

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	101989900088877
Data Deposito	10/11/1989
Data Pubblicazione	10/05/1991

Classifiche IPC

Titolo

PEPTIDI SINTETICI UTILI COME CARRIERS UNIVERSALI PER LA PREPARAZIONE DI
CONIUGATI IMMUNOGENICI E LORO IMPIEGO PER LO SVILUPPO DI VACCINI SINTETICI.

Descrizione dell'invenzione avente per titolo:

"Peptidi sintetici utili come carriers universali per la preparazione di coniugati immunogenici e loro impiego per lo sviluppo di vaccini sintetici".

dell'ENIRICERCHE S.p.A.

Inventori: Elisabetta BIANCHI, Antonello PESSI,
Giampietro CORRADIN.

* * * *

10 NOV. 1989

RIASSUNTO

2235 5A/89

Il peptide sintetico TT3 la cui sequenza amminoacidica corrisponde alla regione 947-967 della tossina tetanica è riconosciuto da differenti cloni cellulari Th umani in associazione ad una vasta gamma di alleli del Maggior Complesso di Istocompatibilità (MHC) umano. Detto peptide contiene almeno due epitopi uno (953-967), riconosciuto dai cloni DR5 ristretti, e l'altro (947-960), riconosciuto dai cloni ristretti a tutti gli altri alleli DR e DP. Il peptide TT3 così come il peptide corrispondente all'epitopo 947-960 sono utili come carriers universali per la preparazione di coniugati immunogenici costituiti da almeno uno dei suddetti peptidi e da un aptene naturale o sintetico derivato da un agente

patogeno di interesse.

Tali coniugati immunogenici sono particolarmente adatti per la preparazione di vaccini sintetici in grado di conferire una immunità protettiva contro differenti agenti patogeni non ristretta geneticamente o con una restrizione genetica ridotta.

* * * *

DESCRIZIONE

La presente invenzione riguarda, in generale, coniugati immunogenici costituiti da un carrier peptidico universale covalentemente legato ad un aptene derivato da un agente patogeno di interesse e il loro impiego per lo sviluppo di vaccini sintetici.

In particolare, la presente invenzione riguarda peptidi sintetici aventi la sequenza amminoacidica corrispondente, rispettivamente, ai residui amminoacidici 947-967 e 947-960 della tossina tetanica utili come carriers universali per la preparazione di coniugati immunogenici.

L'invenzione riguarda inoltre l'uso di detti coniugati immunogenici per lo sviluppo di vaccini capaci di indurre una immunità protettiva contro differenti agenti patogeni non ristretta geneticamente o con una restrizione genetica ridotta.

Con il termine aptene si intende una molecola capace di legare gli anticorpi specifici (antigenica), ma incapace di indurre la formazione degli anticorpi o di indurla ad un titolo anticorpale basso (non immunogenica).

In particolare sono apteni molecole peptidiche o polisaccaridiche (antigeni timo-indipendenti) isolate e purificate da agenti patogeni o corti peptidi con una sequenza corrispondente a quella di uno o più epitopi B di un antigene naturale ottenuti per sintesi chimica o via DNA ricombinante.

Con il termine antigene si intende una molecola capace di indurre la formazione di anticorpi specifici (immunogenica) e di reagire con essi (antigenica).

Sono antigeni naturali microorganismi, cellule e loro prodotti solubili.

Generalmente l'immunizzazione contro infezioni causate da agenti patogeni (virus, parassiti e batteri) è ottenuta inoculando in un individuo un vaccino contenente un antigene (i) naturale (microorganismi attenuati o uccisi o loro prodotti opportunamente trattati) che stimola la produzione di anticorpi in grado di neutralizzare

l'antigene stesso. L'uso di detti vaccini tradizionali presenta, tuttavia, numerosi inconvenienti derivanti sia dalla limitata disponibilità del materiale antigenico naturale che dal pericolo di eventuali infezioni durante la manipolazione di detto materiale patogeno.

Inoltre, questi vaccini richiedono condizioni di preparazione e di mantenimento (basse temperature) che possono costituire un enorme problema, soprattutto, in paesi sottosviluppati.

Per tutte queste ragioni vi è oggi un crescente interesse per lo sviluppo di vaccini sintetici che contengono, non il patogeno intero o suoi prodotti immunogenici, ma corti frammenti peptidici che riproducono segmenti dell'antigene naturale detti epitopi o determinanti o siti antigenici.

La preparazione di un tale vaccino richiede quindi l'individuazione e la selezione dei peptidi da impiegare.

E' noto che la risposta immunitaria verso un agente estraneo ad un organismo implica la cooperazione di diversi tipi di cellule: cellule che presentano l'antigene (Antigen Presenting Cells o APC), linfociti di tipo B (produttori di anticorpi e in grado di funzionare come APC), linfociti di

tipo T -adiuvante (T-helper o Th) e linfociti di tipo T-citotossici responsabili dell'uccisione diretta delle cellule infettate dal patogeno.

L'immunità può essere di tipo umorale (mediata dagli anticorpi prodotti dalle cellule B) o di tipo cellulare.

Per quanto riguarda l'immunità di tipo umorale, il requisito minimo per l'instaurazione di una risposta immunitaria efficace è dato dal riconoscimento da parte sia dei linfociti B di un determinante antigenico della sostanza estranea (epitopo B) sia dei linfociti T di un determinante, generalmente diverso da quello B, della sostanza stessa (epitopo T).

