques in accordance with the results obtained from the performance evaluation data.

2. Control Materials (red Cells)

The phenotype of red cells used in the control of blood typing reagents listed above should be confirmed using established device.

1.7 ALLEGATO 2

HBsAg Qualification Panel QHA711

BBI Diagnostics
A *SeraCare* Company
TEL: (508) 580-1900
US Toll Free: (800) 676-1881
FAX: (508) 580-2202

INTENDED USE

The HBsAg Qualification Panel, QHA711, is a panel of six samples with established reactivity in Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) assays. This panel may be used for training, qualifying, and re-qualifying technical personnel in the performance of tests for the detection of HBsAg. The panel may also be used as part of ongoing programs of lot acceptance and internal proficiency testing for HBsAg assays, to isolate system errors and in troubleshooting these assays, as a component of a quality assurance program.

This Panel is provided for research use only. Not for use in diagnostic procedures.

PRODUCT DESCRIPTION

HBsAg Qualification Panel, QHA711, consists of six members, manufactured from human serum or plasma, with a range of concentrations of HBsAg. The five reactive panel members represent dilutions of HBsAg subtype AD and HBsAg subtype AY stocks in nonreactive pools. The nonreactive member represents a different HBsAg nonreactive pool. Panel members were filtered through a 0.2 micron filter. Proclin® (0.1%) was added as a preservative.

Cat. No. QHA711-2.0 1 vial per member,
6 members, 2.0 ml per vial.

PRECAUTIONS

Members of the HBsAg Qualification Panel, QHA711, are manufactured from human serum or plasma that is negative for antibodies to HIV 1 and 2, HCV, and HTLV. HBsAg reactive stock materials were treated with beta-propiolactone and ultraviolet irradiation. The potential for transmission of infectious agents exists, and these materials should be handled following good laboratory safety practice.

Do not pipette by mouth.

Do not smoke, eat or drink in areas where specimens are handled. Dispose of this product as potentially biohazardous.

STORAGE

Panel members should be stored at 2-8°C, unopened. Once opened, panel members should be stored at 2-8°C and discarded after 60 days.

Alterations in physical appearance may indicate instability or deterioration. Solutions that are visibly turbid should be discarded.

INTERPRETATION OF RESULTS

Table 1 lists the HBsAg reactivity of the HBsAg Qualification Panel, QHA711. The antigen subtype is listed for reactive members. All testing was performed at BBI Diagnostics, by qualified individuals who routinely perform these tests.

Specific levels of reactivity (absorbance readings, or signal to cutoff ratios) will vary among different laboratories and test methods. Procedures for lot acceptance, training and troubleshooting must be established by each laboratory.

EXPECTED RESULT

The HBsAg Antigen Qualification Panel, QHA711, is formulated to produce the following reactivity:

Table 1

Panel Member ID	Antigen Subtype	HBsAg Reactivity
QHA711-01	ad	Reactive
QHA711-02	ad	Reactive
QHA711-03	neg	Nonreactive
QHA711-04	ay	Reactive
QHA711-05	ad	Reactive
QHA711-06	ay	Reactive

LIMITATIONS

The HBsAg Qualification Panel, QHA711, is provided for research use only. Not for use in diagnostic procedures.

For assistance, contact BBI Diagnostics Technical Support



375 West Street, West Bridgewater, MA 02379 US A
e-mail: info@seracare.com; website: www.seracare.com

July 2006
10720-04

1.8 ALLEGATO 3

SeraCare Life Sciences
Teragenix HBV Genotype Performance Panel (PHD350, formerly 70-00393)
Data Sheet

Member ID #	HBV Genotype	Roche HBV DNA Amplicor Monitor Test v2.0 Quantitative		Roche COBAS HBV DNA Amplicor Monitor Quantitative	Diasorin ETI-MAK2 HBsAg Plus Assay
		Innogenetics Result ¹	SeraCare Copies/ml	TeraLab Result ²	TeraLab Result ²
PHD350-01	D		1.4 x 10 ³	<60	Positive
PHD350-02	D		6.8 x 10 ³	1.2 x 10 ³	Positive
PHD350-03	F		<300	<60	Positive
PHD350-04	C		4.0 x 10 ^{5***}	1.4 x 10 ⁵	Positive
PHD350-05	A		9.1 x 10 ⁴	1.5 x 10 ⁴	Positive
PHD350-06	E		5.9 x 10 ⁴	9.0 x 10 ³	Positive
PHD350-07	E		1.7 x 10 ^{5***}	1.8 x 10 ⁶	Positive
PHD350-08	E		5.7 x 10 ³	5.3 x 10 ³	Positive
PHD350-09	C		ALR***	1.5 x 10 ⁷	Positive
PHD350-10	F		3.0 x 10 ³	9.1 x 10 ²	Positive
PHD350-11	G		9.7 x 10 ^{5***}	5.1 x 10 ⁵	Positive
PHD350-12	H		3.7 x 10 ³	6.4 x 10 ²	Positive
PHD350-13	A		9.7 x 10 ²	1.1 x 10 ²	Positive
PHD350-14	B		6.9 x 10 ^{5***}	4.7 x 10 ⁵	Positive
PHD350-15	B		2.3 x 10 ⁷	3.0 x 10 ⁴	Positive

Run Date	3/20/2002, 5/1/2002, 10/1/2002, 9/27/2004, 2/10/2006, 4/18/2006	6/5/2009, 6/15/2009, 7/1/2009	3/29/2006, 4/26/2006	4/4/2006, 4/26/2006
Kit Lot #	NA	K07908K10987	G10077/G12513	0710181A/1
Exp. Date	NA	June-30-2009/February-28-2010	July-31-2006/September-30-2006	June-11-2006
Product #	NA	87681	NA	NA

CAUTION: All Panel members were found positive for HBsAg. The potential for transmission of infectious disease is present.

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. Data are offered for informational purposes. SeraCare Life Sciences does not claim that others can duplicate these test results exactly.

Tests were performed at SeraCare Life Sciences or Tera Lab by individuals who routinely use these procedures.

¹ Sequencing by Innogenetics, Belgium. ² HBsAg and Roche COBAS HBV DNA Amplicor Monitor performed by TeraLab, Fort Lauderdale FL.

*Results reflect a 1:100 dilution

**Results reflect a 1:1000 dilution

***ALR = Above the limit of reactivity at 1:10,000 dilution

No preservatives were added.

Please contact SeraCare Life Sciences Technical Support for further information: Telephone: (508) 244-6400 or US Toll Free: (800) 676-1881, or visit our website at www.seracare.com.

July 2009
12044-01
Page 2 of 2

1.9 ALLEGATO 4

HBsAg Low Titer Performance Panel (Modified) PHA106(M)

BBI Diagnostics

A Boston Biomedica Company
TEL: (508) 580-1900
US Toll Free: (800) 676-1881
FAX: (508) 580-2202

INTENDED USE

The HBsAg Low Titer Performance Panel (Modified), PHA106(M), is a panel of naturally occurring plasma specimens. This Panel is intended for use by manufacturers and laboratories to evaluate the sensitivity and specificity of HBsAg test systems using well-characterized specimens and to provide comprehensive data for comparative analysis. For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

PRODUCT DESCRIPTION

PHA106(M) consists of a set of 12 samples with reactivity near the sensitivity limit in the HBsAg tests currently available in the United States. One negative sample is included as a negative control. Specimens are undiluted aliquots from serum or plasma units collected from asymptomatic blood donors from 1994 through 2001. No preservatives were added.

Cat. No. PHA106(M)-1.5 1 vial per member,
13 members, 1.5 ml per vial

PRECAUTIONS

BIOHAZARD CAUTION: Potentially infectious materials. Follow Universal Precautions. Panel members were tested and found positive by a test for HBsAg.

Panel members were tested and found negative for anti-HIV 1/2 and anti-HCV. This does not ensure the absence of these or other human pathogens.

Do not pipette by mouth.

Do not smoke, eat or drink in areas where specimens are handled.

Dispose of product in biohazard containers.

STORAGE

Panel members should be stored at -20°C or colder. Avoid repeat freeze-thaw cycles.

Alterations in physical appearance may indicate instability or deterioration. Solutions that are visibly turbid should be discarded.

INTERPRETATION OF RESULTS

The attached data sheet provides results for Panel members generated using commercially available HBsAg screening tests. Testing was performed in the laboratories of BBI or at internationally recognized referee laboratories (RL) by individuals who routinely use these tests procedures. All EIA results are means of duplicates, expressed as specimen absorbance to cutoff ratios (s/co); ratios greater than or equal to 1.0 are considered positive. All positive members were confirmed positive using the Genetic Systems HBsAg 2.0 Confirmatory Assay. HBsAg concentration was determined by comparison to BBI PHA807, Hepatitis B Surface Antigen Sensitivity Panel, using the Abbott Auszyme® Monoclonal EIA, Procedure B. HBV DNA was detected using the Roche COBAS Amplicor HBV Monitor™ Test. Results are single observations expressed as DNA copies/ml. The range of sensitivity for this assay is from 200-200,000 copies/ml.

LIMITATIONS

This Panel is offered for research use only. Not for use in diagnostic procedures. Data are provided for informational purposes. BBI does not claim that others can duplicate these results exactly.

For assistance, contact BBI Technical Support



375 West Street, West Bridgewater, MA 02379 USA
e-mail: info@bbi.com, website: www.bbi.com

October 2003
110 01-01

BBI Diagnostics
HBsAg Low Titer Performance Panel (Modified) PHA106(M)
Data Sheet

Member I.D. #	Matrix	Neut. %	HBsAg Conc. IU/ml	HBsAg EIA Test Results						HBV DNA Roche PCR copies/ml
				Abbott Proc. A ¹ s/co	Abbott Proc. B ² s/co	BioRad 3.0 Proc. A ³ s/co	BioRad 3.0 Proc. B ⁴ s/co	Ortho System 3 s/co		
PHA106-01	P	100	0.05	0.6	0.9	1.7	3.7	1.0	9 x 10 ²	
PHA106-02*	P	100	0.1	0.9	1.8	3.2	7.0	2.2	4 x 10 ³	
PHA106-03*	P	100	0.4	2.3	5.3	9.1	18.2	7.4	1 x 10 ⁴	
PHA106-04	P	100	0.3	1.8	4.0	6.3	13.3	4.9	2 x 10 ⁴	
PHA106-05	P	100	0.1	0.7	1.8	2.5	5.8	1.8	3 x 10 ³	
PHA106-06	P	100	0.6	4.0	7.1	10.8	21.1	11.0	2 x 10 ⁴	
PHA106-07	P	Neg	***	0.1	0.0	0.4	0.3	0.0	BLD	
PHA106-08	P	100	0.4	2.2	4.6	7.6	15.6	5.7	8 x 10 ³	
PHA106-09	P	100	0.1	0.7	1.7	3.1	6.9	2.2	1 x 10 ⁴	
PHA106-10	P	100	0.4	2.2	4.6	7.2	15.8	7.1	1 x 10 ³	
PHA106-11**	P	100	0.2	1.5	3.0	2.3	4.7	2.1	BLD	
PHA106-12	P	100	0.1	0.9	1.7	3.2	7.0	2.2	4 x 10 ³	
PHA106-13	P	100	0.3	2.5	3.8	7.2	16.0	7.6	3 x 10 ⁴	
PHA106-14	S	100	0.4	2.4	5.4	8.2	17.3	7.6	4 x 10 ⁴	
PHA106-15	S	100	0.3	3.1	4.0	5.8	15.5	5.8	2 x 10 ³	
Run Date:				19 JUN 01	19 SEP 01	27 AUG 03	29 AUG 03	21 AUG 03	10 OCT 01	
Kit Lot #:				75361M302	77349M302	041WCC-05	041WCC-05	HBK115	CO3216	
Exp. Date:				19 SEP 01	16 DEC 01	27 NOV 03	27 NOV 03	21 AUG 03	AUG 02	
Product #:				1980	1980	32591	32591	931902	87681	

Panel members 14 and 15 are no longer available. Data are provided for informational purposes.

CAUTION: Panel members were tested and most were found positive by tests for HBsAg. Panel members were tested and found negative for anti-HIV and HCV. The potential for transmission of infectious disease is present.

For research use only. Not for use in diagnostic procedures. Data are offered for informational purposes. BBI does not claim that others can duplicate these test results exactly. Testing was performed at BBI or at internationally recognized reference laboratories (RL) by individuals who routinely use these procedures. All EIA results are means of duplicates, expressed as specimen absorbance to cutoff ratios (s/co). Ratios ≥ 1.0 are considered reactive. HBV DNA results are single observations, expressed as DNA copies/ml. Specimens are undiluted aliquots from serum (S) or plasma (P) units collected from asymptomatic blood donors from 1994 through 2001.

Neg = negative; BLD = Below Level of Detection

*Member 02 is a bleed from the same donor as member 03 obtained 5 days earlier.

**Member 11 is the 1st positive bleed in a series of 3 positive bleeds from the same donor. All 3 bleeds were tested and found reactive for Hepatitis B Core IgM and IgG.

***Test results not available at this time. Please contact BBI Technical Support for current information. Tel (508)580-1900 or US Toll Free (800)676-1881.

¹Day Procedure, ²Overnight Procedure, ³Static Procedure, ⁴Shaker Procedure

----- INTERNATIONAL HBsAg EIA Tests, results expressed as s/co -----

Member ID.#	Abbott Architect RL23	Abbott AxSYM RL23	Abbott Dynamic RL23	Abbott PRISM RL23	Behring Enz. 5.0 RL23	BioRad Monolisa Plus RL23	Murex HBsAg 3.0 RL23	Ortho System 3 BBI	Ortho VITROS RL23	Roche COBAS RL36	Roche Elecys RL23
PHA106-01	1.2	1.3	1.5	2.0	1.5	1.1	1.3	1.5	0.7	0.7	1.8
PHA106-02	2.6	1.7	2.8	3.9	2.5	1.5	2.3	2.2	2.5	1.2	2.6
PHA106-03	4.4	4.2	9.7	11.7	7.8	5.1	7.2	7.2	9.3	4.1	7.5
PHA106-04	2.8	3.6	6.9	8.3	3.9	3.0	5.0	5.6	6.5	2.6	4.7
PHA106-05	1.4	1.6	2.4	3.5	2.0	1.4	2.1	1.9	1.9	1.0	2.3
PHA106-06	6.8	5.7	6.8	16.2	9.8	8.0	9.3	9.9	13.5	5.1	10.5
PHA106-07	***	0.5	***	0.2	0.3	***	***	0.2	0.1	***	0.4
PHA106-08	6.0	3.8	7.8	10.1	5.5	4.5	5.7	6.0	7.8	3.0	6.1
PHA106-09	2.6	1.9	2.7	4.1	2.8	1.9	2.7	2.2	2.7	1.5	2.8
PHA106-10	6.2	3.5	6.6	11.7	4.3	3.7	5.4	6.6	8.3	2.9	6.5
PHA106-11	7.6	4.7	4.7	9.0	5.4	1.1	4.2	2.2	2.5	1.3	5.9
PHA106-12	2.6	1.7	2.8	3.9	2.1	1.5	2.4	2.3	2.7	1.3	2.1
PHA106-13	6.4	3.8	9.6	11.4	5.9	5.3	7.3	7.4	9.4	3.3	7.6
PHA106-14	5.2	4.8	7.6	12.4	7.4	5.7	6.6	6.9	8.5	3.5	6.5
PHA106-15	6.6	5.3	7.1	11.9	5.1	4.2	5.3	5.1	6.3	2.5	5.5
Run Date:	26 SEP 01	24 OCT 01	17 OCT 01	09 OCT 01	23 OCT 01	02 AUG 01	29 OCT 01	02 AUG 01	24 OCT 01	05 DEC 01	08 OCT 01
Kit Lot #:	80419HP00	82030LU00	81057HP00	80322HP00	32706	IH0544	H413210	HBT225	300	156872	0021CE/01
Exp. Date:	13 JUL 02	10 MAR 02	21 JAN 02	08 AUG 02	09 FEB 03	30 JUL 02	28 JUL 02	06 AUG 01	26 MAR 02	01 JAN 03	31 OCT 02
Product #:	6C36	7A40	7B17	3A47	OOPW	72314	GE34/35	931801	8435307	20753505	1920532

Panel members 14 and 15 are no longer available. Data are provided for informational purposes.

1.10 ALLEGATO 5

HBsAg Mixed Titer Performance Panel (Modified)

PHA206(M)

INTENDED USE

The HBsAg Mixed Titer Performance Panel, PHA206(M), is a panel of naturally occurring plasma specimens. This Panel is intended for use by manufacturers and laboratories to evaluate their HBsAg test systems using well-characterized specimens and to provide comprehensive data for comparative analysis. For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

PRODUCT DESCRIPTION

PHA206(M) consists of a set of 24 specimens from units with reactivities ranging from weak to strong positive for HBsAg by commercially available screening tests. Two specimens negative by all screening methods are included as controls. Specimens are undiluted aliquots from plasma units collected from asymptomatic blood donors from 1999 to 2004. Units were processed by filtration. No preservatives were added.

REAGENTS

Cat. No. PHA206(M)-1.5 1 vial per member,
24 members, 1.5 ml per vial

PRECAUTIONS

BIOHAZARD CAUTION: Potentially infectious materials. Follow Universal Precautions. Panel members were tested and most were found positive by tests for HBsAg. Panel members were tested and found negative for anti-HCV and anti-HIV 1/2.

Do not pipette by mouth.

Do not smoke, eat or drink in areas where specimens are handled.

Dispose of this product in biohazard containers.

STORAGE

Panel members should be stored at -20°C or colder. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Alterations in physical appearance may indicate instability or deterioration. Solutions that are visibly turbid should be discarded.

INTERPRETATION OF RESULTS

The attached data sheet provides the results from HBsAg screening tests, confirmatory (neutralization) test results and HBV DNA test results. Tests were performed in the laboratories of SeraCare Life Sciences or in reference laboratories by individuals who routinely use these assay procedures. EIA results are expressed as specimen signal (O.D.) to cutoff ratios (s/co). Ratios ≥ 1.0 are considered reactive. Results expressed in IU/mL are quantitative. HBV DNA was detected using the Roche HBV Monitor™ COBAS Test, results are expressed as DNA copies/ml.

LIMITATIONS

This Panel is offered for research use only. Not for use in diagnostic procedures. Data are provided for informational purposes. SeraCare Life Sciences does not claim that others can duplicate these results exactly.

REFERENCES

1. CDC recommendations for prevention of HIV transmission in health care settings MMWR 36 (supp.2) 1987.

For assistance, contact SeraCare Life Sciences Technical Support

Phone (508) 244-6400 or US Toll Free (800) 676-1881

Visit our website at www.seracare.com



July 2009
12063-01
Page 1 of 3

SeraCare Life Sciences
 HBsAg Mixed Titer Performance Panel (Modified) - PHA206(M)
 Data Sheet
 Lot# 117132

Member I.D. #	HBsAg Test Results										HBV DNA
	Abbott HBsAg Neutralization EIA	Abbott HBsAg EIA Proc. ¹	Abbott HBsAg EIA Proc. ²	Abbott HBsAg EIA Proc. ³	Genetic Systems HBsAg EIA Proc. ⁴	Genetic Systems HBsAg EIA Proc. ⁵	Diasorin ETI-MAK-4 HBsAg EIA	Ortho® ELISA HBsAg System 3	Ortho Vitros® HBsAg (US)	Roche AmpliCor HBV Monitor v2.0	
	SeraCare SeraCare	SeraCare	SeraCare	SeraCare	SeraCare	SeraCare	SeraCare	SeraCare	SeraCare	SeraCare	
PHA206-01	0	0.1	0.0	0.1	0.3	0.3	0.1	0.0	0.1	<300	
PHA206-02	100	25.3	40.0	28.4	>32.3	28.0	63.8	82.2	96.1	> 2x10 ⁵	
PHA206-03	100	22.0	40.0	22.0	>32.3	28.0	59.9	58.6	70.0	> 2x10 ⁵	
PHA206-04	100	32.3	40.0	68.9	>32.3	28.0	63.8	111.1	4455.0	> 2x10 ⁵	
PHA206-05	100	32.3	40.0	68.9	>32.3	28.0	63.8	111.1	3990.0	> 2x10 ⁵	
PHA206-06	94	32.3	40.0	68.9	>32.3	28.0	63.8	111.1	3340.0	> 2x10 ⁵	
PHA206-07	100	17.1	32.4	20.0	>32.3	28.0	52.7	55.6	56.0	2x10 ⁵	
PHA206-08	100	12.6	23.2	11.8	32.0	28.0	38.5	35.4	36.7	1x10 ⁵	
PHA206-09	100	14.8	31.0	15.4	>32.3	28.0	38.6	37.1	40.7	2x10 ⁵	
PHA206-10	99	5.7	11.9	5.3	19.0	16.8	12.8	15.4	17.7	4x10 ⁴	
PHA206-11	100	5.8	14.0	5.4	14.2	12.8	15.5	14.2	13.4	7x10 ⁴	
PHA206-12	100	5.9	9.9	6.0	24.0	26.4	17.3	20.6	25.5	2x10 ⁵	
PHA206-13	100	6.6	11.2	5.6	19.6	13.9	17.1	12.4	15.1	1x10 ⁵	
PHA206-14	100	3.7	7.2	3.5	14.4	16.0	10.0	13.9	10.4	5x10 ⁴	
PHA206-15	98	3.2	5.7	2.7	4.7	5.3	4.0	3.5	2.4	5x10 ⁴	
PHA206-16	100	1.9	4.0	1.9	7.6	8.4	4.5	4.7	5.3	4x10 ⁴	
PHA206-17	98	0.7	1.5	0.7	2.9	5.0	1.3	0.8	0.7	<300	
PHA206-18	100	3.2	2.8	1.9	5.2	2.0	6.3	6.0	2.0	2x10 ⁴	
PHA206-19	88	3.1	4.2	2.1	4.6	6.2	1.9	1.0	1.6	6x10 ⁴	
PHA206-20	100	2.0	2.9	2.1	8.5	14.1	6.2	3.7	5.9	2x10 ⁵	
PHA206-21	100	2.9	5.2	2.2	9.5	15.2	5.2	3.6	4.9	2x10 ⁵	
PHA206-22	100	0.5	1.2	0.5	3.3	2.8	2.3	1.6	1.3	<300	
PHA206-23	97	1.0	1.8	0.9	NA	4.1	2.5	1.7	1.8	5x10 ⁴	
PHA206-24	89	0.6	1.2	0.7	3.5	3.5	1.6	1.4	0.9	9x10 ⁴	
PHA206-25	0	0.1	0.0	0.1	0.6	0.2	0.1	0.2	0.1	<300	
Run Date:	10 MAR 05	02 MAR 05	3 MAR 05	02 MAR 05	06 MAR 09	03 MAR 05	27 JAN 05	19 JAN 05	22 MAR 05	14 MAY 05	
Kit Lot #:	24372M100	21881M100	22672M100	22672M100	219CCC-05	313XCC-05	0710160B	HBK140	5720	F08141	
Exp. Date:	OCT 05	JUN 05	JUN 05	JUN 05	JUN 09	OCT 05	MAY 05	SEP 05	JUN 05	05 JUN 05	
Product #:	1012-10	1980	1980	1980	32591	32591	P001932	931902	ECI	87681	

CAUTION: These materials have not been inactivated and should be handled as potentially biohazardous. Follow Universal Precautions.
 Panel members were tested and most were found positive by tests for HBsAg. Panel members were tested and found negative for anti HIV and anti HCV. The potential for transmission of infectious disease is present.

Panel member 23 is no longer available. Data are provided for informational purposes only.

For research use only. Not for use in diagnostic procedures. Data are offered for informational purposes. SeraCare Life Sciences does not claim that others can duplicate these test results exactly. Results were generated using commercially available tests, performed at SeraCare Life Sciences and at internationally recognized laboratories (IL) by individuals who routinely use these procedures. HBsAg results are means of duplicates unless otherwise noted, expressed as s/co or Index, according to manufacturer's instructions. Ratios ≥1.0 are considered reactive. Confirmation of HBsAg positivity is defined as 50% or greater neutralization. Specimens are undiluted aliquots from plasma or serum units from 1999-2004. Processing consisted of filtration. No preservatives were added.

¹Day Procedure, ²Ovenight Procedure, ³Short Procedure, ⁴Static Procedure, ⁵Shaker Procedure

Additional data may be available. Please contact SeraCare Life Sciences Customer Service for current information. Tel (508) 244-6400 or US Toll Free (800) 676-1881. Or, visit us on the web at www.seracare.com

July 2009
 12063-01
 page 2 of 3

SeraCare Life Sciences
HBsAg Mixed Titer Performance Panel (Modified) - PHA206(M)
Data Sheet
Lot# 117132

Member ID #	Abbott Prism® HBsAg	Abbott Axsym HBsAg	Abbott Architect® Quant HBsAg	Ortho Vitros® HBsAg (EUR)	DADE Behring Enzygnost® HBsAg v5.0	Abbott Imx® HBsAg	Roche Cobas® Core HBsAg	Biokit Bioelisa HBsAg v3.0	Murex HBsAg v.3.0	Bayer ADVIA Centaur® HBsAg
	RL s/co	RL s/co	RL IU/mL	RL s/co*	RL s/co*	RL s/co*	RL s/co*	RL s/co*	RL s/co*	RL Index
PHA206-01	0.4	0.5	0.0	0.1	0.2	0.5	0.1	0.4	0.4	<0.1
PHA206-02	120.0	31.8	4.2	102.0	33.9	49.8	59.0	22.1	>max	150.9
PHA206-03	89.9	22.4	3.4	73.2	43.9	31.9	47.4	24.7	35.9	59.9
PHA206-04	691.0	226.4	>250	3390.0	43.9	140.0	74.5	46.7	>max	>1000
PHA206-05	691.0	233.4	>250	4630.0	43.9	172.2	74.5	42.8	>max	>1000
PHA206-06	599.0	186.4	>250	4180.0	43.9	157.7	74.5	43.4	>max	>1000
PHA206-07	78.9	21.6	2.7	59.7	43.9	33.2	44.6	22.6	31.9	81.8
PHA206-08	52.1	14.9	2.0	38.4	37.3	24.3	25.3	14.8	26.1	66.2
PHA206-09	67.2	18.7	2.7	46.3	22.2	27.7	32.8	18.6	30.9	48.4
PHA206-10	22.4	6.3	0.8	18.4	13.4	9.8	10.8	4.1	11.5	16.3
PHA206-11	25.2	8.1	0.8	14.6	10.6	11.7	9.8	5.0	11.1	27.5
PHA206-12	34.8	9.8	1.2	27.3	20.3	14.3	16.0	9.3	16.3	28.4
PHA206-13	24.3	8.2	0.8	2.5	26.2	15.9	10.6	4.8	13.2	25.7
PHA206-14	19.0	4.8	0.7	12.0	7.9	8.2	7.8	4.6	7.4	15.8
PHA206-15	8.7	2.6	0.3	3.0	6.6	4.3	3.6	2.6	5.6	12.5
PHA206-16	7.9	2.8	0.3	6.0	7.1	3.9	4.9	2.9	4.8	4.2
PHA206-17	2.5	1.6	0.1	1.0	1.7	1.8	1.2	1.2	2.0	2.7
PHA206-18	5.5	1.7	0.2	2.5	2.9	5.3	2.2	1.0	3.6	8.5
PHA206-19	8.6	3.0	0.4	1.9	2.6	4.8	2.7	1.7	4.1	9.8
PHA206-20	9.8	3.6	0.3	3.6	11.8	5.9	4.6	2.4	5.2	6.5
PHA206-21	14.4	4.6	0.5	6.0	6.8	9.4	5.7	3.2	4.7	14.3
PHA206-22	1.9	1.2	0.1	1.6	1.6	2.7	0.5	1.0	1.9	1.6
PHA206-23	4.4	1.4	0.1	2.4	2.4	2.9	2.1	1.5	2.3	4.6
PHA206-24	2.8	1.3	0.1	1.3	2.2	1.9	1.2	1.3	1.6	2.6
PHA206-25	0.7	0.7	0.0	0.2	0.4	0.6	0.2	0.5	0.5	0.1
Run Date:	21 APR 05	13 MAY 05	28 APR 05	09 MAY 05	02 MAY 05	22 APR 05	12 MAY 05	28 APR 05	27 APR 05	11 MAY 05
Kit Lot #:	27561HN00	28120LU00	27188HN00	1450	35299	23193LU02	167989-01	D1205	JO34410	64279110
Exp. Date:	27 JAN 06	29 SEP 05	21 MAR 06	08 NOV 05	16 SEP 06	17 MAY 05	31 DEC 05	01 APR 06	28 FEB 06	29 DEC 05
Product #:	3A-47-48	7A40-10	6C36-22	8435307	OQPW	LN2228-22	2054	3000-1130	GE34/35	3393362

CAUTION: These materials have not been inactivated and should be handled as potentially biohazardous. Follow Universal Precautions.
Panel members were tested and most were found positive by tests for HBsAg. Panel members were tested and found negative for anti-HIV and anti-HCV. The potential for transmission of infectious disease is present.
Panel member 23 is no longer available. Data are offered for informational purposes only.