Pertanto un vaccino sintetico efficace dovrebbe contenere almeno due sequenze peptidiche corrispondenti, rispettivamente, all'epitopo B e a quello T.

Mentre l'individuazione dell'epitopo o epitopi B contenuti in un antigene naturale è facilitata dalla possibilità di utilizzare anticorpi naturali anti-patogeno come reattivi, la localizzazione degli epitopi T presenta problemi molto complessi.

Infatti, nel primo caso si tratta di una

interazione diretta fra l'anticorpo anti-patogeno e l'antigene, mentre nel secondo caso l'attivazione del clone cellulare T specifico per un epitopo dell'antigene avviene solo dopo che questo è stato interiorizzato da una APC, processato mediante proteolisi o denaturazione o entrambe in corti frammenti peptidici, e quindi riesteriorizzato sulla superficie dell'APC in associazione con una molecola di membrana della cellula di classe II (per i Th) codificata da un gene del Maggior Complesso di Istocompatibilità (MHC). Il recettore del linfocita Th riconosce dunque non l'antigene libero ma il complesso formato da un suo frammento e da una parte della molecola di classe II di MHC.

Queste molecole sono raggruppate in tre famiglie DR, DP e DQ per l'uomo (HLA) e IA e IE per il topo e sono estremamente polimorfe.

Il polimorfismo è dovuto ad un gran numero di alleli per ciascuno dei geni che codificano per questa molecola e questa diversità permette un gran numero di combinazioni in un cromosoma (aplotipo).

Pertanto è molto difficile trovare individui non legati da parentela che presentino un MHC

identico.

Proprio per il fatto che solo alcuni dei peptidi derivati dalla degradazione dell'antigene siano in grado di associarsi ad un antigene di istocompatibilità dell'ospite fa sì che il corredo genetico dell'ospite, che codifica per detti antigeni, restringa di fatto il numero dei peptidi in grado di formare con essi un complesso che è un requisito indispensabile per l'attivazione dei linfociti Th.

Si parla dunque di "restrizione genetica" degli epitopi T nel senso che detti frammenti peptidici sono ristretti nell'interazione con il recettore dei linfociti T dalle proteine alle quali sono associati. Da ciò la difficoltà di individuare all'interno di un antigene naturale l'epitopo o epitopi T con una restrizione genetica assente o minima adatti per lo sviluppo di vaccini acellulari sintetici con una efficacia ampia, capaci cioè di indurre una immunizzazione protettiva contro l'agente patogeno di interesse in individui con corredi genetici MHC diversi.

Fino ad ora tale difficoltà è stata superata molto spesso utilizzando come fonte di epitopi T una macromolecola, detta anche carrier, alla quale

veniva legato covalentemente un aptene naturale o sintetico, peptidico o polisaccaridico derivato da un agente patogeno di interesse.

Esempi di carriers adatti a tale scopo sono il tossoide tetanico (TT), il tossoide difterico (CRM), la sieralbumina e l'emocianina di lampreda (KLH) in quanto conferiscono al coniugato risultante una restrizione genetica minima.

Coniugati comprendenti detti carriers, noti anche con il termine di carriers universali, sono capaci di funzionare da attivatori di cloni cellulari T in individui dotati di corredi genetici molto diversi tra loro.

Infatti, la maggior parte degli animali utilizzati per i saggi in vivo e aventi corredi genetici differenti sono in grado di attivare una risposta anticorpale verso l'antigene del coniugato sono cioè "responder".

Anche se questo approccio al problema si è dimostrato efficace, l'uso di coniugati carrier macromolecolare-aptene in un processo di immunizzazione contro un agente patogeno presenta ancora numerosi inconvenienti derivanti dalla difficoltà di standardizzare i vari stadi di preparazione, dalla possibile alterazione delle

proprietà antigeniche dell'aptene come conseguenza della reazione di coniugazione (J.P. Briand et al., J. Immunol. Methods, 78 (1985) 59-69) e infine dal fenomeno noto come "soppressione epitopica indotta dal carrier" che causa la soppressione della produzione di anticorpi anti-aptene in un individuo già immunizzato con il solo carrier (H. Etlinger et al., (1988), J.Immunol., 140, 626).

Questo fenomeno viene osservato nei casi in cui il carrier utilizzato è una proteina alla quale l'ospite è già stato esposto come, ad esempio, il tossoide tetanico impiegato per la vaccinazione anti-tetanica.

Inoltre, l'utilizzo di sequenze peptidiche corte come immunogeni, anche nel caso in cui queste comprendono sia un epitopo B che un epitopo T dell'antigene naturale, ha generalmente condotto ad una risposta immunitaria molto più ristretta geneticamente, cioè ad una riduzione del numero di animali e/o di individui "responder" (si veda ad esempio A.R. Togna et al., J. Immunol., 137 (1986) 2956-2960; G. Del Giudice et al., J. Immunol. 137, (1986), 2962-2955; G. Del Giudice et al., Immunology 63, (1988) 187-191).

In conclusione l'immunogenicità di un determinato epitopo dipende da tre fattori: la generazione dell'appropriato frammento, la presenza di una molecola MHC che lega questo frammento e la presenza di cellule T capaci di riconoscere il complesso formatosi. L'assenza di uno di questi fattori può risultare nella mancanza di una risposta immunitaria. La maggior parte degli esperimenti condotti su topo indicano che l'assenza di una risposta immunitaria è dovuta principalmente alla mancanza di una appropriata molecola MHC. Infatti dette molecole sono altamente polimorfe ed è stato mostrato che un certo peptide può legarsi solo ad una o, comunque, a pochi alleli, ma mai a tutti (Babbitt et al., (1985), *Nature* 317, 359; Burns et al., (1987), *Science* 235, 1353). Inoltre vi sono casi in cui non vi è risposta immunitaria in quanto l'antigene non è processato in modo appropriato.

E' stato ora trovato sorprendentemente che frammenti della tossina tetanica corrispondenti ai residui amminoacidici 947-967, originalmente definito come epitopo DR5-ristretto, e 947-960 sono riconosciuti dai cloni T cellulari isolati da differenti donatori immunizzati con il tossoide

tetanico in associazione con un largo numero di molecole di classe II. Pertanto detti frammenti, che soddisfano completamente i requisiti di immunogenicità, appaiono essere epitopi universalmente immunogenici nell'uomo.

Costituiscono quindi uno scopo della presente invenzione peptidi sintetici aventi una sequenza amminoacidica corrispondente ai residui amminoacidici 947-967 e 947-960 della tossina tetanica utili come carriers universali per la preparazione di coniugati immunogenici.

Costituiscono ancora uno scopo della presente invenzione coniugati immunogenici costituiti da un carrier peptidico universale covalentemente legato ad un aptene naturale o sintetico, peptidico o polisaccaridico derivato da un agente patogeno di interesse in cui detto peptide carrier ha la sequenza amminoacidica corrispondente ai residui amminoacidici 947-967 o 947-960 della tossina tetanica.

Costituisce un ulteriore scopo della presente invenzione l'uso di detti coniugati immunogenici per la preparazione di vaccini sintetici con una ampia efficacia e protettivi contro agenti patogeni di interesse.

Costituiscono inoltre uno scopo della presente invenzione vaccini sintetici per l'immunizzazione in individui provvisti di corredi genetici MHC differenti contro infezioni causate da un agente patogeno caratterizzati dal fatto di contenere una quantità immunologicamente efficace dei suddetti coniugati immunogenici.

Ulteriori scopi della presente invenzione appariranno evidenti dalla lettura del testo e dagli esempi che seguono.

In particolare, i peptidi sintetici 947-967 e 947-960 secondo la presente invenzione sono rappresentabili, rispettivamente, mediante le seguenti sequenze amminoacidiche:

- Phe-Asn-Asn-Phe-Thr-Val-Ser-Phe-Trp-Leu-Arg-Val-Pro-Lys-Val-Ser-Ala-Ser-His-Leu-Glu;
- Phe-Asn-Asn-Phe-Thr-Val-Ser-Phe-Trp-Leu-Arg-Val-Pro-Lys.

In accordo con la presente invenzione la sintesi dei suddetti peptidi può essere condotta in fase solida o in fase omogenea operando secondo una delle tecniche generali note.

Preferibilmente la sintesi è condotta in fase solida impiegando una resina poliacrilammidica commerciale, l'acido 4-idrossimetilfenossiacetico

come gancio di connessione reversibile peptide-resina e il gruppo Fluorenil-metossicarbonile (Fmoc) come gruppo protettore dell'N-terminale dei residui amminoacidici secondo la strategia riportata nell'esempio 1.

I gruppi funzionali reattivi in catena laterale dei residui amminoacidici sono protetti utilizzando gruppi protettori scelti fra quelli generalmente impiegati per la sintesi di peptidi.

Preferibilmente vengono utilizzati il gruppo trifluoroacetile (TFA) per la Lisina (Lys), l'etere tert-butilico (Bu^t) per la Serina (Ser) e Treonina (Thr), il gruppo t-butilossicarbonile (Boc) per l'Istidina, l'estere tert-butilico (OBu^t) per l'acido Glutammico (Glu) e il gruppo 4-metossi-2,3,6 trimetilbenzensolfonile (Mtr) per l'Arginina (Arg).

Gli amminoacidi, opportunamente protetti, sono condensati singolarmente come anidridi simmetriche o esteri di pentafluorofenolo e/o p-nitrofenolo e/o 3,4-diidro-3-idrossi-4-ossobenzotriazina.

La rimozione dei peptidi dalla resina è condotta, in accordo con la presente invenzione, impiegando una soluzione acquosa di acido trifluoroacetico a temperatura ambiente (20-25°C) e per il tempo

necessario a rimuovere contemporaneamente i gruppi protettori del tipo t-butilico ma non il TFA e l'Mtr.

Questa strategia consente l'ottenimento di peptidi in cui l'unico ammino gruppo libero disponibile per una sua successiva coniugazione con un aptene, è quello N-terminale (Phe). I peptidi così sintetizzati possono essere purificati mediante cromatografia per filtrazione su gel secondo tecniche usuali.

In accordo con la presente invenzione è stata saggiata la capacità del peptide 947-967, qui di seguito indicato TT3, di stimolare la proliferazione di cloni cellulari T umani in presenza di APC dotate di diverso corredo di molecole HLA di classe II.