For research use only. Not for use in diagnostic procedures. Data are offered for informational purposes. SeraCare Life Sciences does not claim that others can duplicate these test results exactly. Results were generated using commercially available tests, performed at SeraCare Life Sciences and at internationally recognized laboratories (RL) by individuals who routinely use these procedures. HBsAg results are means of duplicates unless otherwise noted, expressed as s/co or Index, according to manufacturer's instructions. Ratios ≥ 1.0 are considered reactive. HBsAg concentrations in International Units (IU) were determined with the Abbott Architect assay. Specimens are undiluted aliquots from plasma units collected from asymptomatic plasma donors. Processing consisted of filtration. No preservatives were added.

* Data represent one replicate.

1.11 BIBLIOGRAFIA

1. Lee W. "Hepatitis B virus infection" *N. Engl. J. Med.* 1997;337:1733-1745
2. Dehesa-Violante M., Nunez-Nateras R. "Epidemiology of Hepatitis virus B and C" *Arch. Med. Res.* 38 (2007) 606-611
3. Goudeau A. "Epidemiology and eradication strategy for hepatitis B in Europe. The european regional study group" *Veccine* 1990;8:S113-6
4. Stroffolini T., Pasquini P., Mele A. "HBsAg carriers among pregnant women in Italy: results from the screening during a vaccination campaign against hepatitis B" *Public Health* 1988;102:329-33
5. De Bac C., Stroffolini T., Gaeta G.B., Taliani G., Giusti G. "pathogenic factors in cirrhosis with and without hepatocellular carcinoma: a multicenter italian study" *Hepatology* 1994;20:1225-30
6. Zuckerman AJ, Zuckerman JN "Molecular epidemiology of hepatitis B virus mutants" *J Med Virol.* 1999;58(3):193-5
7. Makidon PE, Bielinska AU, Nigavekar SS, Janczak KW, Knowlton J, Scott AJ, Mank N, Cao Z, Rathinavelu S, Beer MR, Wilkinson JE, Blanco LP, Landers JJ, Baker JR Jr. "Pre-clinical evaluation of a novel nanoemulsion-based hepatitis B mucosal vaccine" *PLoS ONE* 2000;3(8):e2954
8. Shepard CW, Simard EP, Finelli L, Fiore AE, Bell BP. "Hepatitis B virus infection: epidemiology and vaccination" *Epidemiol Rev.* 2006;28:112-25.
9. Koff RS. Review article "vaccination and viral hepatitis - current status and future prospects" *Aliment Pharmacol Ther* 2007;26(10):1285-92
10. European Consensus Group on hepatitis B immunity. Are booster immunizations needed for lifelong hepatitis B immunity *Lancet* 2000;355:561-565
11. Zuckerman JN, Zuckerman AJ "Current topics in hepatitis B" *J Infect.* 2000 ;41(2):130-6
12. Ramakrishna B, Mukhopadhyaya A, Kurian G. "Correlation of hepatocyte expression of hepatitis B viral antigens with histological activity and viral titer in chronic hepatitis B virus infection. An immunohistochemical study" *J Gastroenterol Hepatol* 2008
13. Fattovich G, Bortolotti F, Donato F. "Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors" *J Hepatol.* 2008;48(2):335-52.
14. Zhu R, Zhang HP, Yu H, Li H, Ling YQ, Hu XQ, Zhu HG. "Hepatitis B virus mutations associated with in situ expression of hepatitis B core antigen, viral load and prognosis in chronic hepatitis B patients" *Pathol Res Pract.* 2008

15. Lok AS, Chung HT, Liu VW, Ma OC. "Long-term follow-up of chronic hepatitis B patients treated with interferon alfa" *Gastroenterology* 1993 ;105(6):1833-8
16. Lee WM "Hepatitis B virus infection" *N Engl J Med.* 1997;337(24):1733-45
17. Yokosuka O, Arai M "Molecular biology of hepatitis B virus: effect of nucleotide substitutions on the clinical features of chronic hepatitis B" *Med Mol Morphol* 2006;39(3):113-20
18. Lee WM "Hepatitis B virus infection" *N Engl J Med* 1997;337(24):1733-45
19. Miller RH, Kaneko S, Chung CT, Girones R, Purcell RH "Compact organization of the hepatitis B virus genome" *Hepatology* 1989;9(2):322-7
20. Wright TL, Lau JY "Clinical aspects of hepatitis B virus infection" *Lancet* 1993;342(8883):1340-4
21. Eckhardt SG, Milich DR, McLachlan A "Hepatitis B virus core antigen has two nuclear localization sequences in the arginine-rich carboxyl terminus" *J Virol* 1991;65(2):575-82
22. Thomas HC "The emergence of envelope and precore/core variants of hepatitis B virus: the potential role of antibody selection" *J Hepatol* 1995;22(1 Suppl):1-8
23. Chang LJ, Hirsch RC, Ganem D, Varmus HE "Effects of insertional and point mutations on the functions of the duck hepatitis B virus polymerase" *J Virol* 1990;64(11):5553-8
24. Hirsch RC, Lavine JE, Chang LJ, Varmus HE, Ganem D "Polymerase gene products of hepatitis B viruses are required for genomic RNA packaging as well as for reverse transcription" *Nature* 1990;344(6266):552-5
25. Balsano C, Avantaggiati ML, Natoli G, De Marzio E, Will H, Perricaudet M, Levrero M "Full-length and truncated versions of the hepatitis B virus (HBV) X protein (pX) transactivate the cmyc protooncogene at the transcriptional level" *Biochem Biophys Res Commun* 1991;176(3):985-92
26. Avantaggiati ML, Natoli G, Balsano C, Chirillo P, Artini M, De Marzio E, Collepardo D, Levrero M "The hepatitis B virus (HBV) pX transactivates the c-fos promoter through multiple cis-acting elements" *Oncogene* 1993;8(6):1567-74
27. Summers J, Mason WS "Replication of the genome of a hepatitis B--like virus by reverse transcription of an RNA intermediate" *Cell* 1982;29(2):403-15
28. Kann M, Bischof A, Gerlich WH "In vitro model for the nuclear transport of the hepadnavirus genome" *J Virol* 1997;71(2):1310-6
29. Mason WS, Aldrich C, Summers J, Taylor JM "Asymmetric replication of duck hepatitis B virus DNA in liver cells: Free minus-strand DNA" *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982;79(13):3997-4001

30. Weber B “Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact” *J Clin Virol* 2005;32(2):102-12
31. Carman WF “The clinical significance of surface antigen variants of hepatitis B virus” *J Viral Hepat* 1997;4 Suppl 1:11-20
32. Gerken G, Kremsdorf D, Capel F, Petit MA, Dauguet C, Manns MP, Meyer zum Büschenfelde KH, Brechot C “Hepatitis B defective virus with rearrangements in the preS gene during chronic HBV infection” *Virology* 1991;183(2):555-65
33. Kekulé AS, Lauer U, Meyer M, Caselmann WH, Hofschneider PH, Koshy R “The preS₂/S region of integrated hepatitis B virus DNA encodes a transcriptional transactivator” *Nature* 1990;343(6257):457-61
34. Lee HS, Ulrich PP, Vyas GN “Mutations in the S-gene affecting the immunologic determinants of the envelope protein of hepatitis B virus” *J Hepatol* 1991;13 Suppl 4:S97-101
35. Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G, Tanzi E, Zuckerman AJ, Thomas HC “Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus” *Lancet* 1990;336(8711):325-9
36. Moriyama K, Nakajima E, Hohjoh H, Asayama R, Okochi K “Immunoselected hepatitis B virus mutant” *Lancet* 1991;337(8733):125
37. Okamoto H, Yano K, Nozaki Y, Matsui A, Miyazaki H, Yamamoto K, Tsuda F, Machida A, Mishiro S “Mutations within the S gene of hepatitis B virus transmitted from mothers to babies immunized with hepatitis B immune globulin and vaccine” *Pediatr Res* 1992;32(3):264-8
38. McMahon G, Ehrlich PH, Moustafa ZA, McCarthy LA, Dottavio D, Tolpin MD, Nadler PI, Ostberg L “Genetic alterations in the gene encoding the major HBsAg: DNA and immunological analysis of recurrent HBsAg derived from monoclonal antibody-treated liver transplant patients” *Hepatology* 1992;15(5):757-66
39. Hawkins AE, Gilson RJ, Gilbert N, Wreghitt TG, Gray JJ, Ahlers-de Boer I, Tedder RS, Alexander GJ “Hepatitis B virus surface mutations associated with infection after liver transplantation” *J Hepatol* 1996;24(1):8-14
40. Ly TD, Servant-Delmas A, Bagot S, Gonzalo S, Férey MP, Ebel A, Dussaix E, Laperche S, Roque-Afonso AM “Sensitivities of four new commercial hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) assays in detection of HBsAg mutant forms” *J Clin Microbiol* 2006;44(7):2321-6

41. Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S, Karayiannis P, McGarvey MJ, Makris A, Thomas HC "Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection" *Lancet* 1989;2(8663):588-91
42. Thomas HC, Carman WF "The host immune response may be responsible for selection of envelope and precore/core variants of HBV" *J Hepatol* 1991;13 Suppl 4:S108-13
43. Bonino F, Brunetto MR, Rizzetto M, Will H "Hepatitis B virus unable to secrete e antigen" *Gastroenterology* 1991;100(4):1138-41
44. Nakahori S, Yokosuka O, Ehata T, Chuang WL, Imazeki F, Ito Y, Ohto M "Detection of hepatitis B virus precore stop codon mutants by selective amplification method: frequent detection of precore mutants in hepatitis B e antigen positive healthy carriers" *J Gastroenterol Hepatol.* 1995 Jul-Aug;10(4):419-25
45. Ehata T, Omata M, Yokosuka O, Hosoda K, Ohto M "Variations in codons 84-101 in the core nucleotide sequence correlate with hepatocellular injury in chronic hepatitis B virus infection" *J Clin Invest* 1992;89(1):332-8
46. Chuang WL, Omata M, Ehata T, Yokosuka O, Ito Y, Imazeki F, Lu SN, Chang WY, Ohto M "Precore mutations and core clustering mutations in chronic hepatitis B virus infection" *Gastroenterology* 1993;104(1):263-71
47. Kwon SY, Choe WH, Lee CH, Yeon JE, Byun KS "Rapid re-emergence of YMDD mutation of hepatitis B virus with hepatic decompensation after lamivudine retreatment" *World J Gastroenterol* 2008;14(27):4416-9
48. Norder H, Couroucé AM, Magnius LO "Molecular basis of hepatitis B virus serotype variations within the four major subtypes" *J Gen Virol* 1992;73 (Pt 12):3141-5
49. Zuckerman JN, Zuckerman AJ "Mutations of the surface protein of hepatitis B virus" *Antiviral Res* 2003;60(2):75-8
50. Thakur V, Kazim SN, Guptan RC, Hasnain SE, Bartholomeusz A, Malhotra V, Sarin SK "Transmission of G145R mutant of HBV to an unrelated contact" *J Med Virol* 2005;76(1):40-6

2. LA STIMOLAZIONE DI B7H INIBISCE L'ADESIVITÀ DI CELLULE ENDOTELIALI VASCOLARI NEI CONFRONTI DI LINEE CELLULARI TUMORALI E POLIMORFONUCLEATI DI SANGUE PERIFERICO

2.1 INTRODUZIONE

2.1.1 L'ENDOTELIO NELLA RISPOSTA INFIAMMATORIA

L'endotelio vascolare consiste di un singolo strato di cellule che possono essere coinvolte nei processi di angiogenesi, omeostasi, scambio di soluti e infiammazione.

L'infiammazione è una risposta fisiologica a numerosi stimoli come infezioni e danno tissutale. Nel corso della risposta infiammatoria sono prodotte varie citochine e altri mediatori infiammatori che agiscono sui vasi sanguigni locali e inducono in primo luogo vasodilatazione, aumento della permeabilità vascolare ed un'aumentata espressione di molecole di adesione (cell-adhesion molecules, CAMs) endoteliali. Si dice allora che l'endotelio è attivato o infiammato. Con la vasodilatazione si ha l'aumento del volume di sangue nell'area interessata e la riduzione della velocità del flusso ematico, mentre con l'aumento della permeabilità vascolare si ha un accumulo di liquidi (edema) nel tessuto e lo stravasamento di leucociti.

Linfociti, Monociti e Granulociti circolanti esprimono molecole che interagendo con le CAMs consentono loro lo stravasamento e il raggiungimento dei tessuti [1-3].

La maggior parte delle CAMs appartiene a quattro famiglie di molecole: la famiglia delle Selectine, la famiglia delle Mucine, la famiglia delle Integrine e la superfamiglia delle Immunoglobuline.

Le selectine sono caratterizzate da un dominio distale di tipo lectinico che permette a queste molecole di legarsi a strutture glicidiche ricche di acido sialico spesso legate alle molecole di tipo mucinico. La famiglia delle selectine comprende tre molecole dette L-selectina, E-selectina e P-selectina.

La maggior parte dei leucociti circolanti esprime la L-selectina, mentre la E-selectina è espressa da cellule endoteliali attivate e la P-selectina è espressa da piastrine ed endotelio vascolare attivato [4].

Le mucine sono un gruppo di proteine intensamente glicosilate ricche di serina e treonina, che interagiscono con le Selectine [5].

Le integrine sono proteine eterodimeriche (formate da una catena α e una catena β) espresse dai leucociti. Diverse popolazioni leucocitarie esprimono diverse integrine, il che permette a queste

cellule di interagire con CAMs diverse, appartenenti alla superfamiglia delle immunoglobuline, espresse dall'endotelio vascolare. Alcune integrine devono essere attivate per potersi legare con alta affinità ai loro ligandi [6-7]. Nella superfamiglia delle immunoglobuline sono incluse ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, e VCAM [8].

I neutrofilii sono in genere le prime cellule che interagiscono con l'endotelio attivato e stravasano nei tessuti. Lo stravasamento sia di neutrofilii sia di linfociti procede attraverso quattro fasi: rotolamento, segnale chemotattico attivatorio, arresto e adesione, migrazione transendoteliale (Fig. 1).

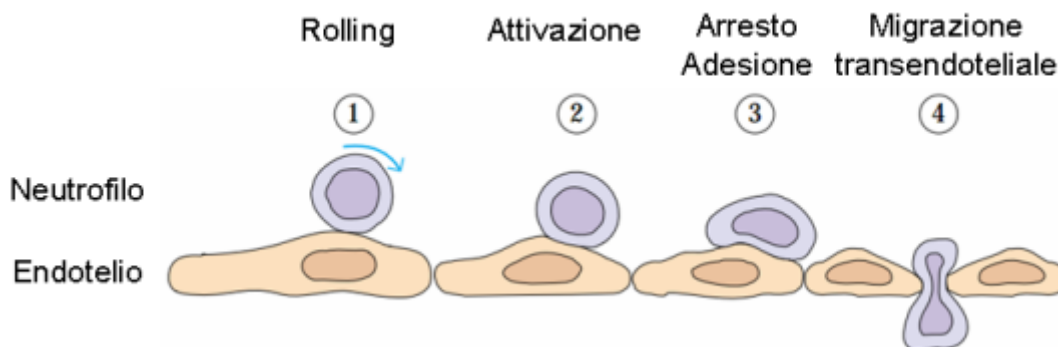


Fig. 1 Fasi dello stravasamento leucocitario.

Le molecole E-Selectina e P-Selectina si legano ai loro ligandi sulla membrana dei neutrofilii, questa interazione lega debolmente i neutrofilii alle cellule endoteliali e la forza del flusso del sangue circolante induce il rotolamento del neutrofilo sull'endotelio [9-10]. Mentre rotola il neutrofilo è attivato da varie molecole chemotattiche, le quali possono essere presenti permanentemente sulla superficie delle cellule endoteliali oppure essere secrete localmente da cellule coinvolte nella risposta infiammatoria. Interleuchina 8 (IL-8) e MIP-1 β sono due chemochine coinvolte in questo processo di attivazione. Il legame di queste molecole chemotattiche a recettori sulla membrana dei neutrofilii innesca un segnale di attivazione mediato da proteine G associate al recettore. Questo segnale induce una modificazione conformazionale delle integrine dei neutrofilii, detta attivazione, che ne aumenta l'affinità per le molecole di adesione della superfamiglia delle Ig espresse dall'endotelio [11-12]. Il legame delle integrine con le CAMs della superfamiglia delle Ig stabilizza l'adesione del neutrofilo all'endotelio.

I neutrofilii fagocitano i patogeni invasori e rilasciano mediatori chemochinici, come la proteina macrofagica infiammatoria (macrophage inflammatory protein MIP-1 α e MIP-1 β), che attirano i macrofagi nella sede dell'infiammazione. I macrofagi attivati sono dotati di elevata attività fagocitica e sono capaci di rilasciare elevate quantità di mediatori e citochine coinvolti nella risposta infiammatoria.

I macrofagi tessutali attivati secernono IL-1, IL-6 e TNF- α che agiscono localmente favorendo la coagulazione e l'aumento della permeabilità vascolare, inducendo una aumentata espressione di molecole di adesione da parte delle cellule endoteliali dei vasi. In particolare, TNF- α stimola l'espressione di E-Selectina, mentre IL-1 induce una aumentata espressione di ICAM-1 e VCAM-1, che legano le integrine espresse da linfociti e monociti. I neutrofilii circolanti, i monociti e i linfociti aderiscono alla parete dei vasi sanguigni riconoscendo queste molecole di adesione e quindi attraversano la parete del vaso e passano negli spazi tessutali. Il risultato di questo processo è un influsso di linfociti, neutrofilii monociti, eosinofili, basofili e mastcellule nel sito di danno tissutale, dove queste cellule partecipano alla eliminazione dell'antigene e alla riparazione del tessuto [1-2].

L'interazione con le cellule dell'endotelio vascolare svolge anche un ruolo chiave nella formazione di metastasi tumorali per via ematica. Questo processo inizia quando le cellule del tumore primario penetrano nei vasi sanguigni, si disperdono nel torrente circolatorio e quindi stravasano in tessuti distanti rispetto alla sede di formazione del tumore primario [13-15]. Questo stravasamento sfrutta meccanismi e molecole identici a quelli coinvolti nello stravasamento di leucociti. Le cellule tumorali esprimono i ligandi delle Selectine che legano le Selectine espresse dall'endotelio; questa prima interazione media il rolling delle cellule pre-metastatiche sulle cellule endoteliali. Le integrine delle cellule cancerose, durante il rolling, sono attivate da chemochine presenti nel microambiente e mediano un'adesione più stabile ai loro ligandi sull'endotelio iniziando il processo di tras migrazione endoteliale [16].

L'interazione tra Selectine e ligandi partecipa alla progressione tumorale in due fasi: nella formazione di aggregati con leucociti e piastrine e nell'interazione con le cellule endoteliali che inizia il processo di stravasamento [17].

Le cellule tumorali esprimono sialomucine che agiscono da ligandi per le Selectine; queste interagiscono principalmente con strutture glicidiche ricche di acido sialico spesso legate alle molecole di tipo mucinico, tra queste molecole vi sono Sialyl Lewis-a, Sialyl Lewis-x, CD34, MAdCAM-1 e CD44 [16, 18-20].

I ligandi sialilati sono fortemente espressi da cellule tumorali e in particolare Sialyl Lewis-a (sLe-a) è considerato un marker tumorale. L'anticorpo CA19-9 è in grado di riconoscere in modo specifico questa molecola ed è attualmente in uso per la diagnosi del cancro all'intestino e al pancreas [21]. È stato inoltre suggerito che ligandi per le Selectine trasducano segnali nelle cellule tumorali [22-23].

2.1.2 LA MOLECOLA COSTIMOLATORIA H4/ICOS

L'attivazione dei linfociti T rappresenta un evento centrale nella generazione della risposta immunitaria e ad essa consegue un'espansione clonale delle cellule immunocompetenti con l'acquisizione di funzioni effettrici [24-25]. Tale fenomeno è accompagnato da variazioni nell'espressione di alcuni geni che codificano per molecole di superficie coinvolte nella proliferazione cellulare, nelle funzioni effettrici e nelle interazioni cellula-cellula. Secondo il modello d'attivazione del doppio segnale, i linfociti T necessitano, affinché siano indotte proliferazione e differenziamento in cellule effettrici, di due distinti segnali: il primo è fornito in seguito all'interazione del complesso MHC-peptide (presente sulla superficie delle APC) con il TCR ed i corecettori CD4 e CD8; il secondo è fornito da molecole costimolatorie che interagiscono con specifici ligandi espressi sulle APC [26].

CD28 è la molecola con funzione costimolatoria positiva meglio caratterizzata, sia a livello funzionale sia molecolare e riveste il ruolo più importante nell'indurre attivazione di linfociti naive.

Le molecole CD28, CTLA-4 (CD152) e ICOS appartengono alla famiglia di CD28 sono caratterizzate da un singolo dominio IgV-like ed una breve coda citoplasmatica. Esse mappano nell'uomo nella regione cromosomica 2q33 e questo suggerisce che i tre geni siano originati da duplicazione genica [27].

CD28 e CTLA-4 presentano lo stesso motivo MYPPPY nella porzione extracellulare, che è responsabile dell'interazione con i ligandi B7.1 (CD80) e B7.2 (CD86); ICOS, presenta invece il motivo FDPPPF, responsabile del legame con il suo unico recettore B7h (B7rp1, GL50, B7H2, LICOS) [28-29].

Nonostante l'analogia a livello aminoacidico, le tre molecole differiscono da un punto di vista funzionale. CD28 ed ICOS mediano segnali stimolatori per il linfocita, in sinergia o in momenti e microambienti diversi della risposta immunitaria; CTLA-4 invece invia segnali inibitori che tendono ad attenuare la risposta linfocitaria.

Le molecole B7 sono presenti sulla superficie di APC (*Antigen Presenting Cell*) professioniste quali cellule dendritiche (DCs), macrofagi e linfociti B attivati. Da un punto di vista funzionale B7.1 e B7.2 possono essere distinguibili più per una diversa cinetica d'espressione, che per una diversa trasduzione del segnale indotta nel linfocita. B7.1 è espresso da DC solo in seguito ad attivazione, B7.2 è già espresso a bassi livelli da DC inattivate e rapidamente indotto in seguito ad attivazione [26].

H4/ICOS rappresenta il terzo membro della famiglia di CD28. E' espresso in seguito all'attivazione linfocitaria da linfociti CD8⁺ e CD4⁺, come CTLA-4 ed intensifica tutte le risposte

basali dei linfociti T all'antigene: proliferazione, secrezione di citochine, espressione di molecole che mediano l'interazione cellula-cellula. L'interazione di ICOS con B7h gioca inoltre un ruolo importante nella cooperazione linfociti B/linfociti T [27]. H4/ICOS è stata inizialmente descritta, come H4, nel nostro laboratorio sia nel topo sia nell'uomo [30-31]. Successivamente è stata clonata, come ICOS (*inducible T cell costimulator*), da altri autori [32]. Nel nostro laboratorio è stato poi dimostrato che H4 ed ICOS sono la stessa molecola [33].

ICOS è una molecola transmembrana di tipo I ed è espressa in forma monomerica o come omodimero. Nell'uomo è costituita da 199 amminoacidi e la forma dimerica è probabilmente data da legami disolfuro tra residui di Cisteina nella regione extracellulare in posizione membrano-prossimale. Ogni catena ha una coda citoplasmatica di 35 amminoacidi, una regione transmembrana di 23 amminoacidi ed una regione extracellulare di 141 amminoacidi con un singolo dominio immunoglobulinico stabilizzato da due Cisteine conservate in posizione 42 e 109. La forma dimerica ICOS ha un peso molecolare apparente di 55-60 kDa, mentre le singole catene 27-29 kDa.

La parte citoplasmatica lega la fosfatidilinositolo-3 chinasi (PI3K) tramite il motivo Tyr-Met-Phe-Met, fino ad ora non sono stati identificati altri interattori della molecola, si pensa quindi che la costimolazione mediata da ICOS sia per lo più dipendente da PI3K, la cui attività è stimolata in misura maggiore rispetto a CD28 [27].

Pur appartenendo alla stessa famiglia, CD28 e ICOS si differenziano in alcuni importanti aspetti. CD28 è espresso costitutivamente sulla superficie dei linfociti T, ICOS viene espresso solo in seguito all'attivazione linfocitaria, come CTLA-4; la molecola è già espressa 24 ore dopo l'attivazione. Entrambe inducono la sintesi di citochine (IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ , TNF- α), ma soltanto CD28 stimola la sintesi di IL-2 ed IL-9 [34]. Inoltre ICOS non lega i ligandi di CD28 e CTLA-4, B7-1 (CD80), e B7-2 (CD86), ma lega la molecola B7-h, l'unico ligando di ICOS (e viceversa).

B7h è espresso da linfociti B, monociti e dendritiche, ma anche da APCs non professioniste quali fibrociti, cellule endoteliali, cellule epiteliali dei tubuli renali e cellule staminali embrionali [35-38].

L'interazione di ICOS con il suo ligando gioca un ruolo importante nella cooperazione linfociti B/linfociti T. In particolare ICOS ha un ruolo nel differenziamento e nello sviluppo della memoria dei linfociti B, nello switch isotipico delle immunoglobuline e nella formazione dei centri germinali [39-41]. Queste evidenze sono state confermate dal fenotipo di pazienti con immunodeficienza comune variabile che presentavano perdita omozigote di ICOS [42].