E' stato osservato che cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC), isolate da differenti individui (HLA tipizzati) immunizzati con il tossoide tetanico, rispondevano in vitro al peptide TT3. Questi risultati suggerivano che detto peptide poteva associarsi a molte differenti molecole MHC di classe II. Allo scopo di confermare i risultati ottenuti, è stato condotto un saggio di proliferazione utilizzando le stesse

cellule PBMC in assenza del peptide.

L'assenza di crescita cellulare confermava che il peptide era riconosciuto in associazione a numerosi alleli delle molecole di classe II.

Allo scopo di determinare l'isotipo dei cloni T cellulari, cioè quale delle tre molecole DR, DP o DQ di classe II dell'MHC era utilizzata come elemento di restrizione, sono stati condotti dei saggi di proliferazione impiegando anticorpi monoclonali (Mab's) anti-DR, anti-DP e anti-DQ. La reazione di proliferazione è stata effettuata in presenza delle cellule EBV-B autologhe e del peptide TT3.

E' stato così trovato che sia i Mab anti-DR sia quelli anti-DP inibivano fortemente la proliferazione dei suddetti cloni.

Ciò indicava che le molecole DP e DR erano gli elementi di restrizione per i cloni T cellulari specifici per TT3.

Detto peptide era riconosciuto in associazione a differenti molecole DR (5, 6, 7 e 9) e DP (2 e 4). Pertanto il peptide TT3 è universalmente immunogenico.

In accordo con la presente invenzione, allo scopo di determinare se i cloni T cellulari

ristretti dalle differenti molecole DR e DP riconoscevano differenti determinanti sul peptide TT3, sono stati condotti saggi di proliferazione impiegando frammenti di questo privi di una porzione N-terminale o C-terminale. I risultati ottenuti mostrano chiaramente che TT3 contiene almeno 2 epitopi: uno (953-967) riconosciuto dai cloni T cellulari DR ristretti, e l'altro (947-960) dai cloni T cellulari ristretti per tutti gli altri alleli DR e DP.

Pertanto anche il peptide corrispondente alla sequenza amminoacidica 947-960 può essere utilizzato come carrier universale.

L'identificazione dei peptidi secondo la presente invenzione è di fondamentale importanza per lo sviluppo di vaccini sintetici.

In particolare i peptidi secondo la presente invenzione sono adatti come carriers universali per la preparazione di coniugati immunogenici peptide-aptene.

Essi infatti combinano in sé i vantaggi dovuti all'intera sequenza del tossoide tetanico, cioè la capacità di indurre la formazione di anticorpi anti-aptene nella maggior parte degli individui vaccinati, con quelli connessi alla loro piccola

dimensione (nessuna soppressione epitopica e controllo più efficace delle reazioni di coniugazione con l'aptene).

Esempi di apteni che possono essere legati al carrier peptidico per la preparazione di coniugati immunogenici secondo la presente invenzione sono: peptidi o polisaccaridi derivati da differenti agenti patogeni quali, ad esempio, meningococchi, pneumococchi, Haemophilus influenzae, B-hemolytic streptococchi ed Escherichia coli.

Apteni adatti per gli scopi della presente invenzione sono anche peptidi sintetici aventi la sequenza corrispondente a quella di uno o più epitopi B di un antigene naturale.

La coniugazione fra un peptide carrier secondo la presente invenzione e un aptene può essere effettuata impiegando una delle tecniche convenzionali utilizzate generalmente in questo particolare settore della tecnica.

In particolare, la coniugazione può essere condotta impiegando come agente legante la glutaraldeide come riportato, ad esempio, da Avremas e Ternynck (Immunochemistry, 6, 53, 1969).

Secondo una forma di attuazione della presente invenzione il peptide TT3 è stato impiegato

come carrier universale per migliorare l'immunogenicità di peptidi sintetici con una sequenza amminoacidica corrispondente a quella dell'epitopo B immunodominante della Proteina Circumsporozotica (CSP) di Plasmodium falciparum che è l'agente eziologico della forma più grave di malaria (Terzana maligna) nell'uomo.

Detti peptidi sintetici, aventi la sequenza amminoacidica $H-(Asn-Ala-Asn-Pro)_n-OH$ (NANP)_n dove n assume un valore da 3 a 40, non erano infatti in grado di indurre una risposta anticorpale anti-CSP in topi CBA e DBA/2 (topi non responder) (G. Del Giudice et al., J. Immunol., 137, 2952-2965 (1986)).

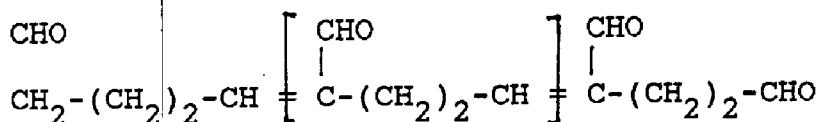
Era stato infatti dimostrato che il (NANP)_n conteneva nella sua sequenza uno o più epitopi T tutti ristretti geneticamente dall'allele $I-A^b$ del complesso di istocompatibilità murino H-2 presente solo in topi C57 BL/6.

Detti peptidi sono stati preparati, come descritto nella domanda di brevetto italiana No 21718 A/85, mediante polimerizzazione del monomero attivato $HCl.H-Asn-Ala-Asn-Pro-OPCP$ in presenza di trietilammmina come iniziatore basico.

In accordo con la presente invenzione i

coniugati peptide carrier-(NANP)_n sono stati ottenuti per reazione dei gruppi aldeidici della glutaraldeide con l'ammino gruppo terminale dell'Asparagina (Asn) di (NANP)_n e con l'ammino gruppo terminale del peptide carrier.

La reazione di coniugazione è stata eseguita in due stadi. Nel primo stadio il (NANP)_n è stato lasciato reagire in tampone fosfato (pH 7.4) con un eccesso di glutaraldeide (OHCCH₂CH₂CH₂CHO), in condizioni di neutralità ottenendo, per autocondensazione aldolica, il polimero con funzioni aldeidiche:



che sembra essere l'effettivo agente di coniugazione.

Al termine della reazione di coniugazione il prodotto risultante (NANP)_n-glutaraldeide è stato purificato per gel filtrazione dalla glutaraldeide non reagita.

Nel secondo stadio il coniugato (NANP)_n-glutaraldeide è stato posto a reagire in tampone fosfato (pH 7.4) o in Dimetilsolfossido (DMSO) con un eccesso molare del peptide carrier (da 2.5 a 25) rispetto al coniugato (NANP)_n-glutaraldeide

sfruttando così la presenza dei gruppi aldeidici ancora liberi sulla glutaraldeide coniugata al $(\text{NANP})_n$ per l'attacco dell'ammino gruppo terminale del carrier.

La reazione è stata condotta a temperatura ambiente ($20-25^\circ\text{C}$), sotto agitazione, per 3 giorni ottenendo una soluzione giallina.

A detta soluzione può essere addizionata una sostanza riducente, quale, ad esempio, NaBH_4 che, riducendo i legami (basi di Schiff) tra i gruppi amminici dei peptidi ed i gruppi aldeidici della glutaraldeide, stabilizza i legami presenti nel coniugato.

Preferibilmente secondo la presente invenzione è stato utilizzato il NaBH_4 per avere un ulteriore margine di sicurezza sulla stabilità del legame tra i due peptidi.

La reazione di riduzione è stata condotta a temperatura ambiente per circa due ore e al termine il precipitato formatosi è stato solubilizzato portando il pH a valori acidi.

La soluzione così ottenuta è stata purificata per gel filtrazione eluendo con acido acetico 0.1 M per separare il coniugato formatosi dal peptide carrier in eccesso.

Si è proceduto quindi allo sblocco dei gruppi protettori delle funzioni amminiche in catena laterale dei residui amminoacidici del peptide carrier impiegando una delle tecniche convenzionali.

In accordo con la presente invenzione il gruppo protettore 4-metossi-2,3,6 trimetilbenzensolfonile dell'Arginina del peptide TT3 è stato rimosso mediante trattamento del coniugato con una soluzione acido trifluoroacetico/fenolo (95:5, v/p), mentre il gruppo trifluoroacetile della Lisina del peptide TT3 è stato sbloccato per trattamento con una soluzione acquosa basica.

I coniugati sono stati quindi purificati mediante liofilizzazione e cromatografia.

In accordo con la presente invenzione l'immunogenicità di detti coniugati è stata verificata mediante un saggio di stimolazione della proliferazione in vitro di linfociti T umani specifici per il peptide carrier in presenza di linee cellulari B autologhe come APC.

Inoltre è stata determinata la capacità di detti coniugati di indurre la produzione di anticorpi anti-(NANP)_n in topi non responder al (NANP)_n.

I risultati di proliferazione hanno dimostrato sia

che la lunga sequenza $(\text{NANP})_n$ non influenzava la capacità del peptide carrier di funzionare come epitopo T sia che la reazione di coniugazione non aveva alterato la struttura di detto epitopo T.

I dati di immunizzazione in vivo (topi) mostravano, inoltre, l'assenza di una restrizione genetica e di una soppressione epitopica del carrier.

Infatti i topi non responder al $(\text{NANP})_n$ erano in grado di produrre un titolo elevato di anticorpi anti-NANP.

Come riportato prima detti peptidi carriers vengono riconosciuti nell'ambito degli elementi di restrizione umani DR e DP, poichè vi è una notevole sovrapposizione fra gli elementi di restrizione del complesso di istocompatibilità umano (HLA) e quello murino (H-2), gli esperimenti condotti nel topo possono essere considerati validi ed i risultati possono essere estrapolati all'uomo.

In conclusione i peptidi sintetici secondo la presente invenzione sono particolarmente adatti come carriers universali per la preparazione di coniugati immunogenici peptide carrier-aptene capaci di indurre una immunità protettiva e non ristretta geneticamente o con una restrizione

genetica ridotta contro differenti agenti patogeni.

Detti coniugati possono essere somministrati all'uomo in un'unica dose o in dosi successive sotto forma di composizioni farmaceutiche (vaccini) che li contengono in una forma ed in quantità adatti ad indurre una risposta immune protettiva. Preferite sono le composizioni farmaceutiche preparate come sospensioni o soluzioni contenenti il coniugato facilmente somministrabile per iniezione.

Se desiderato dette composizioni possono essere addizionate con un adiuvante per migliorarne la risposta immunitaria.

Gli esempi sperimentali che seguono sono illustrativi e non limitativi per l'invenzione stessa.

Esempio 1

Sintesi del peptide TT3

La sintesi del peptide TT3 è stata eseguita in fase solida con un sintetizzatore automatico a flusso Biolynx 4070 (Pharmacia, LKB) utilizzando una resina poliacrilammidica commerciale (Ultrosyn, Pharmacia, LKB) funzionalizzata con Norleucina, come amminoacido di riferimento interno, e l'acido 4-idrossimetilfenossiacetico come gancio

di connessione reversibile peptide-resina.