Secondo un modello oggi accettato, inizialmente il legame di CD28 con i ligandi B7-1 o B7-2 espressi dai linfociti B avvia la comunicazione B/T; contemporaneamente è indotta l'espressione di ICOS, la cui interazione col ligando modula la produzione citochinica dei linfociti T, favorendo soprattutto la produzione di IL-4 e IL-10; in una terza fase viene espresso CTLA-4 che opera un'azione negativa sull'attivazione del linfocita T.

Nel topo l'attivazione di ICOS è stata correlata con l'induzione della secrezione di IL-4 da parte di cellule Th2 oppure della secrezione di IL10 da parte di cellule T regolatorie, ma può anche indurre secrezione di IFN γ in cellule Th1 [43-45]. Nell'uomo invece la costimolazione ICOS in cellule Th naive promuove la secrezione di IFN γ in presenza di IL-2 e IL-10 e secrezione di TGF- β in sua assenza [46].

Le cellule endoteliali (ECs) esprimono molecole coinvolte nell'attivazione di cellule T e possono agire come APCs semiprofessioniste capaci di attivare cellule T in determinate circostanze. Queste molecole includono molecole MHC di classe I e II presentanti peptidi antigenici alle cellule T, nonché molecole costimolatorie che modulano l'attivazione delle cellule T (DC40 e LFA-3) ed altre molecole che appartengono alla famiglia di B7 (B7h, B7-H1 e B7-DC) [47]. La capacità delle ECs di stabilire interazioni con le cellule T è coinvolta nell'attivazione della risposta immune adattativa di memoria, nel rigetto di trapianto e nel reclutamento di linfociti T effettori antigene-specifici nei siti di infezione. Un aspetto speculare dell'interazione tra cellule T ed ECs è che anche le cellule T possono modulare la funzione delle EC. Questo effetto può essere mediato da citochine secrete da cellule T come IFN γ capace di attivare le ECs, ma anche da interazioni contatto-dipendenti, come quelle mediate dalla stimolazione di CD40 sulle ECs da parte del suo ligando espresso dalle cellule T, che induce l'espressione di molecole di adesione e chemochine da parte delle ECs [48].

2.2 SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questo lavoro è stato valutare gli effetti della stimolazione di B7h espresso dalle ECs sulla loro capacità di sostenere l'adesione di cellule tumorali e infiammatorie, utilizzando una forma solubile ricombinante di ICOS (ICOS-Fc).

Il lavoro originale è riportato di seguito (ALLEGATO 6).

2.3 ALLEGATO 6

B7h Triggering Inhibits Umbilical Vascular Endothelial Cell Adhesiveness to Tumor Cell Lines and Polymorphonuclear Cells

Chiara Dianzani,* Rosalba Minelli,* Riccardo Mesturini,[†] Annalisa Chiochetti,[†] Giuseppina Barrera,[‡] Sabrina Boscolo,[§] Chiara Sarasso,[†] Casimiro Luca Gigliotti,[†] Daniele Sblattero,[†] Junji Yagi,[¶] José Maria Rojo,^{||} Roberto Fantozzi,* and Umberto Dianzani[†]

Vascular endothelial cells (ECs) are key players in leukocyte recruitment into tissues and metastatic dissemination of tumor cells. ECs express B7h, which is the ligand of the ICOS T cell costimulatory molecule. The aim of this work was to assess the effect of B7h triggering by a soluble form of ICOS (ICOS-Fc) on the adhesion of colon carcinoma cell lines to HUVECs. We found that B7h triggering inhibited HUVEC adhesiveness to HT29 and DLD1 cells (by 50 and 35%, respectively) but not to HCT116 cells. The effect was dependent on the ICOS-Fc dose and was detectable as early as 30 min after treatment and was still present after 24 h. It was inhibited by soluble anti-ICOS reagents (mAb and B7h-Fc) and silencing of B7h on HUVECs, and it was not displayed by an F119S mutated form of ICOS-Fc that does not bind B7h. HUVEC treatment with ICOS-Fc did not modulate expression of adhesion molecules and cytokines, but it substantially downmodulated ERK phosphorylation induced by E-selectin triggering or osteopontin, which may influence HUVEC adhesiveness. Moreover, HUVEC treatment with ICOS-Fc also inhibited adhesion of polymorphonuclear cells and several tumor cell lines from different origins. Therefore, the B7h-ICOS interaction may modulate spreading of cancer metastases and recruitment of polymorphonuclear cells in inflammatory sites, which opens a view on the use of ICOS-Fc as an immunomodulatory drug. *The Journal of Immunology*, 2010, 185: 115–120.

Vascular endothelial cells (ECs) are key players in leukocyte recruitment into tissues, which is crucial for inflammatory and immune responses. This process is regulated by adhesion receptors and their ligands, whose expression and function are finely regulated in ECs and leukocytes, according to cell type, functional state, and anatomical location, and builds up a complex network of interactions that simultaneously involve several players (1). Key players are selectins with their mucin-like ligands and integrins whose ligands mostly belong to the Ig

superfamily. The same molecules are also involved in adhesion of metastatic cancer cells to ECs, which is a key event for their dissemination in systemic blood to form metastatic tumors (2–4).

The function of these adhesion receptors is mainly regulated by their expression, but some of them also modulate their intrinsic adhesiveness in response to activating stimuli. This is the case for leukocyte $\beta 2$ integrins that are constitutively expressed by leukocytes in a low-adhesiveness state but are switched to a high-adhesiveness state by appropriate stimuli, such as those delivered by chemokine receptors, through “inside-out” signaling.

ECs also express molecules that are involved in T cell activation and can act as semiprofessional APCs capable of activating T cells in some circumstances. These molecules include class I and II MHC molecules presenting antigenic peptides to T cells, as well as costimulatory molecules modulating T cell activation (e.g., CD40 and LFA-3) and several molecules belonging to the B7 family (i.e., B7h, B7-H1, and B7-DC) (5). The capacity of ECs to establish cognate interactions with T cells has been involved in activation of the memory adaptive immune response, graft rejection, and even recruitment of Ag-specific effector T cells in sites of infection.

A specular aspect of the functional interplay between ECs and T cells is that T cells can modulate EC function. This can be mediated by cytokines secreted by T cells, such as IFN- γ capable of activating ECs, as well as by contact-dependent interactions, such as those mediated by triggering of CD40 on ECs by CD40L on T cells, which enhances expression of adhesion molecules and chemokines in ECs (6).

B7h (alias B7H2, B7-RP1, ICOSL, and GL50) is expressed by cells of hematopoietic and nonhematopoietic origin, including APCs, epithelial cells, and fibroblasts (7). In ECs, it is expressed at low constitutive levels and is upregulated upon activation (8). It is

*Department of Anatomy, Pharmacology and Experimental Medicine and [†]Section of General Pathology, Department of Medicine and Experimental Oncology, University of Torino, Torino; [‡]Department of Medical Sciences, Interdisciplinary Research Center of Autoimmune Diseases, “A. Avogadro” University of Eastern Piedmont, Novara; [§]Department of Life Sciences, University of Trieste, Trieste, Italy; [¶]Department of Microbiology and Immunology, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan; and ^{||}Departamento de Medicina Celular y Molecular, Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain

Received for publication October 8, 2009. Accepted for publication August 5, 2010.

This work was supported by Associazione Italiana Ricerca sul Cancro (Milan), Compagnia di San Paolo (Torino), Fondazione Casa di Riposo di Torino, Alinari Project (Torino), Regione Piemonte (Ricerca Sanitaria Finalizzata and Piattaforme Innovative), Fondazione Italiana Sclerosi Multiple 2008/9/711 (Genoa), Fondazione Amici di Jean (Torino), and funds from the University of Torino.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Umberto Dianzani, Interdisciplinary Research Center of Autoimmune Diseases, Department of Medical Sciences, University “A. Avogadro” of Eastern Piedmont, Via Solaroli 17, 28100 Novara, Italy. E-mail address: dianzani@med.uniroma1.it

Abbreviations used in this paper: EC, endothelial cell; F119S-ICOS-Fc, extracellular portion of human ICOS carrying a phenylalanine to serine substitution at position 119; FGF, fibroblast growth factor; IP-10, IFN-inducible protein 10; MEI-R, mean fluorescence intensity ratio; PDGFbb, platelet-derived growth factor bb; PMN, polymorphonuclear cell; shRNA, short hairpin RNA; VEGF, vascular endothelial growth factor.

Copyright © 2010 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/10/\$16.00

www.jimmunol.org/cgi/doi/10.1093/jimmunol.190.1.115

the ligand of ICOS, which belongs to the CD28 family and is selectively expressed by activated T cells (9). ICOS function has been extensively investigated in T cells, where it delivers costimulatory signals capable of modulating cell activation and cytokine secretion. In mice, ICOS triggering has been predominantly related to induction of IL-4-secreting Th2 cells or IL-10-secreting regulatory T cells, but it can also induce IFN- γ -secreting Th1 cells in some circumstances (10–13). In humans, we reported that ICOS-mediated costimulation of naive Th cells elicited different responses depending on the cytokine milieu; it promoted predominantly IFN- γ secretion in the presence of IL-2 and IL-10 and TGF- β secretion in its absence (14).

B7h expressed by ECs was shown to be functionally active in T cell costimulation, and the aim of this work was to investigate the other side of the B7h-ICOS interaction (i.e., the effects of B7h triggering on EC adhesiveness). The results showed that B7h ligation by a soluble form of ICOS (ICOS-Fc) significantly inhibited the capacity of EC to adhere to several tumor cell lines and polymorphonuclear cells (PMNs), which use similar mechanisms to adhere to ECs. It did not modulate EC expression of adhesion molecules and cytokines, but it modulated signaling pathways in ECs because it inhibited ERK phosphorylation induced by E-selectin triggering or osteopontin, which modulates HUVEC adhesiveness. Therefore, the B7h-ICOS interaction may modulate spreading of cancer metastases and recruitment of PMNs in inflammatory sites, which opens a view on the use of ICOS-Fc as an immunomodulatory drug.

Materials and Methods

Materials

Dextran T500 was purchased from Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden). Bovine calf serum (endotoxin tested) was from Hyclone Laboratories (Logan, UT). Trypsin was from Difco Laboratories (Detroit, MI). Histopaque1077, fluorescein diacetate, M199 (endotoxin tested), α -PMLP, IL-1 β , TNF- α , phosphatase inhibitor mixture, protease inhibitor mixture, and ATP were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Anti-human CD62E was purchased from GenWay Biotech (San Diego, CA). Rabbit

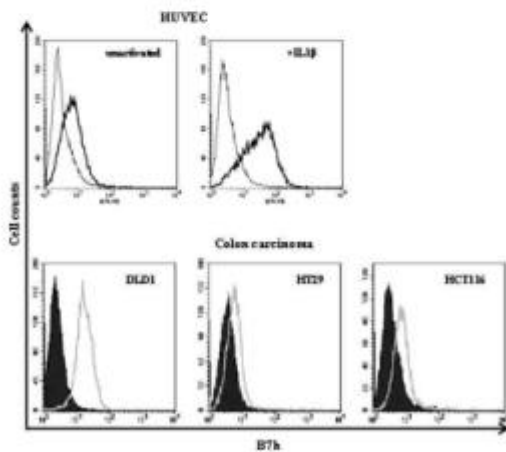


FIGURE 1. B7h expression in HUVECs and colon carcinoma cell lines. Expression was assessed by immunofluorescence using an anti-B7h mAb. HUVECs were analyzed in resting conditions and after a 24-h treatment with IL-1 β . The same results were obtained by staining cells with ICOS-Fc plus a secondary reagent (data not shown). HUVECs: thin line, control staining; bold line, B7h staining. Tumor cells: filled graph, control staining; white graph, B7h staining.

polyclonal anti-phospho-p38 or mouse monoclonal anti-phospho-ERK Abs were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). HRP-conjugated secondary Abs were from Bio-Rad (Hercules, CA).

The extracellular portion of human ICOS and its mutated form carrying a phenylalanine to serine substitution at position 119 (^{P119S}ICOS-Fc) were cloned as fusion proteins to the human IgG1 Fc region, generating ICOS-Fc fusion protein, according to Di Niro et al. (15). After transfection, CHO cells stably and highly expressing ICOS-Fc were established. The human ICOS-Fc fusion protein was harvested and purified from supernatant by protein A affinity column. Similar results were obtained with Recombinant Human ICOS-Fc Chimera (R&D Systems, Minneapolis, MN); the soluble IgG1 Fc (control-Fc), used as a control (R&D Systems) at a concentration of 1 μ g/ml (corresponding to the 2- μ g/ml dose of ICOS-Fc in terms of molarity). B7h-Fc, and recombinant osteopontin were from R&D Systems.

Cells

HUVECs were isolated from human umbilical veins by trypsin treatment (1%) and cultured in M199 medium, with the addition of 20% FCS, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 5 U/ml heparin, 12 μ g/ml bovine brain extract, and 200 mM glutamine. HUVECs were grown to confluence in flasks and used at passages two through five.

PMNs were prepared from citrated venous blood obtained from healthy volunteers at a local blood bank, using the standard techniques of dextran sedimentation, followed by Histopaque1077 gradient centrifugation. Residual erythrocytes were removed by hypotonic lysis, and PMNs were resuspended in M199 supplemented with 10% FCS. Purity of the final cell suspension and cell viability, assessed by the trypan blue exclusion test, was >95% in all cases. Cell viability was not affected by drug treatment.

Informed consent was obtained from all donors. The human tumor cell lines were grown in culture dishes as a monolayer in RPMI 1640 medium

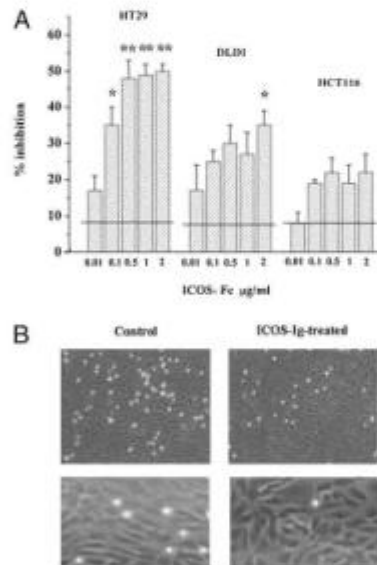


FIGURE 2. Effect of HUVEC treatment with ICOS-Fc on HT29, DLD1, and HCT116 cell line adhesion. **A**, HUVECs were pretreated or not with increasing concentrations of ICOS-Fc (0.01, 0.1, 0.5, 1, and 2 μ g/ml) for 30 min and then incubated with each tumor cell line for 1 h without washing out ICOS-Fc. Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 5$) of the percentage of inhibition versus control adhesion detected on HUVECs not treated with ICOS-Fc; control adhesion was 40 ± 4 cells/microscope fields. The horizontal lines show the mean \pm SEM of the adhesion inhibition obtained with 1 μ g/ml control Fc (not significant). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, versus control. **B**, Fluorescent microscopy of HT29 cells adherent to HUVECs that were treated (right panels) or not (left panels) with ICOS-Fc at low ($\times 100$, upper panels) and high ($\times 400$, lower panels) magnification.

plus 10% FCS, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin at 37°C in 5% CO₂-humidified atmosphere; they included HT29, DLD1, HCT116, Caco-2 (colon carcinoma), RPMI7932, JRS, M14, PCF2 (melanoma), HMC-1 (mastocytoma), PC3 (prostate carcinoma), and Hep-G2 (liver carcinoma).

Cell-surface phenotype was assessed by immunofluorescence and flow cytometry using the appropriate FITC- and PE-conjugated mAb to B7h (BioLegend, San Diego, CA), ICAM-1 (BioLegend), ICAM-2 (Diacrone Research, Manchester, U.K.), MadCAM (Abcam, Cambridge, MA), CD62P (Immunotools, Friesoythe, Germany), CD31 (Caltag Laboratories, Burlingame, CA), CD34 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA), CD44v (Bender Med-Systems, Vienna, Austria), and sialyl Lewis X (Santa Cruz Biotechnology). MAb to CD62E (Immunokontact, Abingdon, U.K.), sialyl Lewis A (Santa Cruz Biotechnology), and VCAM-1 (Caltag Laboratories) were detected with FITC-conjugated goat anti-mouse Ig (Caltag Laboratories); CD62E was also detected by direct immunofluorescence using FITC-conjugated anti-CD62E (R&D Systems) and Mouse IgG1 Isotype Control (R&D Systems). Anti-ICOS mAb (C398.4A) was purified by affinity chromatography on protein G-Sepharose 4 fast-flow columns (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) from the hybridoma supernatants; it was detected with FITC-conjugated goat anti-hamster Ig preabsorbed with mouse and rat Ig (Caltag Laboratories). C398.4A ICOS and B7h were also revealed with the Recombinant Human B7h-Fc Chimera (R&D Systems) and ICOS-Fc respectively; both of them were detected with FITC-conjugated mouse anti-human-IgG (BD Pharmingen, San Jose, CA). Antigenic density was expressed as mean fluorescence intensity ratio of total lymphocytes, using the following formula: mean fluorescence intensity of sample histogram (arbitrary units)/mean fluorescence intensity of control histogram (arbitrary units).

Cytokine secretion was assessed in the culture supernatants using a cytokine protein array (Bio-Plex, Bio-Rad) simultaneously measuring IL-1b, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, cotaxin, fibroblast growth factor (FGF) basic, IFN-γ, IFN-inducible protein 10 (IP-10), platelet-derived growth factor bb (PDGFbb), RANTES, TNF-α, vascular endothelial growth factor (VEGF), G-CSF, GM-CSF, MIP-1, MIP-1α, and MIP-1β.

Cells-adhesion assay

HUVECs were grown to confluence in 24-well plates, washed, and rested for 1 d in M199 plus 10% FCS. In the titration experiments, HUVECs were treated or not with increasing concentrations of ICOS-Fc (0.01–2 µg/ml) for 30 min and then incubated for 1 h with each tumor cell line (7×10^5 cell/well) (16) or PMNs (10^6 cells/well), prelabeled with fluorescein diacetate for 30 min; the 1-h incubation time was chosen to allow full sedimentation of the adhering cells, but similar results were obtained with shorter incubation times (10 and 20 min). After incubation, nonadherent cells were removed by washing three times with M199. The center of each well was analyzed by fluorescence image analysis (17). Adherent cells were counted

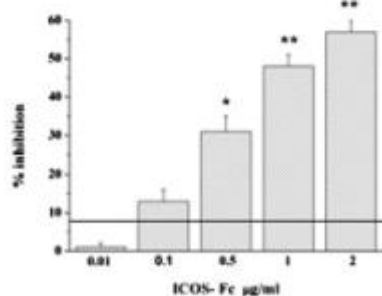


FIGURE 3. Effect of ICOS-Fc on adhesiveness of IL-1 β -pretreated HUVECs to HT29 cells. HUVECs were treated with 10 ng/ml IL-1 β for 24 h and then exposed or not to 0.01–2 µg/ml ICOS-Fc for an additional 30 min and incubated with HT29 for 1 h without washing out ICOS-Fc. Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 5$) of the percentage of inhibition versus adhesion detected on IL-1 β -treated HUVECs not treated with ICOS-Fc. Adhesion to control HUVECs was similar to that reported in Fig. 2, and IL-1 β treatment increased it by $142 \pm 5\%$; the horizontal line shows the mean \pm SEM of adhesion inhibition obtained with 1 µg/ml control-Fc (not significant). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, versus control.

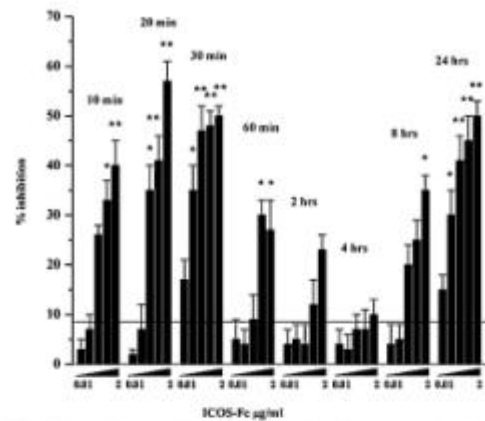


FIGURE 4. Effect of HUVEC incubation for different times with ICOS-Fc on adhesiveness to HT29 cells. HUVECs were pretreated or not with titrated amounts of ICOS-Fc (0.01, 0.1, 0.5, 1, or 2 µg/ml) for 10, 20, 30 and 60 min or 2, 4, 8, or 24 h without washing out ICOS-Fc and then incubated with HT29 cells for 1 h. Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 5$) of the percentage of inhibition versus the control adhesion that was always similar to that reported in Fig. 2; the horizontal line shows the mean \pm SEM of adhesion inhibition obtained with 1 µg/ml control Fc, which was similar at the different times (not significant). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, versus control.

using Image Pro Plus Software for microimaging (version 5.0; Media Cybernetics, Bethesda, MD). Single experimental points were assayed in triplicate, and the SEM of the three replicates was always $< 10\%$. Data are shown as percentage of inhibition versus the control adhesion measured on HUVECs not treated with ICOS-Fc; this control adhesion was 40 ± 4 cells/microscope field ($n = 17$) for HT29 cells and in a similar range for the other cell types.

In some experiments, HUVECs were pretreated with IL-1 β (10 ng/ml) for 24 h and then exposed or not to ICOS-Fc for an additional 30 min. In

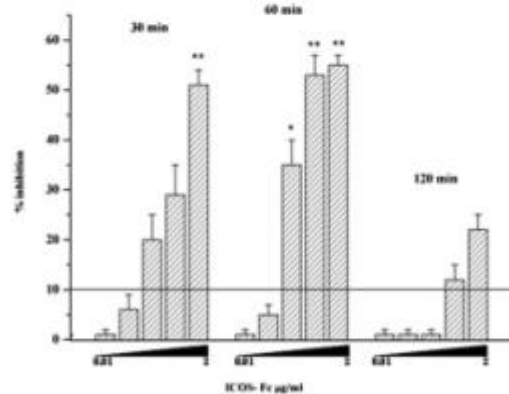


FIGURE 5. Effect of HT29 cell incubation for different times with ICOS-Fc on adhesion to HUVECs. HT29 cells were pretreated or not with titrated amounts of ICOS-Fc (0.01, 0.1, 0.5, 1, or 2 µg/ml) for 30, 60, or 120 min; washed; and incubated with HUVECs for 1 h. Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 5$) of the percentage of inhibition versus the control adhesion that was always similar to that reported in Fig. 2; the horizontal line shows the mean \pm SEM of adhesion inhibition obtained with 1 µg/ml control Fc, which was similar at the different times (not significant). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, versus control.

these experiments, only 10^5 PMNs/well were plated on HUVECs to avoid excessive adhesion of PMNs that could not be measured by the micro-imaging system.

B7h silencing

To silence B7h gene expression, lentiviral particles encoding three target-specific 19–25 nt (plus hairpin) short hairpin RNA (shRNA; sc-39699-V) were used, according to the manufacturer's instructions (Santa Cruz Biotechnology). Specificity of silencing was checked using cells treated with Polybrene only (control HUVECs) and cells transfected with shRNA lentiviral particles encoding a scrambled sequence (SCR shRNA sc-108080-V), unable to induce specific degradation of known cellular mRNA. Briefly, 5×10^4 HUVECs/well were seeded in 24-well plates in 1 ml M199 + 20% FBS and cultured overnight to 70–80% confluence. Then, 10^5 infectious units of virus, mixed with 5 μ g/ml Polybrene (sc-134220), were added to each well, and cells were cultured for an additional 72 h.

Silencing of B7h was assessed at the protein and RNA levels. B7h protein surface expression was evaluated by direct immunofluorescence with PE-conjugated anti-B7h mAb and flow cytometry. B7h RNA expression was evaluated by RT-PCR. Total RNA was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) and used (2.0 μ g) as a template; first-strand cDNA was synthesized using a Superscript RT PCR kit (Invitrogen) with the supplied oligonucleotide primer. One cycle of thermal cycling was performed at 37°C for 60 min, 94°C for 5 min, and 4°C for 5 min, and the cDNA was subjected to nested PCR by two independent rounds of PCR with the supplied primer mix (A and B, Santa Cruz Biotechnology; sc-39699-PR), according to the manufacturer's instructions. The GAPDH housekeeping gene was used as a control for cDNA normalization. The

products were subjected to electrophoresis on a 2% agarose gel, stained with ethidium bromide, and visualized by UV illumination.

Western blot analyses

HUVECs were treated with ICOS-Fc or control medium for 30 min at 37°C, washed with ice-cold medium, and incubated with control medium or paraformaldehyde-fixed HT29 cells (1×10^5 /well) or anti-CD62 mAb (45 μ g/ml) for 30 min on ice. HT29-stimulated HUVECs were incubated at 37°C for 2, 10, or 30 min, whereas anti-CD62E-stimulated HUVECs were washed and incubated with goat anti-mouse Ig (Dako, Glostrup, Denmark) for 10 min at 37°C. In some experiments, HUVECs were treated with osteopontin (5 μ g/ml) for 30 min or ATP (100 μ M) for 3 min. Then, cells were lysed with lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Nonidet, phosphatase, and protease-inhibitor cocktails. Cell lysates were separated on 10% SDS-PAGE gels and transferred on nitrocellulose filters. Filters were then blocked by incubation with TBS (10 mM Tris-HCl [pH 7.9] and 150 mM NaCl) containing 2% nonfat milk and 1% Tween 20 for 1 h at room temperature and probed overnight with anti-phospho-p38 rabbit polyclonal Abs or anti-phospho-ERK mouse mAbs, followed by the appropriate HRP-conjugated secondary reagent and detected by ECL. Densitometric analysis was performed using Multi-Analyst (version 1.1; Bio-Rad).

Statistical analysis

Data are shown as mean \pm SEM. Statistical analyses were performed with Prism 3.0 software (GraphPad Software, La Jolla, CA) using one-way ANOVA and the Dunnett test.

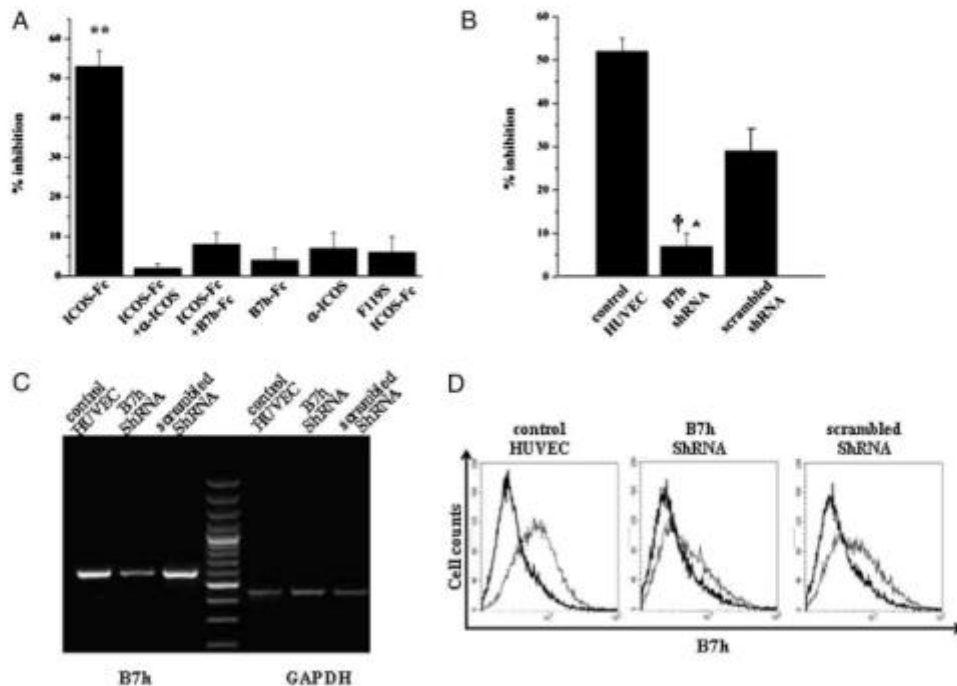


FIGURE 6. The effect of ICOS-Fc on HT29 adhesion to HUVECs is dependent on ICOS-B7h interaction. *A*, The ICOS-Fc effect is inhibited by anti-ICOS mAb and B7h-Fc. 71799 ICOS-Fc, which does not bind B7h, does not inhibit HT29 adhesion. HT29 cells were pretreated or not for 30 min with ICOS-Fc (1 μ g/ml), in the presence and absence of an anti-ICOS mAb (C398.4A; 5 μ g/ml) or B7h-Fc (2 μ g/ml), or with 71799 ICOS-Fc (1 μ g/ml) and then incubated for 1 h with HT29 cells without washing out these reagents. Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 6$) of the percentage of inhibition versus the control adhesion. ** $p < 0.01$, versus control. *B–D*, The ICOS-Fc effect is inhibited by silencing of B7h on HUVECs. HUVECs were incubated or not with B7h-shRNA or scrambled shRNA for 72 h, washed, and treated or not with ICOS-Fc (1 μ g/ml); thereafter, cells were washed and incubated for 1 h with HT29 cells. *B*, Results of the adhesion assay, expressed as mean \pm SEM ($n = 5$) of the percentage of inhibition induced by ICOS-Fc versus the respective basal adhesion. Basal adhesion was not affected by shRNA treatment. * $p < 0.05$, versus scrambled shRNA-treated HUVECs; † $p < 0.05$, versus untreated HUVECs. *C*, Expression of B7h mRNA (*left*), evaluated by RT-PCR, compared with GAPDH expression (*right*) for each HUVEC preparation. *D*, B7h surface expression evaluated by immunofluorescence.

Results

B7h triggering inhibits colon carcinoma cell line adhesion to HUVECs

We used the HT29, HCT116 (18), and DLD1 (19) colon carcinoma cell lines to assess whether B7h triggering modulates cancer cell adhesion to ECs.

Expression of B7h and ICOS was assessed on HUVECs and the colon carcinoma cell lines; HUVECs were analyzed at basal conditions and after 24 h of treatment with IL-1 β or TNF- α (both at 10 ng/ml). Expression was assessed by indirect immunofluorescence using the appropriate mAb or soluble forms of the respective ligands (i.e., B7h-Fc and ICOS-Fc). Results showed that HUVECs expressed substantial amounts of B7h, as reported by Khayyamian et al. (8), which were upregulated upon treatment with IL-1 β (Fig. 1) or TNF- α (data not shown); however, they did not express ICOS (data not shown). Similarly, all colon carcinoma lines expressed substantial amounts of B7h (Fig. 1) but no ICOS (data not shown).

To assess the effect of B7h triggering on tumor cell adhesion to ECs, HUVECs were treated or not with different concentrations of ICOS-Fc (0.01–2 μ g/ml) or control-Fc (1–2 μ g/ml) for 30 min and then used in the adhesion assay with each tumor cell line. Fig. 2A shows that treatment with ICOS-Fc significantly inhibited adhesion of HT29 and, to a lesser extent, DLD1 in a concentration-dependent manner, whereas it had no significant effect on HCT116. Maximal inhibitions were $50 \pm 2\%$ ($IC_{50} = 0.031 \mu$ g/ml) for HT29 and $35 \pm 4\%$ (reached at 2 μ g/ml of ICOS-Fc) for DLD1. Fig. 2B shows micrographs of the HT29 adhesion assays on untreated HUVECs (left panels) or those that were treated with 1 μ g/ml ICOS-Fc (right panels). HT29 cells adhering to control HUVECs lost their round shape and became enlarged by flattening on the HUVEC layer, whereas the fewer HT29 cells adhering to ICOS-treated HUVECs maintained their small, round shape. No effect was detected using control Fc.

To assess the effect of B7h triggering on activated HUVECs, we analyzed HT29 adhesion to HUVECs preactivated with IL-1 β for 24 h and then exposed or not to ICOS-Fc or control Fc for an additional 30 min. Activation with IL-1 β increased HT29 adhesion by $142 \pm 5\%$; 2 μ g/ml ICOS-Fc inhibited this adhesion by $57 \pm 3\%$, which was similar to, but with a higher IC_{50} , HUVECs not treated with IL-1 β ($IC_{50} = 0.29 \mu$ g/ml; Fig. 3). No effect was detected using control Fc.

To investigate the duration of the inhibitory effect, we performed the adhesion assay on HUVECs pretreated for different times with ICOS-Fc or control Fc using HT29 cells (Fig. 4). Results showed that adhesion inhibition was detectable after 10 min of pretreatment and reached its maximum after 30 min; it decreased after 1 h and was not significant after 2–4 h, but it increased again after 8 and 24 h. No effect was detected using control Fc.

The previous experiments were performed without washing ICOS-Fc from the adhesion assay. Because HUVECs and the tumor cell lines expressed B7h, we performed experiments to separately evaluate the ICOS-Fc effect on each of them.

Initially, to restrict the effect to HUVECs, they were pretreated or not with ICOS-Fc (1 μ g/ml) or control Fc (0.5 μ g/ml) for 30 min, washed or not with fresh medium twice, and then coincubated with HT29 cells in the adhesion assay. Results showed that ICOS-Fc inhibited HT29 adhesion to a similar extent in washed ($50 \pm 2\%$) and unwashed ($52 \pm 3\%$) HUVECs, which indicated that ICOS-Fc exerted a direct effect on them. No effect was detected with control Fc.

Second, to restrict the effect to HT29 cells, they were pretreated or not with ICOS-Fc or control Fc for 30, 60, or 120 min; washed

twice; and then seeded on untreated HUVECs in the adhesion assay. Results showed that ICOS-Fc inhibited adhesion, even with this protocol (Fig. 5). The effect was time dependent, with maximal effect ($55 \pm 2\%$) at 60 min and a subsequent decrease; the effective concentrations were in the 0.5–2 μ g/ml range. No effect was detected using control Fc.

Third, we evaluated the ICOS-Fc effect on HT29 adhesion to FCS-coated plastic wells (i.e., in a HUVEC-free cell-adhesion assay). HT29 cells were pretreated or not with ICOS-Fc (0.01–2 μ g/ml) for 30 min and used in an adhesion assay on FCS-coated plastic wells without washing out ICOS-Fc. Results showed that ICOS-Fc had no significant effect in this assay; adhesion inhi-

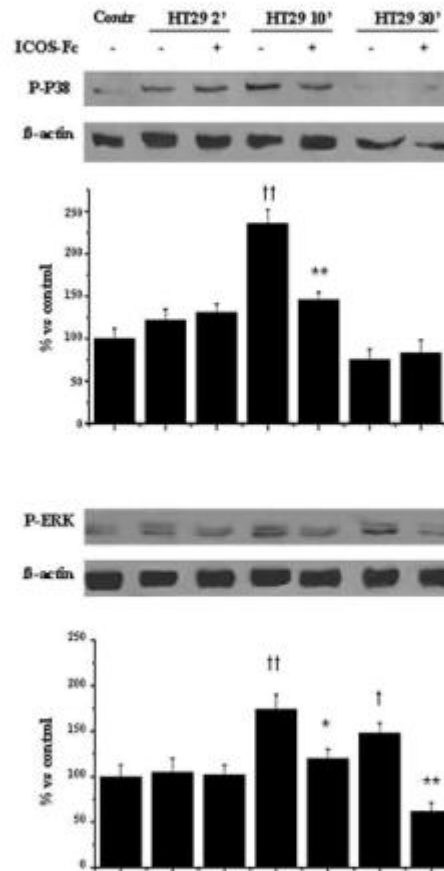


FIGURE 7. Effect of ICOS-Fc on p38 and ERK phosphorylation induced by interaction with HT29 cells. Resting HUVECs were treated or not with 2 μ g/ml ICOS-Fc for 30 min and then incubated with paraformaldehyde-fixed HT29 cells for 2, 10, or 30 min. Then, HUVECs were lysed, and p38 and ERK phosphorylation were analyzed by Western blot. The bar graphs show data (mean \pm SEM) normalized to β -actin, expressed as percentage inhibition versus the control, from four experiments; one representative gel is also shown. HUVEC treatment with HT29 cells induced phosphorylation of p38 after 10 min and ERK after 10 and 30 min; these were inhibited by HUVEC pretreatment with ICOS-Fc. $^{\dagger}p < 0.05$; $^{\ddagger}p < 0.01$, versus control HUVECs; $^*p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$, versus the corresponding cells not treated with ICOS-Fc.

hibition was $15 \pm 2\%$, $13 \pm 2\%$, $15 \pm 3\%$, and $10 \pm 4\%$ using 2, 1, 0.1, and 0.01 $\mu\text{g/ml}$ ICOS-Fc, respectively.

To assess specificity of the ICOS-Fc effect and its dependence on the interaction with B7h, we performed two sets of experiments.

First, we evaluated ICOS-Fc's effect on HT29 adhesion in the presence of reagents blocking its interaction with B7h on HUVECs and by a mutated form of ICOS-Fc (P1195 ICOS-Fc) incapable of binding B7h (20). HUVECs were treated for 30 min with ICOS-Fc (1 $\mu\text{g/ml}$) in the presence and absence of an anti-ICOS mAb (C398.4A; 5 $\mu\text{g/ml}$) or B7h Fc (2 $\mu\text{g/ml}$) or with P1195 ICOS-Fc (1 $\mu\text{g/ml}$) and then were incubated for 1 h with HT29 cells without washing out these reagents. Results showed that ICOS-Fc inhibited HT29 adhesion, whereas P1195 ICOS-Fc did not; moreover, B7h Fc and the anti-ICOS mAb substantially blocked the ICOS-Fc effect (Fig. 6A).

Second, we evaluated whether the effect of ICOS-Fc was affected by shRNA-mediated silencing of B7h. HUVECs were incubated or not with B7h-shRNA or scrambled shRNA for 72 h and used in the adhesion assay with HT29 cells in the presence and absence of ICOS-Fc (Fig. 6B); B7h expression was analyzed by RT-PCR (Fig. 6C) and surface immunofluorescence (Fig. 6D). RT-PCR showed that B7h mRNA was substantially downmodulated in B7h-shRNA-treated cells and not in scrambled shRNA-treated cells. Immunofluorescence showed that B7h surface expression was substantially downmodulated in B7h-shRNA-treated cells, and some downmodulation was also detected in scrambled shRNA-treated cells, which seemed to be an aspecific consequence of lentiviral infection. The adhesion experiment showed that ICOS-Fc-mediated inhibition of HT29 adhesion was significantly lower in B7h-shRNA-treated HUVECs ($6 \pm 3\%$)

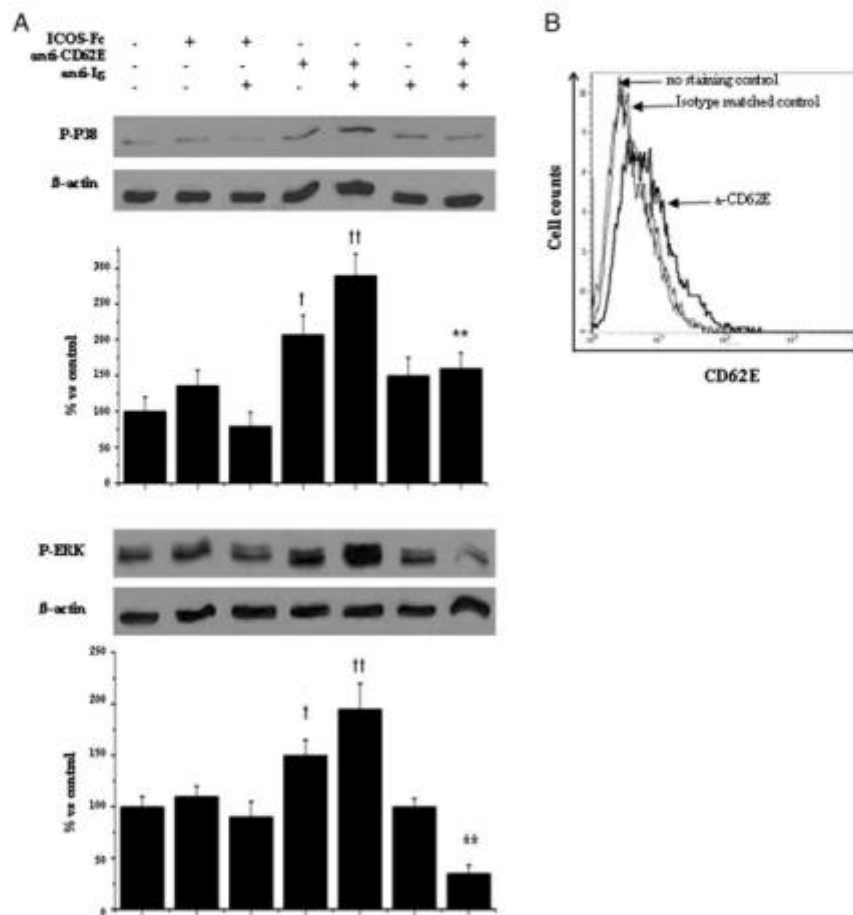


FIGURE 8. Effect of ICOS-Fc on p38 and ERK phosphorylation induced by E-selectin triggering. **A**, Resting HUVECs were treated or not with 2 $\mu\text{g/ml}$ ICOS-Fc for 30 min and then incubated with 45 $\mu\text{g/ml}$ anti-E-selectin mAb cross-linked or not with anti-mouse Ig Ab at 4°C; after 30 min, cells were incubated for another 10 min at 37°C. Then, the cells were lysed, and p38 and ERK phosphorylation were analyzed by Western blot. The bar graphs show data (mean \pm SEM) normalized to β -actin, expressed as the percentage of inhibition versus control, from four experiments; one representative gel is also shown. HUVEC treatment with anti-E-selectin mAb induces phosphorylation of p38 and ERK, which is increased by cross-linking with anti-mouse Ig Ab; this is inhibited by HUVEC pretreatment with ICOS-Fc. $^{\dagger}p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$, versus control HUVECs; $^{**}p < 0.01$, versus the corresponding cells not treated with ICOS-Fc. **B**, Surface expression of E-selectin by resting HUVECs assessed by direct immunofluorescence with anti-B7h mAb.

than in scrambled shRNA-treated ($30 \pm 7\%$) and untreated ($52 \pm 4\%$) HUVECs. In scrambled shRNA-treated HUVECs, ICOS-Fc-mediated inhibition was slightly lower than in untreated HUVECs, but the difference was not statistically significant.

B7h triggering alters ERK-mediated signaling in HUVECs

To investigate the mechanism of B7h-mediated inhibition of HUVEC adhesiveness, we compared expression of cytokines and adhesion molecules in unactivated and IL-1 β -activated HUVECs treated or not with ICOS-Fc.

Cytokine secretion was assessed in the culture supernatants using a cytokine protein array simultaneously measuring IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, eotaxin, FGF basic, IFN- γ , IP-10, PDGFbb, RANTES, TNF- α , VEGF, G-CSF, GM-CSF, MCP-1, MIP-1 α , and MIP-1 β . Results showed that resting HUVECs secreted IL-1ra, eotaxin, FGF basic, IFN- γ , IP-10, PDGFbb, and VEGF; IL-1 β -treated HUVECs upregulated IL-1ra, IL-4, IFN- γ , and IP-10 and, to a lesser extent, IL-9, eotaxin, FGF basic, PDGFbb, and VEGF, but treatment with ICOS-Fc for 24 h had no effect on these secretion patterns (data not shown).

Surface expression of ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, MadCAM, E-selectin (CD62E), CD62P, CD15s (sialyl Lewis X), sialyl Lewis A, CD31, CD34, CD40, and CD44v was assessed by immunofluorescence and flow cytometry. Results showed that unactivated HUVECs expressed CD31, ICAM-1, ICAM-2, CD62E, and B7h; IL-1 β -treated HUVECs upregulated B7h, CD62E, ICAM-1, and VCAM-1. Treatment with ICOS-Fc for 10, 20, or 30 min or 24 h had no effect on these expression patterns (data not shown).

An alternative possibility is that B7h modulated the intrinsic adhesiveness of adhesion molecules without affecting their expression level. The interaction of HT29 cells with HUVECs was shown to trigger a signaling pathway through p38 and ERK phosphorylation modulating EC function. To assess whether B7h engagement alters this signaling, HUVECs were treated or not with ICOS-Fc for 30 min and then incubated with paraformaldehyde-fixed HT29 cells (Fig. 7). After 30 min, cells were lysed, and p38 and ERK phosphorylation were analyzed by Western blot. Results showed that HT29 cells induced p38 and ERK phosphorylation in HUVECs; this effect was inhibited in cells pretreated with ICOS-Fc.

A key role in HT29 adhesion to HUVECs and subsequent signaling is played by E-selectin (21), which is expressed by activated but not resting HUVECs (22, 23). Our HUVECs expressed low levels of E-selectin (CD62E), even in unactivated conditions (Fig. 8), as also reported by other investigators (24, 25), which indicated that they were not fully rested. To assess whether B7h engagement alters signaling through E-selectin, HUVECs were treated or not with ICOS-Fc for 30 min and then incubated with anti-E-selectin mAb cross-linked or not with anti-mouse Ab (Fig. 8). After 30 min, cells were lysed, and p38 and ERK phosphorylation were analyzed by Western blot. Results showed that E-selectin triggering induced p38 and ERK phosphorylation in HUVECs, and this effect was strikingly inhibited in cells pretreated with ICOS-Fc.

In HUVECs, ERK phosphorylation can be induced by several stimuli in addition to E-selectin, such as osteopontin and ATP (26, 27). To assess generality of the B7h effect on ERK activation, we evaluated osteopontin- and ATP-induced ERK phosphorylation in HUVECs pretreated or not with ICOS-Fc. Results showed that osteopontin and ATP induced ERK phosphorylation in HUVECs, and pretreatment with ICOS-Fc inhibited phosphorylation induced by osteopontin but not that induced by ATP (Fig. 9).

B7h triggering inhibits adhesion of PMNs and several tumor cell lines to HUVECs

Because PMNs use similar mechanisms as tumor cells to adhere to ECs, we assessed whether B7h triggering also inhibits PMN adhesion to HUVECs.

Expression of B7h and ICOS was evaluated in resting PMNs and after their treatment with IL-1 β (10 ng/ml) for 1 h or FMLP (10^{-7} M) for 10 min by immunofluorescence staining with the respective mAb and soluble ligands. Results showed that PMNs did not express B7h or ICOS in any condition (data not shown).

To assess the effect of B7h triggering on PMN adhesion, HUVECs were treated or not with IL-1 β for 24 h and then exposed to ICOS-Fc for 30 min or 24 h before performing the adhesion assay with resting PMNs without washing out ICOS-Fc. The

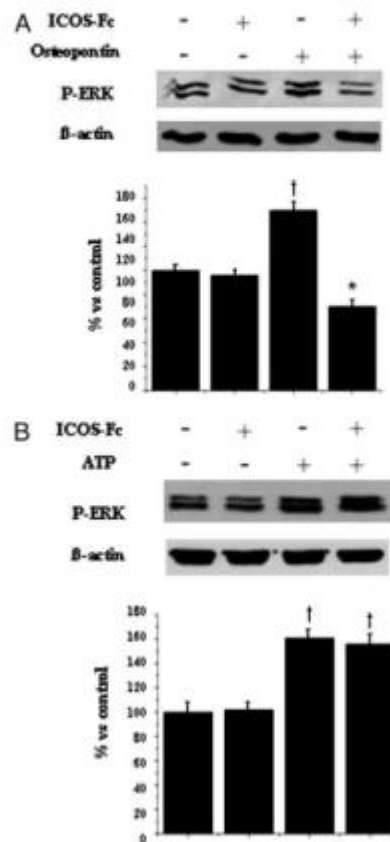


FIGURE 9. Effect of ICOS-Fc on ERK phosphorylation induced by osteopontin and ATP. Resting HUVECs were treated or not with 2 μ g/ml ICOS-Fc for 30 min and then incubated with 5 μ g/ml osteopontin for 30 min (A) or 100 μ M ATP for 3 min (B). Then, cells were lysed, and ERK phosphorylation were analyzed by Western blot. The bar graphs show data (mean \pm SEM) normalized to β -actin, expressed as the percentage inhibition versus the control, from four experiments; one representative gel is also shown. A, HUVEC treatment with osteopontin induces phosphorylation of ERK; this is inhibited by HUVEC pretreatment with ICOS-Fc. B, HUVEC treatment with ATP induces phosphorylation of ERK; this is not inhibited by HUVEC pretreatment with ICOS-Fc. * $p < 0.05$, versus control HUVEC; $\dagger p < 0.05$, versus cells treated with osteopontin only.

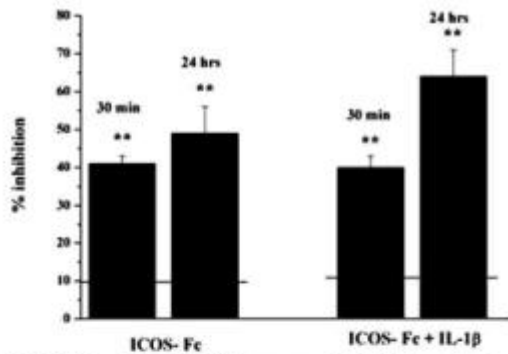


FIGURE 10. Effect of HUVEC treatment with ICOS-Fc on adhesiveness to PMNs. HUVECs were pretreated or not with IL-1 β for 24 h and then exposed to 0.5 μ g/ml ICOS-Fc for 30 min or 24 h before performing the adhesion assay for 10 min with resting PMNs, without washing out ICOS-Fc. Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 5$) of the percentage of inhibition versus the corresponding control adhesion, which was 42 ± 4 cells/microscope fields for HUVECs not treated with IL-1 β and 121 ± 19 cells/microscope fields for IL-1 β -treated HUVECs. The horizontal line shows the mean \pm SEM of adhesion inhibition obtained with 1 μ g/ml control Fc, which was similar at the different times (not significant). ** $p < 0.01$, versus control.

ICOS-Fc preparation used in these experiments was formed by the mouse IgG1 Fc γ portion to avoid interaction with Fc γ R expressed by PMNs. In resting HUVECs, treatment with 0.5 μ g/ml ICOS-Fc inhibited PMN adhesion by $42 \pm 2\%$ (30 min) and $50 \pm 5\%$ (24 h). Treatment with IL-1 β increased PMN adhesion to HUVECs by 288%, and ICOS-Fc still inhibited adhesion by $40 \pm 3\%$ (30 min) and $64 \pm 5\%$ (24 h) (Fig. 10).

Finally, we assessed generality of the ICOS-Fc effect on adhesion of tumor cell lines to HUVECs using the Caco-2 (colon carcinoma), RPMI7932, JR8, M14, PCF2 (melanoma), HMC-1 (mastocytoma), PC3 (prostate carcinoma), and Hep-G2 (liver carcinoma) cell lines. HUVECs were treated or not for 30 min with ICOS-Fc and then incubated with each cell line without washing out ICOS-Fc. Results showed that ICOS-Fc inhibited adhesion at high levels (>40%) in PC3, Hep-G2, and HMC-1 cells and at intermediate levels (30–40%) in JR8 and RPMI7932 cells; the effect was not significant (<25%) in M14, CaCo-2, and PCF2

cells. Table I summarizes data obtained with all tumor cell lines and shows their surface expression of B7h, CD62E, sialyl Lewis-A, and sialyl Lewis-X evaluated by flow cytometry. All cell lines expressed B7h; none expressed sialyl Lewis-X. All cell lines expressed sialyl Lewis-A and E-selectin were sensitive to ICOS-Fc (HT29, HMC-1, DLD1, and RPMI7932). The other cell lines that were sensitive to ICOS-Fc expressed E-selectin but not sialyl Lewis-A (PC3, Hep-G2, and JR8). Among the four cell lines insensitive to ICOS-Fc, two were from colon carcinoma and expressed E-selectin but not sialyl Lewis-A (HCT116 and CaCo-2); the other two were from melanoma and did not express E-selectin or sialyl Lewis-A (M14 and PCF2).

Discussion

This work showed that B7h expressed by HUVECs triggers signals inhibiting the capacity of ECs to support adhesion of cancer cells and PMNs, which suggests that it may modulate dissemination of cancer metastases and leukocyte recruitment into inflamed tissues *in vivo*.

The effect of B7h triggering was rapid; it was fully effective 30 min after exposure to ICOS-Fc but was already detectable after 10 and 20 min. The effect was dependent on ICOS binding to B7h, because it was not displayed by control-Fc or P3190 ICOS-Fc, which do not bind B7h (20), and it was inhibited by anti-ICOS mAb and B7h-Fc, as well as by silencing of B7h on HUVECs. Moreover, ICOS-Fc preparations bearing a human or a mouse Fc portion, which interact differently with human FcR, were similarly effective in inhibiting tumor cell adhesion to HUVECs (data not shown).

In the PMN experiments, ICOS-Fc necessarily exerted its inhibitory effect on HUVECs because PMNs did not express B7h and were not stained by ICOS-Fc. Moreover, no inhibition of adhesion was detected in experiments in which PMNs were incubated with ICOS-Fc before performing the adhesion assay (data not shown). By contrast, in the tumor cell experiments, ICOS-Fc might exert its effect on HUVECs and tumor cells because both expressed B7h. In line with this possibility, incubation of HUVECs or HT29 cells with ICOS-Fc before performing the adhesion assay induced similar inhibition of adhesion.

Because of the rapid kinetic of adhesion inhibition, it is unlikely that the effect was due to modulation of transcription of genes coding for adhesion molecules or cytokines. Moreover, we did not detect any effect on expression of cytokines and adhesion molecules by HUVECs in the time range between 10 min and 24 h after treatment with ICOS-Fc. Similarly, ICOS-Fc did not modify

Table I. Effect of ICOS-Fc on adhesion of several tumor cell lines to HUVECs

Cell Line	Tumor Type	Surface Expression ^a				Adhesion Inhibition by ICOS-Fc ^b
		B7h	CD62E	Sialyl Lewis A	Sialyl Lewis X	
HT29	Colon	+	++	++	-	++
HMC-1	Mast cell	+	+	+	-	++
PC3	Prostate	++	+	-	-	++
Hep-G2	Liver	++	+	-	-	++
DLD1	Colon	++	++	+	-	+
RPMI7932	Melanoma	+	+	+	-	+
JR8	Melanoma	+	+	-	-	+
HCT116	Colon	+	++	-	-	-
CaCo-2	Colon	++	++	-	-	-
M14	Melanoma	+	-	-	-	-
PCF2	Melanoma	+	-	-	-	-

^a -, MFI-R < 1.5; +, MFI-R = 1.5–10; ++, MFI-R > 10.

^b -, <25% inhibition; +, 30–40% inhibition; ++, >40% inhibition. MFI-R, mean fluorescence intensity ratio.

expression of E-selectin, P-selectin, MadCAM, ICAM-1, ICAM-2, sialyl Lewis-A, and sialyl Lewis-X in HT29 cells (data not shown).