1 g di detta resina con una funzionalizzazione di 0,1 milliequivalenti/g è stata posta in una colonna di vetro (10x1 cm, Omnifit) e fatta rigonfiare pompando N,N dimetilformammide (DMF) per 30 minuti al flusso di 4 ml/minuto; tale flusso è stato mantenuto costante per tutte le operazioni successive.

Il primo residuo amminoacidico (Glu) protetto all'alfa-ammino gruppo con il gruppo protettore Fluorenilmetossicarbonile (Fmoc) e al carbossile in gamma con il gruppo t-butile estere, è stato esterificato alla resina mediante reazione dell'anidride simmetrica dell'amminoacido in presenza del catalizzatore 4-dimetilamminopiridina (DMAP).

In pratica 0,256 g (0,3 mmoli) di (Fmoc-Glu)-(OBu^t)₂O sono stati sciolti in 2 ml di DMF in presenza di 0,004 g (0,03 mmoli) di DMAP e 0,033 ml (0,3 mmoli) di N-metilmorfolina (NMM) e fatti reagire con la resina per 30 minuti.

Al termine della reazione di esterificazione, la resina è stata lavata con DMF (pompata in colonna per 10 minuti), poi con una soluzione di Piperidina in DMF (2:8, V/V) per 10 minuti e infine con

DMF per 10 minuti.

Quindi alla miscela di reazione è stata aggiunta la soluzione (2 ml) di DMF contenente l'amminoacido successivo attivato al gruppo carbossilico e protetto al gruppo alfa amminico e, eventualmente, al gruppo reattivo in catena laterale, dando luogo alla reazione di acilazione sui gruppi $-NH_2$ liberi della catena peptidica in crescita.

Le funzioni in catena laterale degli amminoacidi sono state protette rispettivamente con t-butil-estere (OBu^t) per l'acido Glutammico, t-butiletere (Bu^t) per la Serina e Treonina, 4-metossi-2,3,6-trimetilbenzensolfonile (Mtr) per l'Arginina, t-butilossicarbonile (Boc) per l'Istidina e trifluoroacetile (TFA) per la Lisina.

Fra una reazione di acilazione e la successiva sono state effettuate le operazioni di lavaggio e di rimozione del gruppo Fmoc come sopra riportato. La reazione di acilazione è stata condotta a temperatura ambiente per 60 minuti (sistema posto in ricircolo).

Tutti i residui amminoacidici, tranne l'Arginina (Arg), la Serina (Ser) e la Treonina (Thr), sono stati introdotti utilizzando come forma attiva i corrispondenti esteri di pentafluorofenolo (Pfp)

(0,3 mmoli in 2 ml di DMF) in presenza di 0,041 g (0,3 mmoli) di 1-idrossibenzotriazolo (HOBt).

Per Arg, Ser e Thr sono stati utilizzati gli esteri di 3,4-diidro-3-idrossi-4-ossobenzotriazina (DhBt) (0,3 mmoli in 2 ml di DMF).

Gli esteri sono stati disciolti in DMF immediatamente prima dell'aggiunta alla resina deprotetta, secondo una procedura automatica del sintetizzatore.

Per ciascuna reazione di acilazione, il completamento della reazione è stato verificato mediante il saggio della ninidrina (E. Kaiser et al., Anal. Biochem., 34, (198), 595) e il saggio dell'acido trinitrobenzosolfonico (W.S. Hancock et al., Anal. Biochem., 71, (1976), 261).

I campioni, prelevati dopo 30 minuti di reazione hanno dato risultati positivi (assenza di amminogruppi liberi sulla resina).

All'analisi amminoacidica la resina-peptide ha dato i seguenti risultati:

Phe, 2.70 (3); Asn, 1.82 (2); Thr, 0.80 (1); Ser, 2.70 (3); Val, 2.57 (3); Trp, n.d. (1); Arg, 0.89 (1); Lys, 1.10 (1); Ala, 1.00 (1); His, 0.94 (1); Leu, 2.79 (3); Glu, 1.21 (1).

Tra parentesi sono riportati i valori teorici.

Una parte del peptide TT3 è stata conservata sulla resina per eventuali sintesi di peptidi legati a TT3, mentre la restante parte è stata sbloccata per trattamento a temperatura ambiente per 2 ore con la soluzione di acido trifluoroacetico (TFA)/H₂O (90/1, v/p).

Detta soluzione permette la rimozione dei gruppi protettori t-butilestere, t-butiletere e Boc ma non quella dei gruppi trifluoroacetile e 4-metossi-2,3,6 trimetilbenzensolfonile.

Tale strategia ha consentito di ottenere il peptide in cui l'unico ammino gruppo utile per la sua coniugazione con un aptene è quello terminale della fenilalanina (Phe). (La reattività dell'anello imidazolico dell'istidina verso la gluteraldeide è molto minore).

La purificazione del peptide TT3 così ottenuto è stata quindi effettuata per cromatografia per filtrazione su gel.

La cromatografia su gel è stata condotta impiegando una colonna 85 x 2.6 cm con riempimento Sephadex G-15 e usando come eluente una soluzione di acido acetico 0.1 M.