An alternative possibility was that B7h triggering modulated function of some adhesion molecules without affecting their expression. Initially, we focused on E-selectin because of reports indicating its pivotal role in adhesion of our colon carcinoma cell lines to HUVECs (21). E-selectin binds sialyl Lewis-X and, with lower efficiency, sialyl Lewis-A fucosylated carbohydrates borne by several ligands expressed at the cell surface. E-selectin and its ligands can be expressed by leukocytes, ECs, and tumor cells, and their reciprocal interaction plays a key role in leukocyte homing and migration into tissues, as well as in tissue dissemination of tumor metastasis. Recruitment of circulating leukocytes and cancer cells into tissues is a multistep process subsequently involving cell rolling on the EC surface, mediated by selectins; activation of integrins from a low- to a high-adhesive conformation, mediated by chemokines; cell arrest, mediated by integrins; and extravasation, mediated by integrins and other molecules, such as CD31, JAM-A, and CD44. However, this underestimates the complexity of the process, because several adhesion molecules play roles in the multiple steps. Moreover, cell adhesiveness may be modulated by controlling the expression levels of different adhesion molecules and, for some of them, their conformational state, as well as their spatial distribution in specialized membrane structures, which may compartmentalize different adhesion molecules to specific regions of the plasma membrane and favor their cooperation with other receptors and signaling molecules. These structures include microdomains organized by lipid rafts or by tetraspanins, which recruit or exclude different surface receptors according to the cell functional state. This topographic organization requires a finely regulated cellular cytoskeleton that also enables the recruitment of signaling intermediates and secondary messengers that lead to cell activation (28, 29).

E-selectin may play a role in this spatial organization because its triggering in ECs induces a signal causing its phosphorylation and recruitment into lipid rafts at the cell surface, as well as activation of the ERK and p38 axis, leading to cytoskeleton modifications with disruption of the VE-cadherin/ β -catenin complex and formation of stress fibers; this increases endothelial permeability and enables transendothelial migration of cancer cells (21, 30–34). Our finding that E-selectin signaling through ERK and p38 was inhibited by pretreating HUVECs with ICOS-Fc suggests that interference with this signaling pathway may be a mechanism of the antiadhesive effect of B7h triggering. Preliminary experiments suggest that this effect is mediated by B7h signaling and not steric interference, because a monovalent form of ICOS-Fc displays substantially lower inhibitory activity than the divalent form (data not shown).

The possibility that B7h triggering targeted the E-selectin function was supported by the evidence that sensitivity to ICOS-Fc correlated with expression of sialyl Lewis-A in the colon carcinoma cell lines and with expression of E-selectin in the melanoma cell lines. However, this was not a general effect because HCT116 and Caco-2 expressed E-selectin but were not sensitive to ICOS-Fc. Therefore, the effect on E-selectin signaling is unlikely to be the only mechanism of B7h-mediated inhibition of adhesion; other receptors may be involved. Because the MAPK pathway is involved in the signaling of several receptors (adhesion and cytokine receptors), B7h triggering might theoretically influence multiple intracellular pathways. This possibility is supported by our observation that ICOS-Fc also inhibited ERK phosphorylation induced by osteopontin, a glycoprotein displaying adhesive and cytokine functions. Osteopontin interacts with a variety of cell-surface receptors, including several integrins and CD44. Binding

of osteopontin to these cell-surface receptors stimulates cell adhesion/migration and triggers several signaling pathways, including the ERK pathway (26). By contrast, B7h triggering did not inhibit ERK phosphorylation induced by ATP, known to interact with PY2 receptors (27), which suggests that B7h preferentially modulates signaling through adhesion molecules. Intriguingly, osteopontin is produced by several cell types, including cancer cells, and it is involved in metastasis dissemination.

The kinetics of the ICOS-Fc-mediated inhibition of adhesion, which lost its effect after 1–4 h but regained it after 8 and 24 h might be caused by receptor desensitization; other investigators showed that ICOS binding induced rapid shedding of B7h from the surface of B cells (35), but we did not detect this down-modulation in our HUVECs (data not shown).

Most research on ICOS function has investigated its capacity to transduce signals modulating T cell function, whereas this work shows that a signaling role may also be played by the B7h side of the ICOS–B7h interaction. A similar bidirectional effect was shown for CD28 on T cells interacting with B7.1 and B7.2 on APCs, which are the prototypic molecules of the CD28 and B7 families. CD28 is well known to deliver key costimulatory signals for T cell activation, but B7.1 and B7.2 were also shown to transduce reverse signals modulating APC function. Our finding that B7h also may modulate signaling in ECs introduces the possibility that it may play a large role in the immune and inflammatory response, because it is expressed by several immune and nonimmune cell types.

The capacity of B7h to inhibit HUVEC adhesiveness depicts a scenario for ICOS function because it suggests that, during their extravasation into inflamed tissues, ICOS⁺ T cells may substantially modulate EC adhesiveness upon triggering of B7h. For instance, by inhibiting PMN adhesion, this interaction may play a role in the switch from an acute-type inflammation driven by PMNs and macrophages to a chronic-type inflammation driven by lymphocytes and macrophages. Moreover, because regulatory T cells express high levels of ICOS, their interaction with B7h on ECs may play a role in the anti-inflammatory activity of these cells *in vivo*.

ICOS-Fc has been used as an immunomodulatory drug in several pathologic conditions in mice with heterogeneous results. It exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis in the priming phase but inhibits it in the efferent phase, and it attenuates experimental autoimmune myocarditis. Moreover, it increases allograft survival or accelerates rejection in different experimental settings. These effects have generally been ascribed to blockade of ICOS–B7h interaction; however, the present study suggests that they may be due, in part, to ICOS-Fc-mediated stimulation of B7h on ECs, which may modulate leukocyte recruitment and inflammation. Moreover, the effect of ICOS-Fc on EC adhesiveness might inhibit tissue dissemination of tumor metastases. However, before proposing therapeutic uses of ICOS-Fc, more work is needed to explore the global effect of B7h triggering on extravasation of different leukocyte populations, angiogenesis, and on the multiple cell types expressing B7h in tissues, including immune cells (e.g., APCs and mast cells) and nonimmune cells (e.g., epithelial cells and fibroblasts).

Acknowledgments

We thank the Pathology Unit and the Obstetrics and Gynecology Unit, Martini Hospital, Torino, for providing human umbilical cords.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Ley, K., C. Laudensma, M. I. Cybulska, and S. Nourbakhsh. 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 678–689.
- Lafrenie, J., F. Houle, M. M. Tiber, K. Valerie, and J. Huet. 2001. Trans-endothelial migration of colon carcinoma cells requires expression of E-selectin by endothelial cells and activation of stress-activated protein kinase-2 (SAPK2/p38) in the tumor cells. *J. Biol. Chem.* 276: 33762–33772.
- Lafrenie, J., F. Houle, and J. Huet. 2004. Adhesion of HT-29 colon carcinoma cells to endothelial cells requires sequential events involving E-selectin and integrin beta1. *Clin. Exp. Metastasis* 21: 257–264.
- Zeisig, R., R. Stahn, K. Wezell, D. Behrens, and I. Fichtner. 2004. Effect of sialyl Lewis X-glycoliposomes on the inhibition of E-selectin-mediated tumor cell adhesion in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* 1660: 31–40.
- Izumi, B. A., X. Frigola, H. Dong, and E. D. Kwon. 2007. Costimulation, inhibition and cancer. *Curr. Cancer Drug Targets* 7: 15–30.
- Rushworth, S. A., C. A. Bravery, and S. Thompson. 2001. Hmox CD154 induces activation of porcine endothelial cells and up-regulation of MHC class II expression. *Transplantation* 72: 127–132.
- Swallow, M. M., J. J. Wallin, and W. C. Sha. 1999. B7.1, a novel costimulatory homolog of B7.1 and B7.2, is induced by TNFalpha. *Immunol.* 11: 423–432.
- Khayyatman, S., A. Hultoff, K. Büchner, M. Grife, V. Hehn, R. A. Koczak, and H. W. Mages. 2002. ICOS-ligand, expressed on human endothelial cells, costimulates Th1 and Th2 cytokine secretion by memory CD4+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 6198–6203.
- Hultoff, A., A. M. Dietrich, K. C. Heier, B. Eljachevitch, R. Kraft, I. Anagnostopoulou, and R. A. Koczak. 1999. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397: 263–266.
- Nurievs, R. I. 2005. Regulation of immune and autoimmune responses by ICOS-B7 interaction. *Clin. Immunol.* 115: 19–25.
- Dong, C., A. E. Juedes, U. A. Temam, S. Shevitz, J. P. Allison, N. H. Rudille, and R. A. Flavell. 2001. ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature* 409: 97–101.
- Tafai, A., A. Shahinian, F. Bladt, S. K. Yoshinaga, M. Jordani, A. Wakeham, L. M. Boucher, D. Houchard, V. S. Chan, G. Duncea, et al. 2001. ICOS is essential for effective T-helper-cell responses. *Nature* 409: 101–109.
- McAdam, A. J., R. J. Greenwald, M. A. Levin, T. Chizzovna, N. Malenkovich, V. Ling, G. J. Freeman, and A. H. Sharpe. 2001. ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching. *Nature* 409: 102–105.
- Mesurini, R., S. Nicola, A. Chiochetti, I. S. Bernadone, L. Castell, T. Bersi, M. Ferruti, C. Comi, C. Dong, J. M. Rojo, et al. 2006. ICOS cooperates with CD28, IL-2, and IFN-gamma and modulates activation of human naive CD4+ T cells. *Eur. J. Immunol.* 36: 2601–2612.
- Di Niro, R., F. Ziller, F. Florian, S. Covella, M. Stetel, M. Bestagno, O. Barone, A. R. Bradbury, P. Secco, R. Mantari, and D. Sblattero. 2007. Construction of miniantibodies for the in vivo study of human autoimmune diseases in animal models. *BMC Biotechnol.* 7: 46.
- Danzoni, C., L. Brunetti, M. Gallicchio, A. C. Rosa, M. Collino, and R. Fanzoni. 2006. Colecalciferol modulates adhesion of HT29 colon cancer cells to vascular endothelial cells by inhibiting ICAM-1 and VCAM-1 expression. *Br. J. Pharmacol.* 153: 1153–1161.
- Danzoni, C., M. Collino, G. Lombardi, G. Garbino, and R. Fanzoni. 2003. Substance P increases neutrophil adhesion to human umbilical vein endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* 139: 1103–1110.
- Burbridge, M. F., V. Venot, P. J. Chaux, F. Perros-Sierra, J. A. Hickman, and G. C. Tucker. 2003. Decrease in survival threshold of quiescent colon carcinoma cells in the presence of a small molecule integrin antagonist. *Mol. Pharmacol.* 63: 1281–1288.
- Dexter, D. L., J. A. Barbosa, and P. Calabresi. 1979. N,N-dimethylformamide-induced alteration of cell culture characteristics and loss of tumorigenicity in cultured human colon carcinoma cells. *Cancer Res.* 39: 1020–1025.
- Wang, S., G. Zhu, K. Tamada, L. Chen, and J. Bajorath. 2002. Ligand binding sites of inducible costimulator and high avidity mutants with improved function. *J. Exp. Med.* 195: 1033–1041.
- Tremblay, P. L., F. A. Anger, and J. Huet. 2006. Regulation of transendothelial migration of colon cancer cells by E-selectin-mediated activation of p38 and ERK MAP kinases. *Oncogene* 25: 6563–6573.
- Bevilacqua, M. P., J. S. Pober, D. L. Mendrick, R. S. Cotran, and M. A. Gimbrone, Jr. 1987. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 9238–9242.
- Wheeler, J., P. Ghersi, R. Hoosh van Huijsduijnen, J. Gray, G. Chandra, F. Tabbot, and J. P. DeLamater. 1991. An NF kappa B-like factor is essential but not sufficient for cytokine induction of endothelial leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) gene transcription. *Nucleic Acids Res.* 19: 2645–2653.
- Rodriguez, E., J. Guevara, A. Perez, E. Zapata, M. T. Collados, T. I. Fontoul, R. Lopez-Marve, F. Maso, and L. F. Montano. 2008. The altered expression of inflammation-related molecules and secretion of IL-6 and IL-8 by HUVEC from newborns with maternal inactive systemic lupus erythematosus is modified by estrogens. *Lupus* 17: 1086–1095.
- Cheng, Q., S. J. McKeown, L. Sinton, F. S. Santiago, L. M. Khachigian, E. E. Morand, and M. J. Hickley. 2010. Macrophage migration inhibitory factor increases leukocyte-endothelial interactions in human endothelial cells via promotion of expression of adhesion molecules. *J. Immunol.* 185: 1236–1247.
- Dai, J., L. Peng, K. Fan, H. Wang, R. Wei, O. Ji, J. Cai, B. Lu, B. Li, D. Zhang, et al. 2009. Osteopontin induces angiogenesis through activation of PI3K/AKT and ERK1/2 in endothelial cells. *Oncogene* 28: 3412–3422.
- Martel, M., E. P. de la Blanca, and E. Jiménez. 2006. P2Y receptors activate MAPK/ERK through a pathway involving PDK/PDK1/PKC-beta in human vein endothelial cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 18: 123–134.
- Banero, O., H. de la Fuente, M. Matellera, and F. Sánchez-Madrid. 2007. Functional insights on the polarized redistribution of leukocyte integrins and their ligands during leukocyte migration and immune interactions. *Immunol. Rev.* 218: 147–164.
- Banero, O., M. Yáñez-Mó, M. Sala-Valdés, M. D. Gutiérrez-López, S. Ovalle, A. Higginbottom, P. N. Mink, C. Cabetas, and F. Sánchez-Madrid. 2005. Endothelial tetraspanin microdomains regulate leukocyte firm adhesion during extravasation. *Bioessays* 27: 2852–2861.
- Ha, Y., J. M. Koeb, B. E. Sarnet, A. Rosenzweig, and M. A. Gimbrone, Jr. 2000. E-selectin-dependent signaling via the mitogen-activated protein kinase pathway in vascular endothelial cells. *J. Immunol.* 165: 2142–2148.
- Gott, S., P. L. Tremblay, and J. Huet. 2008. Selectins and selectin ligands in extravasation of cancer cells and organ selectivity of metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* 25: 335–344.
- Koeb, J. M., Y. Ha, G. Garcia-Cardena, and M. A. Gimbrone, Jr. 2003. Lipid raft localization of cell surface E-selectin is required for ligand-induced activation of phospholipase C gamma. *J. Immunol.* 171: 3216–3224.
- McEver, R. P. 1997. Selectin-carbohydrate interactions during inflammation and metastasis. *Glycobiology* 7: 585–591.
- Blažekberg, S., S. Barboux, and L. Tart. 2003. Adhesion molecules and antibodies. *Advances* 170: 191–203.
- Loge, E. C., S. Balkour, M. M. Murphy, H. Nalla, and W. C. Sha. 2006. ICOS-induced B7b shedding on B cells is inhibited by TLR7/8 and TLR9. *J. Immunol.* 177: 2356–2364.

2.4 BIBLIOGRAFIA

1. Luster AD, Alon R, von Andrian UH. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol* 2005;6:1182–90.
2. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 2007;7:678–89.
3. Rao RM, Yang L, Garcia-Cardena G, Luscinskas FW. Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte recruitment to the vascular wall. *Circ Res* 2007;101:234–47.
4. Vestweber D. Selectins: cell surface lectins which mediate the binding of leukocytes to endothelial cells. *Semin Cell Biol* 1992;3:211–20.
5. Varki A. Selectin ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:7390–7.
6. Gahmberg CG, Valmu L, Fagerholm S, Kotovuori P, Ihanus E, Tian L, Pessa-Morikawa T. Leukocyte integrins and inflammation. *Cell Mol Life Sci* 1998;54:549–55.
7. Kim M, Carman CV, Yang W, Salas A, Springer TA. The primacy of affinity over clustering in regulation of adhesiveness of the integrin α L β 2. *J Cell Biol* 2004;167:1241–53.
8. Springer TA. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol* 1995;57:827–72.
9. McEver RP. Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow. *Curr Opin Cell Biol* 2002;14:581–6. Salas A, Shimaoka M, Kogan AN, Harwood C, von Andrian UH, Springer TA. Rolling adhesion through an extended conformation of integrin α L β 2 and relation to α I and β I-like domain interaction. *Immunity* 2004;20:393–406.
10. McEver RP, Cummings RD. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J Clin Invest* 1997;100:S97–103.
11. Kobayashi Y. Neutrophil infiltration and chemokines. *Crit Rev Immunol* 2006;26:307–16.
12. Salas A, Shimaoka M, Kogan AN, Harwood C, von Andrian UH, Springer TA. Rolling adhesion through an extended conformation of integrin α L β 2 and relation to α I and β I-like domain interaction. *Immunity* 2004;20:393–406.
13. Fidler, I. J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nature Reviews Cancer*, 3(6), 453–458.
14. Pantel, K., & Brakenhoff, R. H. (2004). Dissecting the metastatic cascade. *Nature Reviews Cancer*, 4(6), 448–456.

15. Kaplan, R. N., Rafii, S., & Lyden, D. (2006). Preparing the “soil”:the premetastatic niche. *Cancer Report*, 66(23), 11089–11093.
16. Zetter BR (1993) Adhesion molecules in tumor metastasis. *Semin Cancer Biol* 4:219–229.
17. Honn, K. V., Tang, D. G., & Crissman, J. D. (1992). Platelets and cancer metastasis: a causal relationship. *Cancer and Metastasis Reviews*, 11(3–4), 325–351.
18. Vestweber, D. (1993). The selectins and their ligands. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 184,65–75.
19. Varki, A. (1992). Selectins and other mammalian sialic acidbinding lectins. *Current Opinion in Cell Biology*, 4(2), 257–266.
20. Sperandio, M. (2006). Selectins and glycosyltransferases in leukocyte rolling in vivo. *FEBS Journal*, 273(19), 4377–4389.
21. Magnani, J. L. (2004). The discovery, biology, and drug development of sialyl Lea and sialyl Lex. *Archives Biochemistry and Biophysics*, 426(2), 122–131.
22. Laferriere, J., Houle, F., Taher, M. M., Valerie, K., & Huot, J. (2001). Transendothelial migration of colon carcinoma cells requires expression of E-selectin by endothelial cells and activation of stress-activated protein kinase-2 (SAPK2/p38) in the tumor cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276(36), 33762–33772.
23. Reyes-Reyes, M. E., George, M. D., Roberts, J. D., &Akiyama, S. K. (2006). P-selectin activates integrin-mediated colon carcinoma cell adhesion to fibronectin. *Experimental Cell Research*, 312(20), 4056– 4069.
24. Janeway CA jr, and Golstein, P. Lymphocyte activation and effector functions. 1993. *Curr. Opin. Immunol.* 5:313-23.
25. Janeway CA jr , and Bottomly, K. Signals and signs for lymphocyte response. 1994. *Cell.* 76:275-85.
26. Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. 2002. *Nat. Rev. Immunol.* 2:116-26.
27. Rudd CE, Schneider H. Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 coreceptor signalling. 2003. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 544-56.
28. Stamper, C.C., Y. Zhang, J.F. Tobin, D.V. Erbe, S. Ikemizu, S.J. Davis, M.L. Stahl, J. Seehra, W.S. Somers, Crystal structure of the B7-1/CTLA-4 complex that inhibits human immune responses. 2001. *Nature* 410: 608-611.

29. Wang S., G. Zhu, K. Tamada, L. Chen, J. Bajorath. Ligand binding sites of inducible costimulator and high avidity mutants with improved function. 2002. *J. Exp. Med.* 195: 1033-1041.
30. Redoglia V, Dianzani U, Rojo JM, Portoles P, Bragardo M, Wolff H, Buonfiglio, D, Bonissoni S, and Janeway CA jr. Characterization of H4: a murine T lymphocyte activation molecule functionally associated with the CD3/TCR. 1996. *Eur J Immunol.* 26: 2781-89.
31. Buonfiglio D, Bragardo M, Bonissoni S, Redoglia V, Cauda R, Zupo S, Burgio VL, Wolff H, Franssila K, Gaidano G, Carbone A, Janeway CA jr, and Dianzani U. Characterization of a novel human surface molecule selectively expressed by mature thymocytes, activated T cells and subsets of T cell lymphomas. 1999. *Eur J Immunol.* 29:2863-74.
32. Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, and Kroczeck RA. ICOS is an inducible T-cell co-stimulatory structurally and functionally related to CD28. 1999. *Nature.* 397:263-66.
33. Buonfiglio D, Bragardo M, Redoglia V, Vaschetto R, Bottarel F, Bonissoni S, Bensi T, Mezzatesta C, Janeway CA jr, and Dianzani U. The T cell activation molecule H4 and the CD28-like molecule ICOS are identical. 2000. *Eur. J. Immunol.* 30: 3463-3467.
34. Parry RV, Rumbley CA, Vandenberghe LH, June CH, Riley JL. CD28 and inducible costimulatory protein Src homology 2 binding domains show distinct regulation of phosphatidylinositol 3-kinase, Bcl-xL, and IL-2 expression in primary human CD4 T lymphocytes. 2003. *J. Immunol.* 171:166-74.
35. Ling V, Wu PW, Finnerty HF, Bean KM, Spaulding V, et al. Cutting edge: identification of GL50, a novel B7-like protein that functionally binds to ICOS receptor. 2000. *J. Immunol.* 164:1653-57.
36. Yoshinaga SK, Whoriskey JS, Khare SD, Sarmiento U, Guo J, et al. T-cell costimulation through B7RP-1 and ICOS. 1999. *Nature.* 402:827-32.
37. Wang SD, Zhu GF, Chapoval AI, Dong H, Tamada K, et al. Costimulation of T cells by B7-H2, a B7-like molecule that binds ICOS. 2000. *Blood.* 96:2808-13.
38. Aicher A, Hayden-Ledbetter M, Brady WA, Pezzutto A, Richter G, et al. Characterization of human inducible costimulator ligand expression and function. 2000. *J. Immunol.* 164:4689-96.
39. Coyle, A. J., Lehar S., Lloyd C., Tian J., Delaney T., et al. The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell dependent immune responses. 2000. *Immunity.* 13:95-105.

40. McAdam, A. J., R. J. Greenwald, M. A. Levin, T. Chernova, N. Malenkovich, V. Ling, G. J. Freeman, and A. H. Sharpe. ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching. 2001. *Nature* 409:102-105.
41. Tafuri, A., A. Shahinian, F. Bladt, S. K. Yoshinaga, M. Jordana, et al. ICOS is essential for effective T-helper-cell responses. 2001. *Nature* 409:105-109.
42. Grimbacher B, Hutloff A, Schlesier M, Glocker E, Warnatz K, et al. Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. 2003. *Nat. Immunol.* 4:261-68.
43. Yagi, J., Y. Arimura, U. Dianzani, T. Uede, T. Okamoto, and T. Uchiyama. Regulatory roles of IL-2 and IL-4 in H4/inducible costimulator expression on activated CD4⁺ T cells during Th cell development. 2003. *J. Immunol.* 171:783-794.
44. Nurieva, R. I., J. Duong, H. Kishikawa, U. Dianzani, J. M. Rojo, I. C. Ho, R. A. Flavell, and C. Dong. Transcriptional regulation of Th2 differentiation by inducible costimulator. 2003. *Immunity* 18:801-873.
45. Feito, M. J., R. Vaschetto, G. Criado, A. Sanchez, A. Chiochetti, A. Jimenez-Perianez, U. Dianzani, P. Portoles, and J. M. Rojo. Mechanisms of ICOS costimulation: effects on proximal TCR signals and MAP kinase pathway. 2003. *Eur. J. Immunol.* 33:204-214.
46. Mesturini, R, Nicola, S, Chiochetti, A, Bernardone, IS, Castelli, L, Bensi, T, et al. ICOS cooperates with CD28, IL-2, and IFN-gamma and modulates activation of human naïve CD4⁺ T cells. *Eur. J. Immunol.* 2006;36, 2601–12.
47. Choi J, Enis DR, Koh KP, Shiao SL, Pober JS. T lymphocyte-endothelial cell interactions. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:683-709.
48. Rushworth, S.A., C.A. Bravery, and S. Thompson. 2001. Human CD154 induces activation of porcine endothelial cells and up-regulation of MHC class II expression. *Transplantation.* 72:127-132.

3. L'ENDOCANNABINOIDE 2-ARACHIDONOILGLICEROLO ATTIVA PIASTRINE UMANE ATTRAVERSO RECETTORI DI TIPO NON-CB1/CB2

3.1 INTRODUZIONE

Gli endocannabinoidi (EC) sono una nuova classe di mediatori lipidici endogeni che mimano alcuni degli effetti psicotropici, ipnotici ed analgesici dei cannabinoidi, i costituenti naturali della *Cannabis sativa*. I cannabinoidi endogeni comprendono ammidi, esteri ed eteri di acidi grassi poliinsaturi a lunga catena derivanti dall'acido arachidonico.

I maggiori esponenti di questa classe di molecole sono l'arachidonoiletanolammide (anandamide o AEA) [1], ammido tra acido arachidonico ed etanolammide, ed il 2-arachidonoilglicerolo (2-AG) [2,3], acido arachidonico coniugato con glicerolo.

L'AEA, isolato per la prima volta da un cervello di maiale nel 1992 [1], secreto sia dalle cellule neuronali che da quelle del sistema immunitario, media una serie di tipici effetti cannabinici quali nocicezione, catalessia e ipoalgesia. La sua azione si esplica principalmente attraverso il legame con il recettore cannabico di tipo 1 (CB1) ma anche con il recettore cannabico di tipo 2 (CB2) comportandosi come un agonista parziale [4-6]. Aree con elevata espressione del recettore CB1 come l'ippocampo, lo striato e il cervelletto, producono anche elevati livelli di AEA [1,7,8]. A livello periferico è espresso in organi come la milza, i reni, la pelle e l'utero [8,9].



Fig. 1 Struttura chimica della molecola AEA

Il 2-AG è l'unica specie di monoacilglicerolo con l'acido arachidonico in posizione 2 del glicerolo. E' stato a lungo considerato come prodotto della degradazione dei fosfolipidinositoli e come possibile fonte di acido arachidonico in cellule stimulate [10]. Non gli era stata attribuita nessuna attività biologica fino al 1995 quando fu isolato da cervello di ratto [11] e classificato come ligando endogeno dei recettori cannabinici sia CB1 che CB2 con cui si comporta come un agonista pieno [12]. E' presente in diversi tessuti come quelli del sistema nervoso [13], del cuore [14], del fegato, della milza [13,14], dei polmoni [13], dei reni [13,14], nel plasma [13], del colon e dell'intestino tenue [15,16].



Fig. 2 Struttura chimica della molecola 2-AG

Gli endocannabinoidi vengono generalmente prodotti all'interno delle cellule neuronali attraverso diverse vie biosintetiche. A differenza di altri neuromediatrici non vengono immagazzinati in vescicole ma vengono sintetizzati *on demand* a partire da precursori fosfolipidici di membrana (N-arachidonoil-fosfatidil-etanolamine e diacilglicerolo) [17-20]. Il processo di biosintesi è attivato da uno stimolo che provoca la depolarizzazione della membrana cellulare.