L'analisi amminoacidica del peptide purificato ha dato i seguenti risultati:

Phe, 2.69 (3); Asn, 1.90 (2); Thr, 0.89 (1); Ser, 2.60 (3); Val, 2.88 (3); Trp, n.d. (1); Arg, 0.88 (1); Lys, 1.05 (1); Ala, 1.00 (1); His, 0.97 (1); Leu, 2.75 (3); Glu, 1.10 (1).

Esempio 2

Isolamento di cloni cellulari specifici per il peptide TT3.

Cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC) isolate da differenti donatori (HLA-tipizzati) immunizzati con il tossoide tetanico, sono state coltivate ad una concentrazione di 7×10^5 in 200 μ l di terreno RPMI-HS (RPMI= RPMI1640 supplementato con 2mM di glutammina, 1% di amminoacidi non essenziali, 1% di sodio piruvato, 50 μ g/ml di kanamicina (Flow, Irvine, Scotland); HS= siero umano (Swiss Red Cross, Berna) in presenza (10 μ M) o in assenza del peptide TT3 in micropiastre da 96 pozzetti a fondo piatto. Dopo 6 giorni in ciascun pozzetto sono stati aggiunti 30 Unità/ml di Interleuchina-2 (IL-2) (Roche, Nutley, NJ) e, dopo altri 4 giorni, le colture sono state esaminate per verificare l'eventuale proliferazione cellulare. Le colture positive sono state poi espanse nello stesso terreno addizionato con IL-2 e saggiate per la loro capacità a riconoscere il

peptide TT3. Una aliquota di dette cellule T è stata trasferita in pozzetti di micropiastre da 96 pozzetti a fondo rotondo, lavate tre volte e risospese in 200 μ l di terreno RPMI addizionato con 10% di siero fetale di vitello (FCS) (Gibco, Paisley, Scotland) in presenza (20 μ M) o assenza del peptide TT3. Poiché le cellule T umane attivate esprimono molecole di classe II, esse sono capaci di presentare il peptide l'una all'altra, risultando in una visibile agglutinazione dopo 6 ore a 37°C. Le colture positive sono state clonate mediante diluizione limite e i cloni specifici per il peptide sono stati isolati e mantenuti in coltura mediante periodica ristimolazione con PBMC allojeniche irradiate e fitoemagglutina (1%) (Gibco) come descritto da Lanzavecchia et al., (1988), *Nature* 334, 530. Solo un clone specifico era conservato da ogni coltura positiva.

Come riportato in tabella I, i cloni specifici per TT3 eran facilmente isolati da tutti i donatori indipendentemente dal loro tipo DR. La frequenza approssimativa delle cellule specifiche per il TT3 era da 1 in 3×10^4 a 1 in 3×10^5 e rappresentava solo il 5% o meno di tutte le cellule T specifiche per il Tossoido Tetanico (TT).

TABELLA I

Donatori (DR) (a)	Cloni isolati	Restrizione indipendente (b)
K (3,5)	9	DR5
G (5)	3	DR5
2G (1,5)	3	DR5
1G (5)	1	DR5
M (2,9)	4	DR9
S (7)	4	DR7
3G (3,7)	3	DR7
4 (5,6)	4	DR5
1B (4,6)	2	DP2
F (1,8)	4	DP2
A (6)	8	DP4
1P (2,3)	2	DP?
5 (3)	2	DR5JVM/DP4
T (2)	1	---
10 (1,7)	3	
7 (3)	1	
9 (2,4)	1	
12 (3,6)	5	

dove:

(a): PBMC da diversi donatori DR tipizzati erano stimulate con il peptide e i cloni specifici erano isolati e caratterizzati per la restrizione.

(b) indica tutti gli alleli di classe II di MHC che possono presentare il peptide ad almeno un clone T cellulare.

Tutti i cloni isolati proliferano in risposta sia al peptide TT3 che alla molecola intera del Tossoido Tetanico presentati da cellule APC autologhe, dimostrando che essi sono effettivamente specifici per TT.

Questi risultati indicano che TT3 è universalmente riconosciuto dopo immunizzazione con TT e quindi è in grado di associarsi a diverse molecole di classe II.

Esempio 3

Caratterizzazione dei cloni T cellulari specifici per TT3.

A) Saggio di proliferazione cellulare in presenza di APC dotate di diverso corredo di molecole HLA di classe II.

Le colture sono state condotte in 200 μ l di terreno RPMI-FCS in micropiastre a fondo piatto. 3×10^4 cellule T sono state coltivate con 2×10^4 cellule EBV-B come APC irradiate (6000 R) o 10^5 PBMC irradiati (3500 R). Il Tossoido Tetanico o il peptide TT3 sono stati aggiunti alle colture o impiegati per pulsare le cellule EBV-B. Dopo 2

giorni a 37°C, in presenza di 5% di CO₂, le cellule sono state pulstate con 1 µCi ³H-timidina (Amersham, Spec. attività 5 Ci/mM). La radioattività incorporata dalle cellule è stata determinata dopo 16 ore mediante scintillazione liquida. I risultati, espressi come media di conte per minuto (cpm) di una coltura in doppio, hanno mostrato che tutti i cloni isolati proliferavano in risposta al peptide specifico così come alla molecola intera del Tossoido Tetanico presentati dalle cellule APC autologhe, dimostrando che essi erano specifici per il TT.