In particolare per l'AEA il meccanismo comunemente accettato prevede l'idrolisi enzimatica, catalizzata da una fosfolipasi di tipo D (PDL), di un precursore fosfolipidico, l'N-arachidonoil-fosfatidiletanolamina [21].

Il 2-AG, come anche l'AEA, viene prodotto dalle cellule a partire da precursori di membrana per essere poi rilasciato nel versante extracellulare. Esso appartiene alla famiglia dei monoacilgliceroli e come tale la sua sintesi è strettamente associata al metabolismo dei triacilgliceroli e principalmente all'attivazione di una fosfolipasi fosfatidilinositolo-specifica (PLC). Il 2-AG infatti può essere sintetizzato a partire dai fosfatidilinositoli attraverso una rapida idrolisi mediata dalla PLC e una successiva idrolisi del risultante diacilglicerolo per mezzo della diacilglicerolo lipasi; oppure può essere il prodotto dell'attività della PLA₁ seguita dalla PLC [13,22,3].

Il 2-AG può essere prodotto anche a partire dalla fosfatidilcolina attraverso la PLC o la PLD seguita dall'azione della fosfatasi dell'acido fosfatidico. In alternativa esso può derivare dalla conversione dell'acido fosfatidico o lisofosfatidico. L'utilizzo delle diverse vie di sintesi dipende dai tipi cellulari o tessuti e dai diversi stimoli a cui essi sono sottoposti [3].

Dopo essere stati prodotti gli endocannabinoidi possono diffondere attraverso la membrana citoplasmatica e legarsi ai recettori della stessa cellula che li ha prodotti; oppure possono essere rilasciati nel fluido extracellulare e raggiungere altri siti bersaglio [24].

CB1 e CB2 sono i due principali recettori cannabinici conosciuti ed entrambi appartengono alla superfamiglia dei recettori accoppiati a proteine G. Sono costituiti da 7 α -eliche transmembrana

e un dominio N-terminale con potenziali siti di glicosilazione localizzato nella porzione extracellulare ed un dominio C-terminale con siti di fosforilazione localizzato nell'intracellulare. Il recettore umano CB1, costituito da 472 aminoacidi, è espresso in maniera predominante nel sistema nervoso centrale, ma anche nel sistema nervoso periferico, nel sistema immunitario, nel cuore e nei tessuti vascolari [24-30]. Principale caratteristica di questo recettore è la conservazione nel corso dell'evoluzione [27,31].

Il recettore umano CB2 invece è costituito da 360 aminoacidi. I due recettori hanno un'omologia del 44%, che diventa del 69% se si considera il solo dominio transmembrana. Questo recettore è esclusivamente presente nel sistema immunitario, solo recentemente la sua espressione è stata notata anche nel cervello [32], è infatti abbondantemente espresso in tutti i tipi di leucociti, come linfociti B, natural killer e macrofagi/monociti, ed è noto il suo coinvolgimento nella risposta immunitaria come anche nelle reazioni infiammatorie [33].

L'attivazione di questi recettori inibisce la formazione di cAMP mediante l'accoppiamento a proteine Gi, portando ad una diminuzione dei processi fosforilativi dipendenti da proteina chinasi A. Tuttavia altri studi hanno scoperto che i recettori per i cannabinoidi sono anche accoppiati a canali ionici mediante proteine Golf, quindi in grado di inibire l'entrata del Ca²⁺ attraverso N [34], P/Q [35] ed L [28] canali del calcio. In altri lavori è descritto l'accoppiamento di CB1 e CB2 alla cascata delle MAP K (miogeno-activated protein kinase), alla fosfatidilinositolo 3-chinasi, alla via di segnalazione della ceramide e alla produzione di ossido nitrico [36-40]. Infine alcuni studi hanno rivelato che in determinate condizioni il recettore CB1 può stimolare la formazione di cAMP attraverso l'accoppiamento con proteine Gs [41].

In aggiunta a questi classici recettori cannabinici, studi eseguiti su topi privi dei recettori CB hanno rivelato l'esistenza di altri bersagli degli endocannabinoidi che sono stati collettivamente denominati recettori non CB₁/CB₂ ovvero GPR119 e GPR55 [42]. Diversi ricercatori hanno ipotizzato la presenza di questi recettori sulle cellule cerebrali ed endoteliali. Tuttavia le proprietà molecolari ed il significato fisiologico di questi ipotetici recettori cannabinici non sono ancora state comprese.

L'ubiquitaria presenza degli endocannabinoidi correla con il loro ruolo di modulatori di diversi processi fisiologici. Come già descritto in precedenza gli endocannabinoidi sono rilasciati in seguito a richiesta dopo depolarizzazione cellulare o stimolazione recettoriale in maniera calcio-dipendente. Una volta prodotti agiscono sui recettori presenti sulle cellule circostanti il sito di produzione, indicando una loro proprietà di mediatori locali. La loro ampia presenza nel sistema nervoso centrale suggerisce un ruolo fondamentale nella trasmissione sinaptica [41,42,44]. Molto

importante è l'azione presinaptica attribuita agli endocannabinoidi supportata dall'elevata concentrazione di recettori CB1 nelle terminazioni presinaptiche e un ben documentato effetto inibitorio di agonisti CB1 sul rilascio di GABA, glutammato, acetilcolina e noradrenalina [45,46]. Effetti inibitori sono stati dimostrati nei confronti di neuropeptidi come la corticotropina e la colecistochinina [47,48]. L'inibizione presinaptica del rilascio del trasmettitore è associata all'azione inibitoria degli endocannabinoidi sui canali del calcio presinaptici attraverso l'attivazione dei recettori CB1. Tale inibizione adotta due forme di plasticità sinaptica a breve termine denominati DSI (depolarization-induced suppression of inhibition) e DSE (depolarization-induced suppression of excitation) [49,50].

Altre forme di modulazione della trasmissione sinaptica coinvolgono l'induzione della plasticità sinaptica a lungo termine ovvero LTP (long-term potentiation) e LTD (long-term depression). L'attivazione dei recettori cannabinici bloccano l'LTP nelle sinapsi ippocampali [51] e inducono l'LTD nello striato [52] e nel nucleus accumbens [53].

Gli effetti cellulari degli endocannabinoidi hanno un profondo impatto sui maggiori sistemi fisiologici che controllano le funzioni corporee. Oltre alla modulazione periferica del sistema immune, il sistema vascolare, gli organi di riproduzione, la motilità ed il metabolismo intestinale, gli endocannabinoidi regolano processi di percezione come la nocicezione [54] e i processi visivi nella retina [55]. Altre funzioni coinvolgono la regolazione dei nuclei basali e dei circuiti cerebellari [42].

I recettori per gli endocannabinoidi sono abbondantemente espressi anche in determinate aree dei tessuti linfoidei, come una zona marginale della milza, la cortex dei linfonodi e la corona nodulare delle placche del Peyr's [33]. CB2 è il recettore maggiormente espresso nei tessuti linfoidei. L'mRNA del recettore CB2 è assente solo nei neutrofili umani [56]. Tale distribuzione suggerisce che CB2 giochi un ruolo essenziale nel corso dell'infiammazione e della risposta immunitaria. La maggior parte degli studi mostra che la somministrazione di cannabinoidi ha effetti inibitori sulle cellule del sistema immunitario, ma alcuni più recenti hanno dimostrato che gli endocannabinoidi hanno un effetto stimolatorio sul sistema immune e sono importanti nell'omeostasi o nel controllo delle reazioni immunitarie. Questa apparente contraddizione è probabilmente dovuta ad una risposta bifasica relativa alla concentrazione dei ligandi. Inoltre cannabinoidi derivati dalle piante come THC, agiscono come agonisti parziali a livello dei recettori, quindi antagonizzano gli effetti del 2-AG. In particolare il 2-AG induce attivazione di p38 MAPK, JNK e p42/p44 MAPK nei leucociti, stimolando di fatto la reazione infiammatoria. Questa attivazione gioca un ruolo cruciale nell'aumento di produzione di chemochine [57] e migrazione cellulare 2-AG dipendente [58]. Questo endocannabinoide è inoltre in grado di

indurre cambiamenti morfologici nelle cellule del sistema immunitario, come l'estensione di pseudopodi e una rapida polimerizzazione dell'actina [59]. Altro importante effetto sui leucociti riguarda l'adesione cellulare [60].

Il 2-AG prodotto nei tessuti vascolari partecipa a regolazioni fisiologiche delle funzioni vascolari come la diminuzione del tono vascolare attraverso l'attivazione del recettore CB1 espresso sulle cellule della muscolatura vascolare, sulle cellule endoteliali o sulle porzioni terminali dei nervi periferici [61]. Tuttavia alcuni effetti del 2-AG possono anche essere mediati dai metaboliti dell'acido arachidonico da esso derivanti [62,63].

Alcune linee di ricerca attribuiscono un ruolo agli endocannabinoidi nella fisiologia oculare. Infatti il recettore CB1 è espresso nei tessuti oculari come retina, trabecolato e processi ciliari. Un possibile ruolo potrebbe essere l'intrinseca regolazione della pressione intraoculare [64].

I recettori cannabici sono anche espressi in diversi tessuti gastrointestinali come il colon, l'intestino e lo stomaco, per cui il recettore CB1 potrebbe essere coinvolto nella regolazione della motilità intestinale [65].

Ci sono inoltre evidenze del fatto che il 2-AG giochi un ruolo nella proliferazione e nell'invasività di alcuni tipi di cellule cancerose in particolare nel cancro al seno o alla prostata. [66,67]

Il recettore CB2 è inoltre presente in un comune sito di integrazione virale, Evi11, ed è overespresso in leucemie mieloidi murine indotte da retrovirus [68].

Anche le piastrine sono coinvolte nel rilascio [69] e nel metabolismo degli endocannabinoidi, sono infatti in grado di riassorbire l'anandamide mediante un sistema stimolato da donatori di ossido nitrico [70]. Partendo da questo presupposto è stato inoltre suggerito che le piastrine siano di elevata attività del FAAH, infatti le piastrine sono in grado di riassorbire 2-AG in maniera idrolisi dipendente, non è però ancora chiaro il meccanismo e l'esistenza di possibili trasportatori è ancora sconosciuta. Ci sono evidenze sul fatto che gli endocannabinoidi promuovano l'attività piastrinica, indicando che possono essere trombogenici [70-72].

Infine recenti studi hanno suggerito un nuovo ruolo fisiologico degli endocannabinoidi come molecole segnale responsabili del controllo della proliferazione e del differenziamento sia a livello centrale [73] che periferico [74].

E' noto che gli endocannabinoidi abbiano una funzione nella regolazione della proliferazione e nel differenziamento di cellule mieloidi e linfoidi [75-77].

Recentemente è stato riportato che il 2-AG agisce attraverso recettori CB2 causando migrazione di cellule ematopoietiche [78]. Tuttavia i meccanismi molecolari attraverso i quali gli

endocannabinoidi sono coinvolti nel differenziamento ematopoietico sono ancora in fase di analisi.

La degradazione degli endocannabinoidi avviene per mezzo di due specifici sistemi enzimatici: l'idrolasi delle ammidi degli acidi grassi, denominata FAAH (enzima di membrana che appartiene alla famiglia delle serine-idrolasi) [79] e la lipasi dei monoacilgliceridi, o MAGL [80] anch'essa una serina idrolasi presente sia nelle membrane che nelle frazioni citosoliche [81, 82, 80, 83]. Entrambi questi enzimi agiscono liberando acido arachidonico

Il 2-AG può essere metabolizzato non solo attraverso enzimi catabolici, ma anche anabolici. Può essere ad esempio metabolizzato ad acido 2-arachidonoil lisofosfatidico (LPA) attraverso l'azione di chinasi specifiche [84-85]. Questa via è probabilmente importante per il riciclo del 2-AG a formare glicerofosfolipidi come il fosfatidilinositolo (IP) [86].

In particolari condizioni di inattivazione di MAGL e FAAH l'AEA e il 2-AG possono essere substrato della ciclossigenasi 2 (COX2). Le ciclossigenasi (COX1 e COX2) catalizzano la conversione dell'acido arachidonico in prostaglandine (PGs), trombossano e prostacicline [87,88].

I prodotti dell'ossigenazione da parte delle COX2 di 2-AG e AEA sono idrossiendoperossidi, analoghi della prostaglandina H2 (PGH2-G e PGH2-EA) [9,10]. Questi metaboliti non sono in grado di attivare i recettori cannabici, ma sembra che agiscano attraverso un nuovo sito di legame di cui esiste evidenza farmacologica ma non molecolare [89,90].

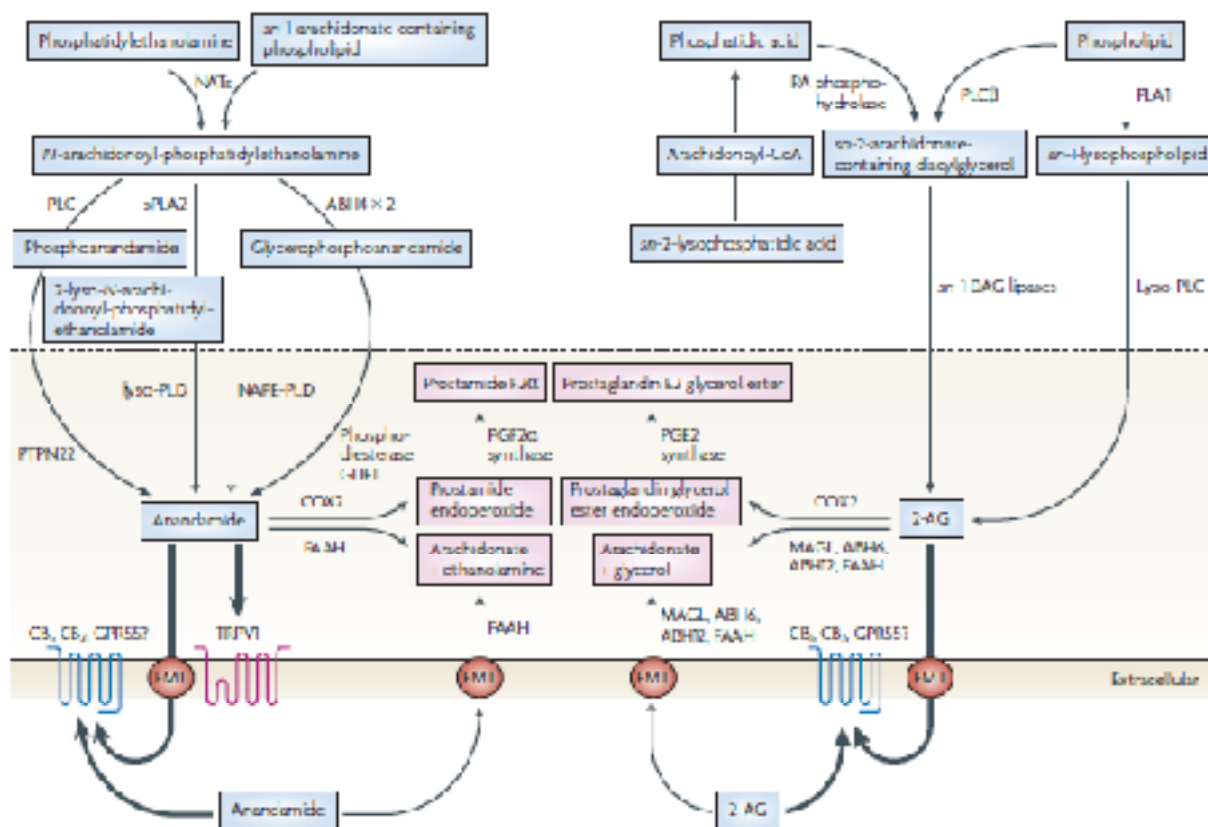


Fig. 3 Biosintesi, azione e inattivazione dell'AEA e del 2-AG. La via di sintesi delle due molecole è mostrata in azzurro, mentre la via di degradazione in rosa.

3.2 SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questo lavoro è stato investigare gli effetti del 2-AG, l'endocannabinoide più rappresentato nei tessuti periferici, sulla regolazione della funzionalità piastrinica e sulla differenziazione di linee cellulari ematopoietiche. Infatti diversi tipi di cellule, come quelle dell'endotelio vascolare e le piastrine umane, producono 2-AG in seguito a stimolo.

In particolare ci si proponeva di comprendere i meccanismi molecolari attraverso cui il 2-AG interagisce con le piastrine umane in assenza di plasma. E' noto che le piastrine sono in grado di metabolizzare attivamente gli endocannabinoidi e che il trasportatore di membrana anandamide e le idrolasi degli acidi grassi sono presenti e attivi nelle piastrine umane. Inoltre è stato dimostrato che il 2-AG viene rilasciato dalle piastrine attivate durante l'emostasi, l'infiammazione ed in associazione con diverse malattie vascolari. Quindi il 2-AG potrebbe effettivamente partecipare alla regolazione della risposta e della funzionalità piastrinica.

Infine ci si proponeva di studiare il coinvolgimento degli endocannabinoidi nella differenziazione di progenitori ematopoietici. Per questo scopo sono state utilizzate cellule di eritroleucemia umana (HEK), una linea cellulare bi-potente che esprime sulla superficie antigeni sia della linea eritroide che megacariocitica.

Il lavoro originale è riportato di seguito (ALLEGATO 7).

3.3 ALLEGATO 7

ORIGINAL ARTICLE

The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol activates human platelets through non-CB₁/CB₂ receptors

S. BALDASSARRI,*¹ A. BERTONI,*^{†1} A. BAGAROTTI,* C. SARASSO,* M. ZANFA,* M. V. CATANI,‡ L. AVIGLIANO,‡ M. MACCARRONE,§¶ M. TORTI,** and F. SINIGAGLIA*[†]

*Department of Clinical and Experimental Medicine and †Center of Biotechnology for Applied Medical Research (BRMA), University of Eastern Piedmont, Novara; ‡Department of Experimental Medicine and Biochemical Sciences, University of Rome Tor Vergata, Rome; §Department of Biomedical Sciences, University of Teramo, Teramo; ¶European Center for Brain Research (CERC)/IRCCS S. Lucia Foundation, Rome; and **Department of Biochemistry, University of Pavia, Pavia, Italy

To cite this article: Baldassarri S, Bertoni A, Bagarotti A, Sarasso C, Zanfa M, Catani MV, Avigliano L, Maccarrone M, Torti M, Sinigaglia F. The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol activates human platelets through non-CB₁/CB₂ receptors. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 1772-9.

Summary. *Background:* The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol (2-AG) is an endogenous lipid that acts through the activation of G-protein-coupled cannabinoid receptors and plays essential roles in many physiological contexts. In the cardiovascular system 2-AG is generated by both activated endothelial cells and platelets, and participates in the regulation of inflammation and thrombosis. Although human platelets actively metabolize endocannabinoids, 2-AG also binds to platelet surface and leads to cell activation. *Objective:* To investigate the biological consequence of 2-AG interactions with human platelets and to clarify the role of cannabinoid receptors. *Methods:* Gel-filtered platelets were stimulated with 2-AG in the presence or absence of various inhibitors. Platelet aggregation and secretion were measured in a lumiaggregometer. Calcium ion movements were measured in FURA-2 loaded platelets. Thromboxane A₂ (TxA₂) generation was evaluated as Thromboxane B₂ accumulation with a commercial EIA assay. *Results:* 2-AG induced platelet shape change, aggregation and secretion with a dose-dependent mechanism that required engagement of platelet TxA₂ receptors. 2-AG caused also cytosolic calcium increase; however, it was totally dependent on availability of TxA₂. Indeed 2-AG was able to induce a robust generation of TxA₂ through the cyclooxygenase pathway. Treatment of platelets with inhibitors of monoacylglycerol lipase and fatty acid amide hydrolase did not affect the activation induced by 2-AG. Moreover, neither CB₁ and CB₂ proteins nor CB₁/CB₂ mRNAs were detected in

platelets. *Conclusions:* 2-AG can be considered a new physiologic platelet agonist able to induce full platelet activation and aggregation with a non-CB₁/CB₂ receptor-mediated mechanism.

Keywords: 2-Arachidonoylglycerol, cannabinoid receptors, platelets, thromboxane A₂.

Introduction

2-Arachidonoylglycerol (2-AG) is a natural monoacylglycerol isolated in 1995 from rat brain [1] and canine gut [2] as an endogenous ligand for the cannabinoid receptors. Hence it was called endocannabinoid. Two major cannabinoid receptors have been described, both of which belong to the superfamily of G-protein-coupled receptors. The first receptor, named CB₁ (type-1 cannabinoid receptor), is mainly located in the nervous system [3]. The second one was called CB₂ (type-2 cannabinoid receptor). It is almost exclusively present in the immune system [4], though its expression in brain has recently been detected [5].

In addition to these well-characterized receptors, there are multiple lines of evidence that suggest the existence of several types of non-CB₁, non-CB₂ cannabinoid receptors [6]. For example, several investigators have proposed the occurrence of a putative cannabinoid receptor in the brain and in the endothelium [7]. Yet, the details of the molecular properties, as well as the physiological significance of these putative cannabinoid receptors, remain ambiguous.

2-AG is a derivative of arachidonic acid conjugated with glycerol. It can be formed from arachidonic acid-containing membrane phospholipids or lysophosphatidic acid. Once 2-AG is formed, it can diffuse through the plasma membrane and target the CB receptors of the same cell where it was formed or it can activate CB receptors of other identical or different cell types after being released to the extracellular fluid. In addition, 2-AG can be transported inside the cells, possibly by a specific uptake system. Despite the increasing number of experimental data from pharmacological studies [8], little is known concern-

Correspondence: Fabiola Sinigaglia, Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Eastern Piedmont, via Solaroli 17, 28100 Novara, Italy.
Tel./fax: +39 321 660 608.
e-mail: fabiola.sinigaglia@med.uniroma.it

¹These authors should both be considered as first author.

Received 21 February 2008, accepted 6 July 2008

ing the molecular properties of the purported 2-AG transporter. Anyway, 2-AG is rapidly metabolized by different cell types to yield arachidonic acid and glycerol. The most important mechanism of degradation of 2-AG is catalyzed by a monoacylglycerol lipase [9,10] but 2-AG can also be hydrolyzed by fatty acid amide hydrolase [11].

Because of its wide distribution throughout the body, 2-AG physiologically plays essential roles in diverse biological systems. For example, several lines of evidence indicate that 2-AG plays an important role as a retrograde messenger molecule in the regulation of synaptic transmission [12]. 2-AG is also involved in the regulation of various types of inflammatory reactions and immune responses. In fact, many inflammatory cells and immune-competent cells, such as macrophages [9] and dendritic cells [13], generate 2-AG when stimulated, and release 2-AG into the extracellular fluid. The released 2-AG then binds to the CB₂ receptor expressed on other inflammatory cells or immune-competent cells, increases the production of chemokines [14] and triggers direct migration of macrophage-like cells [15], dendritic cells [16], B lymphocytes [17], eosinophils [18] and natural killer cells [19], thereby stimulating inflammatory reactions and immune responses.

Several types of cells, such as human vascular endothelial cells and human platelets, generate 2-AG when stimulated [20,21]. It is noteworthy that human platelets seem to be particularly active in metabolizing endocannabinoid molecules. In fact, anandamide membrane transporter and fatty acid amide hydrolase are present and active in human platelets [22,23]. Moreover, 2-AG was found to be released from activated platelets during hemostasis and inflammation as well as in association with different vascular diseases. Hence, 2-AG may participate in the regulation of platelet response and function.

To better understand the role of 2-AG in the regulation of platelet functionality we investigated the molecular mechanisms by which 2-AG interacts with human platelets in the absence of plasma. We found that 2-AG activated platelets through non-CB₁/CB₂ cannabinoid receptors and induced a massive thromboxane A₂ generation, which in turn caused cytoplasmic Ca²⁺ release, granule secretion and full platelet aggregation.

Materials and methods

Materials

2-Arachidonoylglycerol (2-AG), *N*-arachidonoyl-maleimide (NAM), (3'-(aminocarbonyl)[1,1'-biphenyl]-3-yl)-cyclohexyl-carbamate (URB597), arachidonic acid, arachidonoyl 2'-Chloroethylamide (ACEA), (2-*mmethyl-1-propyl-1H-indol-3-yl*)-1-naphthalenyl-methanone (JWH 015) and anti-CB₂ antibody were obtained from Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA). Sepharose CL-2B, phosphocreatine (CP), creatine phosphokinase (CPK) and aspirin (ASA) were purchased from Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, USA). FURA-2-AM and thrombin were from Calbiochem (San Diego, CA, USA). Digitonin was from Fluka (Buchs, Switzerland) ([1S-[1 α , 2 α

(Z), 3 α , 4 α] 7-[3-[[2-[(Phenylamino) carbonyl] mhydrazino]-7-oxabicyclo [2.2.1] hept-2-yl]-5-heptanoic acid]] (SQ29,548) was from Alexis Biochemicals (Lausen, Switzerland). CHRONO-LUME reagent was from CHRONO-LOG Corporation (Havertown, PA, USA). Anti-CB₁ antibody was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). The CB₁ cannabinoid receptor antagonist SR141716 and the CB₂ cannabinoid receptor antagonist SR144528 were gifts of Sanofi-Aventis Recherche (Montpellier, France). Thromboxane B₂ Biotrak Assay kit was purchased from Amersham (Little Chalfont, UK). RETROscript KIT and RNAqueous KIT were from Ambion (Austin, TX, USA).

Platelet preparation

Human platelets were isolated from peripheral blood as described by Moro *et al.* [24]. Platelets were isolated by gel-filtration and eluted with HEPES buffer (10 mM HEPES, 137 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 12 mM NaHCO₃, pH 7.4). Platelet count was typically adjusted to 3×10^8 cells/mL unless otherwise stated.

Measurements of platelet aggregation and secretion

Samples of gel-filtered platelets were pre-warmed at 37 °C in a lumi-aggregometer under constant stirring, then added with 10 μ M 2-AG or vehicle (EtOH 0.05%). The inhibitors were added at the indicated time before stimulation with 2-AG. Transmittance of platelet samples was monitored continuously up to at least 5 min in a Chronolog lumi-aggregometer. Measurement of platelet secretion was carried out by adding the CHRONO-LUME reagent 5 min after 2-AG. The release reaction was quantified comparing the chemiluminescence signals measured in platelet samples with that obtained after lysis with 0.05% digitonin of samples containing the same number of platelets.

Measurement of cytosolic Ca²⁺ concentration

Platelets were prepared essentially as described above with slight modifications. Platelet-rich plasma was incubated with 3 μ M FURA-2-AM at 37 °C for 30 min before further processing. Platelets were then isolated by gel-filtration and eluted with HEPES buffer containing 5.5 mM glucose. Platelet count was then adjusted to 2×10^8 cells/mL. Measurement of cytosolic Ca²⁺ was performed in a PerkinElmer spectrofluorimeter, in the presence of 2 mM EGTA, as previously described [25]. FURA-2 fluorescence signals were calibrated according to the method of Pollock *et al.* [26].

Measurement of TxA₂ production

Samples of gel-filtered human platelets (0.3 mL, 2×10^8 /mL) were stimulated at 37 °C with arachidonic acid, thrombin or 10 μ M 2-AG after treatment with inhibitors as indicated. The reaction was stopped by quickly freezing the sample in a dry

ice ethanol bath. After thawing at room temperature, the samples were centrifuged at $3000 \times g$ for 10 min at 4°C to remove lysed platelets. The supernatants were collected and used to measure the content of thromboxane B_2 , the stable metabolite of thromboxane A_2 , as indicated by the manufacturer's instructions.

Immunoblotting

Membranes of gel-filtered platelets were prepared by lysis of platelets with digitonin, essentially as described by Moro *et al* [24]. Membrane-rich fractions were separated by SDS-PAGE on 10% polyacrylamide gel, transferred to PVDF membrane, and probed with anti- CB_1 or anti- CB_2 antibodies. All platelet membrane samples were also probed for the presence of integrin β_3 as positive control (data not shown). Immunoreactive bands were detected by an ECL reaction.

RNA extraction, reverse transcription and polymerase chain reaction (PCR)

Platelets were prepared essentially as described above with slight modifications. Platelet pellets were resuspended in assay buffer and prepared as described in CD45 MicroBeads Kit in order to remove contaminating leukocytes. Total RNA was isolated and reverse-transcribed using commercial kits according to the manufacturer's instructions. cDNA was amplified. Primers were designed from conserved regions of human CB_1 and CB_2 sequences (GenBank accession numbers NM_016083 and NM_001841, respectively). The primer sequences were: CB_1 -forward $5'$ -ACTTCCACGTGTCCACCGC- $3'$ and CB_1 -reverse $5'$ -CGCAGTGCCTTCAACAAGAGG- $3'$; CB_2 -forward $5'$ -CATGGGATGGACTTGCTGTC- $3'$ and CB_2 -reverse $5'$ -CACACTTCTTCCAGTGAGCC- $3'$. Amplification of GAPDH cDNA was performed as control. The primers

were GAPDH-forward $5'$ -TCCCTGAGCTGAACGGG-AAG- $3'$ and GAPDH-reverse $5'$ -GGAGGAGTGGGTGTC-GCTGT- $3'$.

Statistical analysis

Data reported are the means \pm SEM of at least three independent experiments, each performed in duplicate. Statistical analysis was performed by the Student's *t*-test. Significant differences were accepted at $P < 0.01$.

Results

2-AG induced platelet aggregation in a dose-dependent manner

It has been shown that in platelet-rich plasma $200 \mu\text{M}$ 2-AG induced full platelet aggregation [23]. Plasma proteins, mainly albumin, can bind endocannabinoids, thus exerting a buffer effect that could modify some molecular aspect of the interaction between 2-AG and platelets. To avoid this, plasma-free gel-filtered human platelets, preconditioned at 37°C with stirring, were added with increasing amounts of 2-AG and aggregation was monitored. In the absence of plasma, 2-AG induced both shape change and platelet aggregation in a dose-dependent manner (Fig. 1). Moreover, whilst the aggregation induced by $0.5 \mu\text{M}$ 2-AG was substantially reversible, higher doses of 2-AG caused a robust and irreversible aggregation that was maximal at a concentration of 2-AG as low as $10 \mu\text{M}$. The aggregation caused by $10 \mu\text{M}$ 2-AG was comparable with that obtained with high doses of thrombin (data not shown). In the absence of plasma, we found that doses of 2-AG higher than $10 \mu\text{M}$ did not activate platelets to a major extent (data not shown). Therefore, $10 \mu\text{M}$ 2-AG was used in all the further investigations.

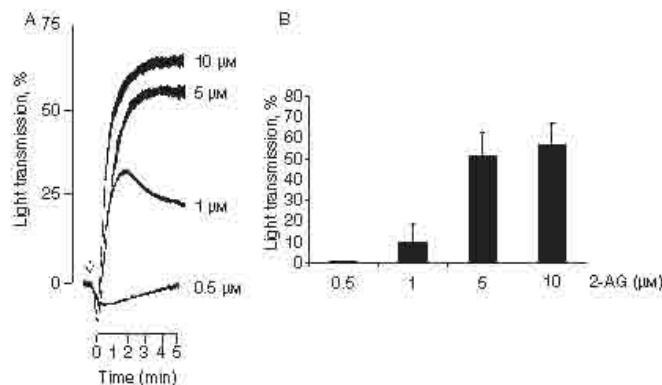


Fig. 1. Effect of 2-AG on aggregation of gel-filtered platelets. Platelets were stimulated with different concentrations of 2-AG and aggregation was measured in a lumiaggregometer for 5 min, at 37°C , under stirring conditions. Results are expressed as increase in light transmission. (A) Aggregation traces from one experiment representative of three independent experiments. (B) Aggregation values obtained in three independent experiments are reported as means \pm SEM of transmittance measured 5 min after 2-AG addition.

2-AG activated platelets with a TxA_2 -dependent mechanism

Platelet agonists cause platelet shape change and aggregation in association with the generation of thromboxane A_2 (TxA_2) and the secretion of granule contents, including ADP, that strengthen cell responses. To investigate the role of these molecules on 2-AG-dependent platelet activation, samples of gel-filtered platelets were pretreated with 100 μM aspirin, a cyclooxygenase inhibitor, or 5 μM SQ29,548, a specific thromboxane A_2 receptor antagonist. Under these conditions, aggregation induced by 2-AG was completely prevented, indicating that 2-AG triggers platelet aggregation and contributes to shape change with a TxA_2 -dependent mechanism (Fig. 2A).

It is known that TxA_2 requires released ADP to aggregate platelets [27]. Accordingly, we found that platelets preincubated with the ADP scavengers CP/CPK and then stimulated with 2-AG did not aggregate at all, while they were still able to modify their shape (Fig. 2A).

We next investigated the role of 2-AG on granule secretion, an important event that occurs upon exposure to activating agonists. As shown in Fig. 2B, stimulation of platelets with 10 μM 2-AG induced a significant ATP secretion. However, SQ29,548 also blocked 2-AG-induced platelet secretion, suggesting that TxA_2 receptor activation as well is essential for ATP release induced by 2-AG (Fig. 2B). Furthermore, pretreatment of platelets with aspirin totally inhibited the ability of 2-AG to induce the platelet release reaction. Therefore, platelet secretion induced by 2-AG is dependent on both TxA_2 generation and TxA_2 receptor activation but it was independent of ADP. In fact, the removal of secreted ADP with CP/CPK did not affect 2-AG-induced secretion (Fig. 2B).

Finally, to further investigate the signaling pathways for 2-AG-mediated platelet activation, we analyzed whether 2-AG was able to induce Ca^{2+} mobilization from cytosolic stores in FURA-2-loaded platelets in the presence of 2 mM EGTA.

The endocannabinoid 2-AG triggered a significant increase in the intracellular cytoplasmic Ca^{2+} level, which was completely inhibited by both aspirin and SQ29,548 (Fig. 2C).

These results demonstrated that in 2-AG-stimulated platelets, Ca^{2+} mobilization was promoted by the TxA_2 produced from arachidonic acid through the cyclooxygenase pathway.

Addition of CP/CPK to platelets did not cause any reduction of the intracellular Ca^{2+} increase induced by 2-AG (Fig. 2C), demonstrating that, even when secreted ADP was neutralized, the increase of cytosolic Ca^{2+} persisted in platelets stimulated with 2-AG. Hence, Ca^{2+} mobilization is an ADP-independent event and is consistent with a TxA_2 -dependent mechanism of platelet activation.

2-AG induced TxA_2 generation

Upon exposure to activating agonists, platelets release arachidonic acid from membrane phospholipids and convert it into TxA_2 by sequential oxygenation via cyclooxygenase and TxA_2 synthase. The released TxA_2 acts as a positive feedback

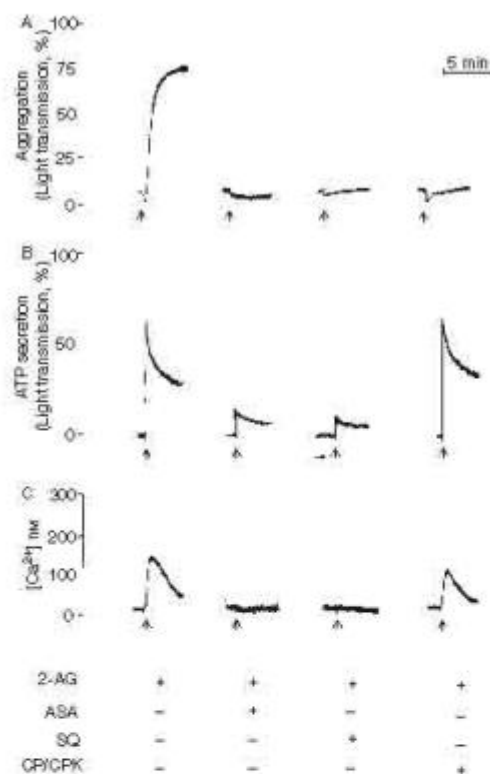


Fig. 2 2-AG-induced platelet aggregation, secretion and Ca^{2+} increase are dependent on TxA_2 generation. Samples of gel-filtered platelets were stimulated with 10 μM 2-AG (as indicated by the arrows) alone or in association with 100 μM aspirin (ASA), 5 μM TxA_2 receptor antagonist SQ29,548 (SQ) or 5 mM creatine phosphate (CP) and 40 U/mL creatine phosphokinase (CPK). SQ or CP/CPK were added 10 or 2 min before stimulation with 2-AG, respectively. Treatment with aspirin was performed for 30 min at 37 °C before stimulation. (A) Aggregation was measured in a lumiaggregometer for 5 min, at 37 °C, under stirring conditions. Results are expressed as increase in light transmission. (B) Measurement of platelet secretion was carried out, after 5 min of stimulation with 2-AG, by measuring the ATP release using the CHRONO-LUME reagent. The activation of platelets was performed in a lumiaggregometer at 37 °C with stirring. The maximum value (100%) represents ATP release upon cellular lysis with 0.05% digitonin. (C) Intracellular Ca^{2+} increase was measured using FURA-2-loaded platelets prewarmed at 37 °C in the presence of 2 mM EGTA. The traces are representative of three independent experiments.

mediator in the recruitment and activation of additional platelets to the primary haemostatic plug.

In this study we have demonstrated that 2-AG caused platelet shape change, aggregation, and promoted the release of granule contents and Ca^{2+} mobilization. As all these events required the presence of TxA_2 we investigated whether 2-AG *per se* was able to promote TxA_2 generation. TxB_2 levels (the stable metabolite of TxA_2) were measured in unstirred human platelets incubated

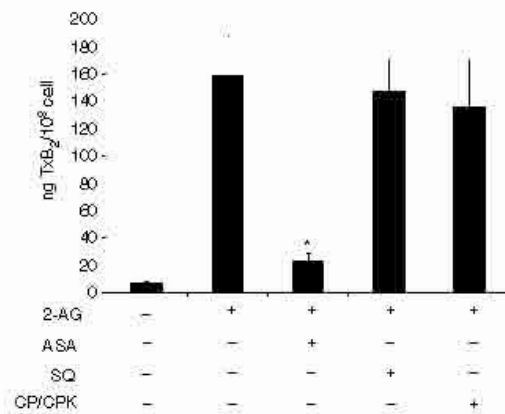


Fig. 3. 2-AG induced Tx₂ generation. Human platelets were left at 37 °C untreated or preincubated for 10 min with 5 µM SQ29,548 (SQ) or 2 min with 5 mM CP and 40 units/mL CPK before stimulation with 10 µM 2-AG. Treatment with 100 µM aspirin (ASA) was performed for 30 min at 37 °C before stimulation with the same dose of agonist. At 5 min after the addition of 2-AG, the reaction was stopped by quickly freezing the sample in a dry ice ethanol bath. After thawing at room temperature, Tx₂ was measured according to the manufacturer's instructions. Values are means ± SEM of six independent experiments (**P* < 0.01 vs. 2-AG).

at 37 °C with or without 10 µM 2-AG and inhibitors, as indicated. We found that the endocannabinoid 2-AG caused a robust Tx₂ production (159.28 ng vs. 6.92 ng of resting platelets), through the activation of the cyclooxygenase pathway (Fig. 3). Indeed, treatment of platelets with aspirin significantly impaired 2-AG-induced Tx₂ production (85% inhibition). It is noteworthy that, upon blockade of the Tx₂ receptor or inactivation of secreted ADP, the amount of Tx₂ produced was similar to that found in platelets treated with 2-AG alone.

Contribution of 2-AG metabolism to platelet activation

2-AG can be metabolized to arachidonic acid by monoacylglycerol lipase [9,10] and fatty acid amide hydrolase [11]. The proaggregant action of arachidonic acid has been well established, because its metabolism by cyclooxygenase and lipoxygenase leads to the formation of various biologically active lipids such as Tx₂. In order to evaluate the contribution of 2-AG metabolism to platelet activation we used NAM [28,29] and URB597 [30,31], irreversible inhibitors of monoacylglycerol lipase and fatty acid amide hydrolase, respectively. In platelets treated with NAM (140 nM, 3 µM) and URB597 (1, 40 µM), alone or in combination, neither platelet aggregation (Table 1) nor Tx₂ production induced by 2-AG (Fig. 4A) were modified. In addition, the production of Tx₂ induced by 10 µM arachidonic acid was lower than that caused by an identical amount of 2-AG (Fig. 4B), while 10 µM 2-AG and 1 U/mL thrombin produced similar amounts of Tx₂ with similar kinetics (Fig. 4B). Accordingly, arachidonic acid, even

Table 1 Effect of MAGL and FAAH inhibitors on 2-AG-dependent platelet aggregation. Samples of gel-filtered platelets were pretreated or not with NAM and URB597, alone or in combination, for 5 min before stimulation with 10 µM 2-AG, at the indicated doses. Aggregation was monitored for 5 min, at 37 °C, under stirring conditions. Results are expressed as % of aggregation ± SEM compared with 2-AG aggregation (100%). The values are representative of three independent experiments

Inhibitors	Aggregation %	Significance (<i>P</i>)
None	100	
NAM 140 nM	85.54 ± 11.38	0.746
NAM 1 µM	84.51 ± 21.83	0.615
NAM 2 µM	67.87 ± 21.14	0.247
NAM 3 µM	64.16 ± 30.46	0.583
URB597 1 µM	95.48 ± 9.67	0.813
URB597 10 µM	91.88 ± 6.06	0.751
URB597 40 µM	94.45 ± 8.64	0.794
NAM 3 µM + URB 10 µM	102.34 ± 3.37	0.927

when used at 5-fold higher concentration, was unable to induce platelet aggregation to the same extent as 2-AG (Fig. 4C).

2-AG elicited platelet activation through non-CB₁/CB₂ receptors

It was shown that human platelets are able to bind and accumulate 2-AG [23]. Endocannabinoids act through the activation of G-protein-coupled receptors, CB₁ and CB₂. To investigate the role of CB receptors on 2-AG-induced platelet aggregation, human platelets were preincubated with 1 µM SR141716 and SR144528 and then stimulated with 2-AG. As shown in Fig. 5A, SR141716 and SR144528 did not prevent platelet aggregation induced by 10 µM 2-AG. We found that CB receptors antagonist inhibited 2-AG-dependent platelet aggregation only at a concentration (20 µM) higher than their reported affinities for CB receptors [7]. The same results were also obtained for ATP release and Ca²⁺ mobilization (data not shown).

In addition, 50 nM ACEA, a selective CB₁ agonist [32] and 200 nM JWH015, a selective CB₂ agonist [33], failed to induce platelet aggregation (Fig. 5A).

Accordingly, immunoblotting analysis did not reveal the presence of classical cannabinoid receptors in platelet membranes (Fig. 5B). Moreover, amplification and electrophoresis of cDNA synthesized from RNA isolated from human platelets did not show the presence of bands of the expected size for both cannabinoid CB₁ and CB₂ cDNA (Fig. 5C).

Discussion

The available information concerning 2-AG is still sparse and rather fragmentary even in the case of the nervous and immune systems. In addition, the physiological functions of 2-AG in several other biological contexts such as the reproductive and hematological systems remain elusive.

In the present work we shed light on the effects of the endocannabinoid 2-AG on human platelets. First of all we

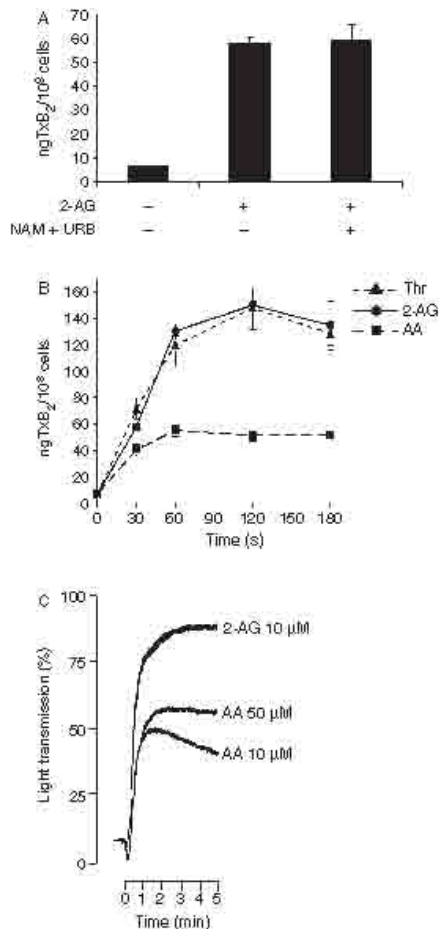


Fig. 4. Contribution of 2-AG metabolism to platelet activation. (A) Measurement of TxB₂ generation in platelets pretreated or not with 3 μM NAM and 10 μM URB 5977 for 5 min and then eventually stimulated with 10 μM 2-AG for 30 s at 37 °C. The reactions were stopped and TxB₂ content was measured according to the manufacturer's instruction. Values are means ± SEM of three independent determinations. (B) Measurement of TxB₂ generation in platelets stimulated with 10 μM AA, 1 U/mL thrombin (Thr), or 10 μM 2-AG. Reactions were stopped at the indicated time and TxB₂ content was measured as in (B). Values are means ± SEM of three independent determinations. (C) Platelets were stimulated with 10 μM 2-AG or with different concentrations of arachidonic acid (AA). Aggregation was measured in a lumiaggregometer for 5 min, at 37 °C, under stirring conditions. Results are expressed as increase in light transmission and they are representative of at least three different experiments performed with platelets from different donors.

demonstrated that 2-AG promotes shape change and full aggregation of gel-filtered platelets, associated with secretion of granule content and cytosolic Ca²⁺ increase. These effects were observed at concentrations of 2-AG as low as 5–10 μM. All

these platelet responses were dependent on TxA₂ formation and engagement of its receptor. In fact, 2-AG *per se* elicited a significant production of TxA₂, which in turn triggered full platelet activation.

It has been shown that 2-AG can be internalized and metabolized to arachidonic acid in different cell types, including human astrocytoma [8] and macrophages [9]. Therefore, also in platelets, 2-AG might be metabolized to arachidonic acid and contribute to TxA₂ formation. However, we have demonstrated that pretreatment of platelets with inhibitors of monoacylglycerol lipase and fatty acid amide hydrolase, which prevent the degradation of 2-AG, did not inhibit the aggregation and TxA₂ production caused by 2-AG. It is noteworthy that the kinetics of TxA₂ production in thrombin and 2-AG-stimulated platelets were identical and different from that observed in platelets treated with 10 μM arachidonic acid. Moreover, platelet stimulation with high doses of arachidonic acid did not result in the same level of aggregation as that induced by 2-AG. Although these results do not rule out the possibility that 2-AG metabolites participate in 2-AG-dependent platelet activation, they are strongly suggestive of the existence of different pathways through which 2-AG leads to platelet activation.

In platelets stimulated by strong agonists, arachidonic acid is released from membrane phospholipids by the enzymatic activity of cPLA₂ and rapidly converted into TxA₂, a potent platelet agonist.

The activity of cPLA₂ is regulated by at least two major mechanisms. The first one involves the intracellular Ca²⁺-dependent translocation of cPLA₂ from the cytosol to the membranes [34]. The second major regulatory mechanism for cPLA₂ is through phosphorylation of serine-505, mediated by ERK1/2 [35].

It has been shown that delta 9-tetrahydrocannabinol (THC), the major psychoactive cannabinoid, and anandamide, phosphorylate and activate cPLA₂ [36,37]. Moreover, activation of ERK1/2 in response to 2-AG has been documented [38].

We have demonstrated that 2-AG depends on generated TxA₂ to cause calcium mobilization, hence this calcium resource cannot be responsible for cPLA₂ activation by 2-AG. However, it cannot be excluded that 2-AG is able to induce a local Ca²⁺ movement through platelet plasma membrane, not detectable by the instruments but sufficient for the activation of cPLA₂. Finally, it is also possible that 2-AG activate cPLA₂ in a Ca²⁺-independent manner, as already suggested for other biological systems [34].

Maccarrone *et al.* previously showed that 2-AG binds to human platelets in a saturable, time and temperature dependent manner [23]. This implies the existence of a platelet receptor for 2-AG that could signal TxA₂ production. Otherwise, the dose-dependent effect of 2-AG on platelet aggregation strengthens this hypothesis. Until now, two cannabinoid receptors have been well characterized, the type-1 and type-2 cannabinoid receptors. We investigated whether the effects of 2-AG on platelet activation are mediated by these

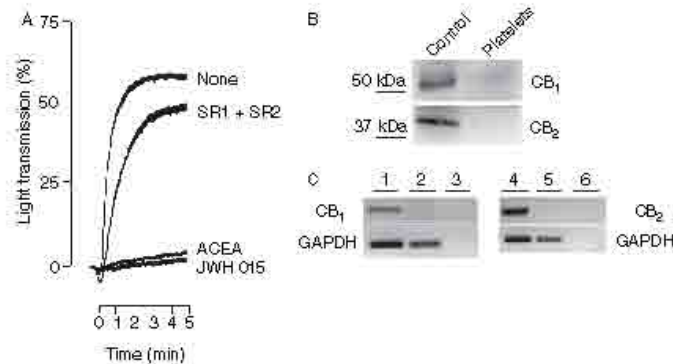


Fig. 5. The role of CB receptors on 2-AG-induced platelet aggregation. (A) Aggregation was measured in a lumiaggregometer for 5 min, at 37 °C, under stirring conditions. Platelets were stimulated with 10 μM 2-AG alone (NONE) or in association with 1 μM SR141716 (SR1) and SR144528 (SR2), CB receptors antagonists. SR1 and SR2 were added 5 min before stimulation with 2-AG. Aggregation by 50 nM ACEA and 200 nM JWH 015 is also reported. (B) Membrane-rich fractions were prepared from platelets as described in 'Materials and methods' and analyzed by immunoblotting with anti-CB₁ or anti-CB₂ antibodies. Positive controls for CB₁ and CB₂ receptors are total lysates of subcutaneous adipose tissue and Jurkat T cells, respectively. (C) Cannabinoid CB₁ and CB₂ amplicons (of expected sizes of 731 bp and 435 bp, respectively) obtained after the amplification of cDNA prepared from RNA of subcutaneous adipose tissue (lane 1), Jurkat T cells (lane 4) and platelets (lanes 2 and 5). Lanes 3 and 6 are negative controls with primers and water template. Amplification of GAPDH cDNA was performed as control. Results are representative of at least four different experiments.

well-known receptors. We found that the specific CB-receptor antagonists are able to block 2-AG-induced platelet activation only at high concentration. Moreover, selective CB agonists failed to induce platelet aggregation. These data are indicative of the absence of classical-CB receptors in human platelets. This hypothesis was confirmed by the absence of either CB₁ or CB₂ mRNAs in human platelets and CB₁ and CB₂ receptor proteins in platelet membrane rich fractions.

The results reported here show that 2-AG can be considered a new physiologic platelet agonist able to induce full platelet activation and aggregation through a purported 'platelet-type' cannabinoid receptor. This finding is not unprecedented. It was already shown that platelets exhibit specific binding of the synthetic cannabinoid radioligand, ³H-CP55940, which is consistent with the expression of a CB-type receptor, but the binding characteristics did not fit into the classical CB₁ and CB₂ classification [23]. Moreover, reports from literature demonstrate that several effects of endocannabinoids are not mediated by CB₁ or CB₂ receptors [6,7]. This can be explained by the existence of additional cannabinoid targets, which have come to be known collectively as non-CB₁/CB₂ receptors. Recently, two orphan GPCRs have emerged as novel cannabinoid receptors. These are GPR119, a receptor for oleoylethanolamide, and GPR55, which is activated by various cannabinoid molecules [6]. Despite intense research efforts, the molecular identity and tissue distribution of these non-CB₁/CB₂ receptors remain mostly unclear.

Addendum

S. Baldassari and A. Bertoni designed and performed research, analyzed data, and wrote the manuscript. A. Bagarotti

performed secretion experiments. C. Sarasso and M. Zanfa contributed to data analysis. M. V. Catani and L. Avigliano interpreted data. M. Maccarrone and M. Torti gave intellectual contribution to the experimental design and revised the paper. F. Sinigaglia coordinated the whole study.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Ministero dell'Università e della Ricerca-PRIN 2004 (to FS and LA), from Regione Piemonte -Ricerca Sanitaria Finalizzata 2004 and -Ricerca Scientifica Applicata 2004 (to AB), and from Università del Piemonte Orientale-Ricerca Locale 2007 (to AB). The authors thank A. Genazzani for support with calcium experiments.

Disclosure of Conflict of Interests

The authors state that they have no conflict of interests.

References

- 1 Sugiyama T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 215: 89-97.
- 2 Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, Pertwee RG, Griffin G, Bayewitch M, Barg J, Vogel Z. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 1995; 50: 83-90.
- 3 Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC. Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1932-6.

- 4 Herkenham M. Localization of cannabinoid receptors in brain and periphery. In: Pertwee RG, ed. *Cannabinoid Receptor*. London: Academic Press, 1995: 145-66.
- 5 van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouhate A, Urbani P, Mackie K, Stella N, Makryiannis A, Pionelli D, Davison JS, Marnett LJ, Di Marzo V, Pittman QJ, Patel KD, Sharkey KA. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* 2005; **310**: 329-32.
- 6 Brown AJ. Novel cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol* 2007; **152**: 567-75.
- 7 Begg M, Pacher P, Bátkai S, Ossi-Hyáman D, Offertáler L, Mo FM, Liu J, Kunos G. Evidence for novel cannabinoid receptors. *Pharmacol Ther* 2005; **106**: 133-45.
- 8 Beltramo M, Pionelli D. Carrier-mediated transport and enzymatic hydrolysis of the endogenous cannabinoid 2-arachidonylglycerol. *Neuroreport* 2000; **11**: 1231-5.
- 9 Di Marzo V, Bisogno T, De Petrocellis L, Melck D, Orlando P, Wagner JA, George K. Biosynthesis and inactivation of the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol in circulating and tumoral macrophages. *Eur J Biochem* 1999; **264**: 258-67.
- 10 Dinh TP, Kathuria S, Pionelli D. RNA interference suggests a primary role for monoacylglycerol lipase in the degradation of the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol. *Mol Pharmacol* 2004; **66**: 1260-4.
- 11 Di Marzo V, Bisogno T, Sugura T, Melck D, De Petrocellis L. The novel endogenous cannabinoid 2-arachidonylglycerol is inactivated by neuronal- and basophil-like cells: connections with anandamide. *Biochem J* 1998; **331**: 15-9.
- 12 Sugura T, Kodaka T, Kondo S, Toneyawa T, Nakane S, Kishimoto S, Yamaschia A, Waku K. Inhibition by 2-arachidonylglycerol, a novel type of possible neuromodulator, of the depolarization-induced increase in intracellular free calcium in neuroblastoma glioma hybrid NG108-15 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **233**: 207-10.
- 13 Matias I, Pochard P, Orlando P, Salzet M, Pestel J, Di Marzo V. Presence and regulation of the endocannabinoid system in human dendritic cells. *Eur J Biochem* 2002; **269**: 3771-8.
- 14 Kishimoto S, Kobayashi Y, Oka S, Gokoh M, Waku K, Sugura T. 2-Arachidonylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand, induces accelerated production of chemokines in HL-60 cells. *J Biochem* 2004; **135**: 517-24.
- 15 Kishimoto S, Gokoh M, Oka S, Muramatsu M, Kajiwara T, Waku K, Sugura T. 2-Arachidonylglycerol induces the migration of HL-60 cells differentiated into macrophage-like cells and human peripheral blood monocytes through the cannabinoid CB₂ receptor dependent mechanism. *J Biol Chem* 2003; **278**: 24469-75.
- 16 Maestrom GI. The endogenous cannabinoid 2-arachidonyl glycerol as in vivo chemoattractant for dendritic cells and adjuvant for Th1 response to a soluble protein. *FASEB J* 2004; **18**: 1914-6.
- 17 Jarda MA, Verbakel SE, Valk PJ, Vankan-Berkhout YV, Maccarrone M, Finazzi-Agrò A, Lowenberg B, Delwel R. Hematopoietic cells expressing the peripheral cannabinoid receptor migrate in response to the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol. *Blood* 2002; **99**: 2786-93.
- 18 Oka S, Ikeda S, Kishimoto S, Gokoh M, Yanagimoto S, Waku K, Sugura T. 2-Arachidonylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand, induces the migration of BaL-1 human eosinophilic leukemia cells and human peripheral blood eosinophils. *J Leukoc Biol* 2004; **76**: 1002-9.
- 19 Kishimoto S, Muramatsu M, Gokoh M, Oka S, Waku K, Sugura T. Endogenous cannabinoid receptor ligand induces the migration of human natural killer cells. *J Biochem* 2005; **137**: 217-23.
- 20 Sugura T, Kodaka T, Nakane S, Kishimoto S, Kondo S, Waku K. Detection of an endogenous cannabinoid molecule, 2-arachidonylglycerol, and cannabinoid CB1 receptor mRNA in human vascular cells: is 2-arachidonylglycerol a possible vasomodulator? *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **243**: 838-43.
- 21 Berdyshev EV, Schmid PC, Krebsbach RJ, Schmid HHO. Activation of PAF receptors results in enhanced synthesis of 2-arachidonylglycerol (2-AG) in immune cells. *FASEB J* 2001; **15**: 2171-8.
- 22 Maccarrone M, Del Principe D, Finazzi-Agrò A. Endocannabinoids: new physiological (co-) agonists of human platelets. *Thromb Haemost* 2002; **88**: 165-6.
- 23 Maccarrone M, Bari M, Mucchelli A, Cutilani E, Del Principe D, Finazzi-Agrò A. Human platelets bind and degrade 2-arachidonylglycerol, which activates these cells through a cannabinoid receptor. *Eur J Biochem* 2001; **268**: 819-25.
- 24 Moro L, Reineri S, Piranda D, Pietrapiana D, Lova P, Bertoni A, Graziani A, DeFilippi P, Canobbio I, Torti M, Sinigaglia F. Nongenomic effects of 17 β -estradiol in human platelets: potentiation of thrombin-induced aggregation through estrogen receptor β and Src kinase. *Blood* 2005; **105**: 115-21.
- 25 Sinigaglia F, Bisio A, Torti M, Balducci CL, Bertalino G, Baktuni C. Effect of GpIIb/IIIa complex ligands on calcium ion movement and cytoskeleton organization in activated platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; **154**: 258-64.
- 26 Pollock WK, Rink TJ, Irvine RF. Liberation of [³H] arachidonic acid and changes in cytosolic free calcium in fura-2-loaded human platelets stimulated by ionomycin and collagen. *Biochem J* 1986; **235**: 869-77.
- 27 Paul Benjamin ZS, Jin J, Kunapuli SP. Molecular mechanism of thromboxane A₂-induced platelet aggregation. *J Biol Chem* 1999; **274**: 29108-14.
- 28 Blankman LL, Simon GB, Cravatt BF. A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol. *Chem Biol* 2007; **14**: 1347-56.
- 29 Labar G, Bauvois C, Muccioli GG, Wouters J, Lambert DM. Disulfiram is an inhibitor of human purified monoacylglycerol lipase, the enzyme regulating 2-arachidonylglycerol signaling. *ChemBiochem* 2007; **8**: 1293-7.
- 30 Ghafouri N, Tiger G, Razdan RK, Mahadevan A, Pertwee RG, Martin BR, Fowler CJ. Inhibition of monoacylglycerol lipase and fatty acid amide hydrolase by analogues of 2-arachidonylglycerol. *Br J Pharmacol* 2004; **143**: 774-84.
- 31 Rock EM, Limebeer CL, Mechoulam R, Pionelli D, Parker LA. The effect of cannabidiol and URB597 on conditioned gaping (a model of nausea) elicited by a lithium-paired context in the rat. *Psychopharmacology* 2008; **196**: 389-95.
- 32 Hillard CJ, Manna S, Greenberg MJ, DiCamillo R, Ross RA, Stevenson LA, Murphy V, Pertwee RG, Campbell WB. Synthesis and characterization of potent and selective agonists of the neuronal cannabinoid receptor (CB1). *J Pharmacol Exp Ther* 1999; **289**: 1427-33.
- 33 Pertwee RG. Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr Med Chem* 1999; **6**: 635-64.
- 34 Six DA, Dennis EA. Essential Ca²⁺-independent role of the group IVA cytosolic phospholipase A₂ C2 domain for interfacial activity. *J Biol Chem* 2003; **278**: 23842-50.
- 35 Grosser T, Fries S, FitzGerald GA. Thromboxane generation. In: Michelson AD, ed. *Platelet*. London: Academic Press, 2007: 565-74.
- 36 Chang MC, Berkery D, Laychock SG, Schud H. Reduction of the fertilizing capacity of sea urchin sperm by cannabinoids derived from marijuana. III. Activation of phospholipase A₂ in sperm homogenate by delta 9-tetrahydrocannabinol. *Biochem Pharmacol* 1991; **42**: 899-904.
- 37 Wartmann M, Campbell D, Subramanian A, Burstein SH, Davis RJ. The MAP kinase signal transduction pathway is activated by the endogenous cannabinoid anandamide. *FEBS Lett* 1995; **359**: 133-6.
- 38 Kobayashi Y, Arai S, Waku K, Sugura T. Activation by 2-arachidonylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand, of p42/44 mitogen-activated protein kinase in HL-60 cells. *J Biochem* 2001; **129**: 665-9.

3.4 BIBLIOGRAFIA

1. Devane W. A. *et al.* (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* **258**: 1946–1949.
2. Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L. *et al.* (1995) “Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors” *Biochemical Pharmacology* **50**: 83–90.
3. Sugiura, T., Oka, S., Gokoh, M., Kishimoto, S., Waku, K. (2004) “New perspectives in the studies on endocannabinoid and cannabis: 2-arachidonoylglycerol as a possible novel mediator of inflammation” *J. Pharmacol Sci.* **96**: 367-375
4. Burkey, T. H., Quock, R. M., Consroe, P., Ehlert, F. J., Hosohata, Y., Roeske, W. R., Yamamura, H. I. (1997) “Relative efficacies of cannabinoid CB1 receptor agonists in the mouse brain” *Eur J Pharmacol.* **336(2-3)**:295-8.
5. Glass, M., Northup, J. K. (1999) “Agonist selective regulation of G proteins by cannabinoid CB(1) and CB(2) receptors” *Mol Pharmacol.* **56(6)**: 1362-9.
6. Showalter V.M, Compton D.R, Martin B.R, Abood M.E. (1996) Evaluation of binding in a transfected cell line expressing a peripheral cannabinoid receptor (CB2): identification of cannabinoid receptor subtype selective ligands. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **278**: 989– 999.
7. Schmid P.C, Krebsbach R.J, Perry S.R, Dettmer T.M, Maasson J.L, Schmid H.H. (1995) Occurrence and postmortem generation of anandamide and other long-chain N-acylethanolamines in mammalian brain. *FEBS Lett.* **375**: 117– 120
8. Felder C.C, Nielsen A, Briley E.M, Palkovits M, Priller J, Axelrod J, Nguyen D.N, Richardson J.M, Riggin R.M, Koppel G.A, Paul S.M, Becker G.W. (1996) Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Lett.* **393**: 231– 235
9. Giuffrida A, Piomelli D. (1998) Isotope dilution GC/MS determination of anandamide and other fatty acylethanolamides in rat blood plasma. *FEBS Lett.* **422**: 373–376.
10. Prescott S. M, Majerus P. W. (1983) Characterization of 1,2- diacylglycerol hydrolysis in human platelets. Demonstration of an arachidonoyl-monoacylglycerol intermediate. *J. Biol. Chem.* **258**: 764–769.
11. Sugiura T. *et al.* (1995) 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **215**: 89–97.
12. Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L. *et al.* (1995) “Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors” *Biochemical*

Pharmacology 50: 83–90.

13. Kondo S, Kondo H, Nakane S, Kodaka T, Tokumura A, Waku K, *et al.* (1998) 2-Arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor agonist: identification as one of the major species of monoacylglycerols in various rat tissues, and evidence for its generation through Ca²⁺-dependent and -independent mechanisms. *FEBS Lett* **429**: 152–6.
14. Schmid P.C, Schwartz K.D, Smith C.N, Krebsbach R.J, Berdyshev E.V, Schmid H.H.O. (2000) A sensitive endocannabinoid assay. The simultaneous analysis of N-acylethanolamines and 2-monoacylglycerols. *Chem. Phys. Lipids*. **104**: 185–91.
15. Pinto L, Izzo A.A, Cascio M.G, Bisogno T, Hospodar-Scott K, Brown D.R, *et al.* (2002) Endocannabinoids as physiological regulators of colonic propulsion in mice. *Gastroenterology* **123**: 227–34.
16. Izzo A.A, Fezza F, Capasso R, Bisogno T, Pinto L, Iuvone T. (2001) Cannabinoid CB1-receptor mediated regulation of gastrointestinal motility in mice in a model of intestinal inflammation. *Br. J. Pharmacol.* **134**: 563–70.
17. Sugiura T, *et al.* (1996) Transacylase-mediated and phosphodiesterase-mediated synthesis of N-arachidonylethanolamine, an endogenous cannabinoidreceptor ligand, in rat brain microsomes. Comparison with synthesis from free arachidonic acid and ethanolamine. *Eur. J. Biochem.* **240**: 53–62.
18. Cadas H, Di Tomaso E. & Piomelli D. (1997) Occurrence and biosynthesis of endogenous cannabinoid precursor, N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine, in rat brain. *J. Neurosci.* **17**: 1226–1242.
19. Kanoh H, Yamada K. & Sakane F. (2002) Diacylglycerol kinases: emerging downstream regulators in cell signalling systems. *J. Biochem.* **131**: 629–633.
20. Farooqui A.A, Rammohan K.W. & Horrocks L.A. (1989) Isolation, characterization, and regulation of diacylglycerol lipases from the bovine brain. *Ann. NY Acad. Sci.* **559**: 25–36.
21. Ueda N, Okamoto Y, Morishita J. (2005) N-acylphosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D: a novel enzyme of the beta-lactamase fold family releasing anandamide and other N-acylethanolamines. *Life Sci.* **77**: 1750-8.
22. Bisogno, T., Melck, D., De Petrocellis L., and Di Marzo, V. (1999) “Phosphatidic acid as the biosynthetic precursor of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in intact mouse neuroblastoma cells stimulated with ionomycin” *J.Neurochem.* **72**: 2113-2119.
23. Piomelli, D., Beltramo, M., Glasnapp, S., Lin, S. Y., Goutopoulos, A., Xie, XQ and

- Makriyannis, A. (1999) “Structural determinants for recognition and translocation by the anandamide transporter” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 5802-5807.
24. Herkenham M, Lynn, A., Little M.D, Johnson M.R, Melvin L.S, De Costa B. R, et al. (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **87**: 1932– 1936.
 25. Gerard C.M, Mollereau C, Vassart G. & Parmentier M. (1991). Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem. J.* **279**: 129– 134.
 26. Ishac E.J. N, Jiang L, Lake K.D, Varga K, Abood M.E. & Kunos, G. (1996). Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1 receptors on peripheral sympathetic nerves. *Br. J. Pharmacol.* **118**: 2023– 2028.
 27. Pertwee R.G. (1997). Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther.* **74**: 129– 180.
 28. Gebremedhin D, Lange A.R, Campbell W.B, Hillard C.J. & Harder D.R. (1999) Cannabinoid CB1 receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca²⁺ channel current. *Am. J. Physiol.* **266**: H2085–H2093.
 29. Liu J, Gao B, Mirshahi F, Sanyal A.J, Khanolkar A.D, Makriyannis A, et al. (2000) Functional CB1 cannabinoid receptors in human vascular endothelial cells. *Biochem. J.* **346**: 835–840.
 30. Bonz A, Laser M, Kullmer S, Kniesch S, Babin-Ebell J, Popp V, et al. (2003) Cannabinoids acting on CB1 receptors decrease contractile performance in human atrial muscle. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **41**: 657–664.
 31. Reggio P.H. (2003). Pharmacophores for ligand recognition and activation/inactivation of the cannabinoid receptors. *Curr. Pharm. Res.* **9**: 1607–1633.
 32. van Sickle M.D, Duncan M, Kingsley P.J, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, et al. (2005) Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* **310**: 329–32.
 33. Herkenham M. (1995) Localization of cannabinoid receptors in brain and periphery. In: Pertwee RG, editor. Cannabinoid receptors. London: Academic Press; p. 145–66.
 34. Mackie K. and Hille B. (1992) Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma–glioma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **89**: 3825–3829.
 35. Twitchell W, Brown S. and Mackie K. (1997) Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *Journal of Neurophysiology* **78**: 43–50.

36. Derkinderen P, Toutant M, Burgaya F, Le Bert M, Siciliano J.C, De Franciscis V, Gelman M. and Girault, J. A. (1996) Regulation of a neuronal form of focal adhesion kinase by anandamide. *Science* **273**: 1719–1722.
37. Bouaboula M, Perrachon S, Milligan L. *et al.* (1997) A selective inverse agonist for central cannabinoid receptor inhibits mitogenactivated protein kinase activation stimulated by insulin or insulinlike growth factor 1. Evidence for a new model of receptor/ ligand interactions. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 22330–22339.
38. Molina-Holgado, F., Lledó, A. and Guaza, C. (1997) Anandamide suppresses nitric oxide and TNF- α responses to Theiler's virus or endotoxin in astrocytes. *Neuroreport* **8**: 1929–1933.
39. Galve-Roperh I, Sanchez C, Cortes M. L, del Pulgar T.G, Izquierdo M. and Guzman M. (2000) Anti-tumoral action of cannabinoids: involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation. *Nature Medicine* **6**: 313–319.
40. Howlett A.C, Barth F, Bonner T.I. *et al.* (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacological Reviews* **54**: 161–202.
41. Felder C.C, Joyce K.E, Briley E.M. *et al.* (1998) LY320135, a novel cannabinoid CB1 receptor antagonist, unmasks coupling of the CB1 receptor to stimulation of cAMP accumulation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **284**: 291–297.
42. Zygmunt P.M, Petersson J, Andersson D.A, Chuang H, Sörgård M, Di Marzo,V, Julius D. and Högestätt E. D. (1999) Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* **400**: 452–457.
43. Rodríguez de Fonseca F, Del Arco I, Martin-Caldero J. ., Gorriti M.A. and Navarro M. (1998) Role of the endogenous cannabinoid system in the regulation of motor activity. *Neurobiology of Disease* **5**: 483–501.
44. Giuffrida A. *et al.* (1999) Dopamine activation of endogenous cannabinoid signalling in dorsal striatum. *Nature Neurosci.* **2**: 358–363.
45. Schlicker E. and Kathmann M. (2001) Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptor. *Trends in Pharmacological Sciences* **22**: 565–572.
46. Piomelli, D. (2003) The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nature Reviews Neuroscience* **4**: 873–884.
47. Rodríguez de Fonseca, F, Carrera M.R, Navarro M, Koob G.F. and Weiss F. (1997) Activation of corticotropin-releasing factor in the limbic system during cannabinoid withdrawal. *Science* **276**: 2050–2054.

48. Beinfeld M.C. and Connolly K. (2001) Activation of CB1 cannabinoid receptors in rat hippocampal slices inhibits potassium-evoked cholecystinin release, a possible mechanism contributing to the spatial memory defects produced by cannabinoids. *Neuroscience Letters* **301**: 69–71.
49. Wilson R.I. and Nicoll R.A. (2002) Endocannabinoid signalling in the brain. *Science* **296**: 678–682.
50. Diana M.A. and Marty A. (2004) Endocannabinoid-mediated short-term synaptic plasticity: depolarization-induced suppression of inhibition (DSI) and depolarization-induced suppression of excitation (DSE). *British Journal of Pharmacology* **142**: 9–19.
51. Stella N, Schweitzer P. & Piomelli D. (1997) A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* **388**: 773–778.
52. Gerdeman G.L, Ronesi J. and Lovinger D. M. (2002) Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. *Nature Neuroscience* **5**: 446–451.
53. Robbe D, Kopf M, Remaury A, Bockaert J. and Manzoni O. J. (2002) Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**: 8384–8348.
54. Martin B.R. and Lichtman, A.H. (1998) Cannabinoid transmission and pain perception. *Neurobiology of Disease* **5**: 447–461.
55. Straiker A, Stella N, Piomelli D, Mackie K, Karten H.J. and Maguire G. (1999) Cannabinoid CB1 receptors and ligands in vertebrate retina: localization and function of an endogenous signalling system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **96**: 14565–14570.
56. Oka S, Ikeda S, Kishimoto S, Gokoh M, Yanagimoto S, Waku K, *et al.* (2004) 2-Arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand, induces the migration of EoL-1 human eosinophilic leukemia cells and human peripheral blood eosinophils. *J. Leukoc. Biol.* **76**: 1002–9.
57. Kishimoto S, Kobayashi Y, Oka S, Gokoh M, Waku K, Sugiura T. (2004) 2-Arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand, induces accelerated production of chemokines in HL-60 cells. *J. Biochem.* **135**: 517–24.
58. Kishimoto S, Gokoh M, Oka S, Muramatsu M, Kajiwara T, Waku K. *et al.* (2003) 2-Arachidonoylglycerol induces the migration of HL-60 cells differentiated into macrophage-like cells and human peripheral blood monocytes through the cannabinoid CB2 receptor-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* **278**: 24469–75.

59. Gokoh M, Kishimoto S, Oka S, Mori M, Waku K, Ishima Y. *et al.* (2005) 2-Arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand, induces rapid actin polymerization in HL-60 cells differentiated into macrophage-like cells. *Biochem. J.* **386**: 583–9.
60. Gokoh M, Kishimoto S, Oka S, Metani Y, Sugiura T. (2005) 2-Arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand, enhances the adhesion of HL-60 cells differentiated into macrophage-like cells and human peripheral blood monocytes. *FEBS Lett.* **579**: 6473–8.
61. Kobayashi Y, Arai S, Waku K, Sugiura T. (2001) Activation by 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand, of p42/44 mitogen-activated protein kinase in HL-60 cells. *J. Biochem.* **129**: 665–9
62. Stanke-Labesque F, Mallaret M, Lefebvre B, Hardy G, Caron F, Bessard G. (2004) 2-Arachidonoyl glycerol induces contraction of isolated rat aorta: role of cyclooxygenase-derived products. *Cardiovasc Res* **63**: 155–60.
63. Gauthier K.M, Baewer D.V, Hittner S, Hillard C.J, Nithipatikom K, Reddy D.S. *et al.* Endothelium-derived 2-arachidonoylglycerol: an intermediate in vasodilatory eicosanoid release in bovine coronary arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**: H1344–51.
64. Chen J, Matias I, Dinh T, Lu T, Venezia S, Nieves A, *et al.* (2005) Finding of endocannabinoids in human eye tissues: implications for glaucoma. *Biochem Biophys Res Commun* **330**: 1062–7.
65. Darmani N.A. (2006) Endocannabinoids and gastrointestinal function. In: Onaivi ES, Sugiura T, Di Marzo V, editors. *Endocannabinoids: The brain and body's marijuana and beyond*. Boca Raton: Taylor & Francis; p. 395–419.
66. Melck D, De Petrocellis L, Orlando P, Bisogno T, Laezza C, Bifulco M, *et al.* (2000) Suppression of nerve growth factor Trk receptors and prolactin receptors by endocannabinoids leads to inhibition of human breast and prostate cancer cell proliferation. *Endocrinology* **141**: 118–26.
67. Nithipatikom K, Endsley M.P, Isbell M.A, Wheelock C.E, Hammock B.D, Campbell W.B. (2005) A new class of inhibitors of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis and invasion of prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **332**: 1028–33.
68. Valk P.J, Hol S, Vankan Y, Ihle J.N, Askew D, Jenkins N.A, *et al.* (1997) The genes encoding the peripheral cannabinoid receptor and alpha-L-fucosidase are located near a newly identified common virus integration site, Evil 1. *J Virol* **71**: 6796–804.

69. Berdyshev E.V, Schmid P.C, Krebsbach R.J, Schmid H.H.O. (2001) Activation of PAF receptors results in enhanced synthesis of 2-arachidonoylglycerol (2-AG) in immune cells. *FASEB J* **15**: 2171–8.
70. Maccarrone M, Bari M, Menichelli A, Del Principe D, Finazzi-Agro A. (1999) Anandamide activates human platelets through a pathway independent of the arachidonate cascade. *FEBS Lett* **447**: 7–282.
71. Maccarrone M, Bari M, Menichelli A, Giuliani E, Del Principe D, Finazzi-Agro A. (2001) Human platelets bind and degrade 2- arachidonoylglycerol, which activates these cells through a cannabinoid receptor. *Eur. J. Biochem.* **268**: 819–825.
72. Maccarrone M, Bari M, Del Principe D, Finazzi-Agro A. (2003) Activation of human platelets by 2-arachidonoylglycerol is enhanced by serotonin. *Thromb. Haemost.* **89**: 340–347.
73. Galve-Roperh I, Aguado T, Rueda D, Velasco G, Guzman M. (2006) Endocannabinoids: a new family of lipid mediators involved in the regulation of neural cell development. *Curr. Pharm. Des.* **12**: 2319-2325.
74. Matias I, Gonthier M.P, Orlando P, Martiadis V, De Petrocellis L, Cervino C, Petrosino S, Hoareau L, Festy F, Pasquali R, Roche R, Maj M, Pagotto U, Monteleone P, Di Marzo V. (2006) Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **91**: 3171-3180.
75. Valk P, Verbakel S, Vankan Y, Hol S, Mancham S, Ploemacher R, Mayen A, Löwenberg B, Delwel R. (1997) Anandamide, a natural ligand for the peripheral cannabinoid receptor is a novel synergistic growth factor for hematopoietic cells. *Blood* **90**: 1448-57.
76. Jiang S, Fu Y, Williams J, Wood J, Pandarinathan L, Avraham S, Makriyannis A, Avraham S, Avraham H.K. (2007) Expression and function of cannabinoid receptors CB1 and CB2 and their cognate cannabinoid ligands in murine embryonic stem cells. *PLoS ONE.* **2**(7):e641.
77. Randall MD. (2007) Endocannabinoids and the haematological system. *Br. J. Pharmacol.* **152**: 671-5.
78. Jordà M.A, Verbakel S.E, Valk P.J.M, Vankan-Berkhoudt Y.V, Maccarrone M, Finazzi-Agro A *et al.* (2002) Haematopoietic cells expressing the peripheral cannabinoid receptor migrate in response to the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Blood* **99**: 2786–2793.
79. Cravatt, B. F., Giang, D. K., Mayfield, S. P., Boger, D. L., Lerner, R. A., and Gilula, N.

- B. (1996) "Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides" *Nature* 384: 83–87.
80. Dinh, T. P., Carpenter, D., Leslie, F. M., Freund, T. F., Katona, I., Sensi, S. L., Kathuria, S. and Piomelli, D. (2002) "Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 10819–10824.
81. Di Marzo, V., Bisogno, T., Sugiura, T., Melck, D., De Petrocellis, L. (1998) "The novel endogenous cannabinoid 2-arachidonoylglycerol is inactivated by neuronal- and basophil-like cells: connections with anandamide" *Biochem J* 331: 15–9.
82. De Petrocellis, L., Cascio, M., G., and Di Marzo, V., (2004) "The endocannabinoid system: a general view and latest additions" *British Journal of Pharmacology* 141: 765-774.
83. Bari, M., Battista, N., Fezza, F., Gasperi, V., and Maccarrone, M. (2006) "New insights into endocannabinoid degradation and its therapeutic potential" *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 6: 257-268
84. Kanoh H, Iwata T, Ono T, Suzuki T. (1986) Immunological characterization of sn-1,2-diacylglycerol and sn-2-monoacylglycerol kinase from pig brain. *J. Biol. Chem.* **261**: 5597–5602.
85. Shim Y.H, Lin C.H, Strickland K.P. (1989) The purification and properties of monoacylglycerol kinase from bovine brain. *Biochem. Cell. Biol.* **67**: 233–241.
86. Simpson C.M, Itabe H, Reynolds C.N, King W.C., Glomset J.A. (1991) Swiss 3T3 cells preferentially incorporate sn-2-arachidonoyl monoacylglycerol into sn-1-stearoyl-2-arachidonoyl phosphatidylinositol. *J. Biol. Chem.* **266**: 15 902–15 909.
87. Smith W.L, DeWitt D.L. and Garavito. R.M. (2000) Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu. Rev. Biochem.* **69**: 145–182.
88. Hata A.N., and Breyer R.M. (2004) Pharmacology and signalling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacol. Ther.* **103**: 147–166.
89. Rouzer C.A. & Marnett L. J. (2008) Non-redundant functions of cyclooxygenases: oxygenation of endocannabinoids. *J. Biol. Chem.* **283**: 8065–8069.
90. Woodward D. F, Liang Y. & Krauss A. H. Prostaglandin-ethanolamides and their pharmacology. *Br. J. Pharmacol.* **153**: 410–419.

4. PUBBLICAZIONI

- Dianzani C, Minelli R, Mesturini R, Chiocchetti A, Barrera G, Boscolo S, **Sarasso C**, Gigliotti CL, Sblattero D, Yagi J, Rojo JM, Fantozzi R, Dianzani U. “B7h triggering inhibits umbilical vascular endothelial cell adhesiveness to tumor cell lines and polymorphonuclear cells.” *J Immunol.* 2010 Oct 1;185(7):3970-9. Epub 2010 Sep 3.

- Baldassarri S, Bertoni A, Bagarotti A, Sarasso C, Zanfa M, Catani MV, Avigliano L, Maccarrone M, Torti M, Sinigaglia F. “The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol activates human platelets through non-CB1/CB2 receptors”. *J Thromb Haemost.* 2008 Oct;6(10):1772-9. Epub 2008 Jul 19.