Questi risultati indicano inoltre che il peptide TT3 è universalmente riconosciuto dopo immunizzazione con TT e quindi questo peptide deve essere capace di associarsi ad una varietà di molecole di classe II.

B) Determinazione del pattern di restrizione delle cellule T.

Per determinare l'isotipo delle molecole di classe II riconosciute da ciascun clone T cellulare sono stati condotti dei saggi di proliferazione utilizzando anticorpi monoclonali anti-DR, anti-DP e anti-DQ ottenuti rispettivamente dall'ibridoma ATCC L243 disponibile presso l'American Type

Culture Center, e SVPL3 (anti-DQ) e B7.21 (anti-DP) forniti dal Dr. Hergen Spits e Roberto Accolla. Inoltre per identificare gli alleli di restrizione, ciascun clone è stato saggiato per la sua capacità a proliferare in risposta ad un gruppo di cellule EPBV-B HLA-omozigoti che sono state pulsate o non con il peptide TT3.

Le cellule T sono state coltivate con cellule EBV-B autologhe in presenza di concentrazioni limitanti del TT3 e di anticorpi monoclonali anti-DR (L243, 1:4 del supernatante della coltura), anti-DQ o anti-DP entrambi come 1:1000 asciti. Per identificare gli alleli di restrizione DR o DP sono state utilizzate come APC un gruppo di cellule EBV-B allogeniche HLA-omozigoti. Le cellule sono state pulsate per 2 ore a 37°C con il peptide TT3 o con il mezzo di coltura da solo, lavate 4 volte e irradiate.

I risultati ottenuti mostrano che i cloni specifici per il TT3 sono o DR o DP ristretti (Tabelle I e II). Almeno 4 distinti DR (DR5, 5JVM, 7 e 9) e 3 differenti alleli DP (DP2.1, DP2.2 e DP2.4) possono presentare il peptide TT3 alle cellule T. Tali risultati indicano che il TT3 può legare diverse forme allotipiche e isotipiche di molecole

della classe II.

TABELLA II

Riconoscimento di TT3 in associazione con diversi alleli DR e DP.

	Cloni DP			Cloni DR			
	ristretti			ristretti			
	(cpm x 10 ⁻³)			(cpm x 10 ⁻³)			
APC (a)	AS1	1BS	FS2	KS21	SS2	MS3	5S3
<u>QBL</u>							
(DRw18(3),DP2)	4	128	72	0	0	0	0
<u>JVM</u>							
(DRw11JVM85),DP2)	0	46	25	0	0	0	99
<u>ATH</u>							
(Drw11(5),DP2)	0	33	39	270	0	0	0
<u>HHK</u>							
(DRw13(6),DP4)	72	1	1	0	0	0	0
<u>DKB</u>							
(DR9,DP4)	40	0	0	0	0	12	0
<u>PITOUT</u>							
(DR7,DPn.t)	61	0	0	0	128	0	0

dove:

(a) tipizzazione DR e DP delle APC

Esempio 4

Identificazione della sequenza minima antigenica
riconosciuta dalle cellule T.

Allo scopo di verificare se i cloni T cellulari ristretti da differenti molecole riconoscono la stessa regione o regioni diverse del peptide TT3 in associazione con differenti molecole di classe II, sono stati condotti dei saggi di proliferazione utilizzando una serie di frammenti di delezione del peptide TT3 privi dalla regione N-terminale o C-terminale.

I risultati di proliferazione sono riportati nella tabella III.

TABELLA III

Risposta proliferativa di cloni cellulari

Cloni T cellulari (b)		Peptidi (a)					
APC(DR/DP)		A	B	C	D	E	F
4S5;KRA(DR6)	(c)	8(.08)	0	0	0	0	nd
3GS1;PITOUT(DR7)		9(.01)	0	0	0	0	67(2)
MS3;DKB(DR9)		29(5)	0	0	0	0	18(10)
KS21;ATH(DR5)	nd	nd	nd	309(.04)	0	0	0
FS2;QBL(DP2)	94(.01)	118(.04)	0	0	0	0	76(.05)
AS11;AVL(DP4)	181(.01)	86(5)	0	0	0	0	83(.05)

Dove:

(a)= i peptidi di delezione del TT3 aventi le seguenti sequenze amminoacidiche:

A (947-967): Phe-Asn-Asn-Phe-Thr-Val-Ser-Phe-Trp-
-Leu-Arg-Val-Pro-Lys-Val-Ser-Ala-Ser-His-Leu-Glu;

B (949-967): Asn-Phe-Thr-Val-Ser-Phe-Trp-Leu-Arg-
-Val-Pro-Lys-Val-Ser-Ala-Ser-His-Leu-Glu;

C (951-967): Thr-Val-Ser-Phe-Trp-Leu-Arg-Val-Pro-
-Lys-Val-Ser-Ala-Ser-His-Leu-Glu;

D (953-967): Ser-Phe-Trp-Leu-Arg-Val-Pro-Lys-Val-
-Ser-Ala-Ser-His-Leu-Glu;

E (955-967): Trp-Leu-Arg-Val-Pro-Lys-Val-Ser-Ala-
-Ser-His-Leu-Glu;

F (947-960): Phe-Asn-Asn-Phe-Thr-Val-Ser-Phe-Trp-
-Leu-Arg-Val-Pro-Lys;

(b)= indica il tipo DR o DP delle cellule APC.

(c)= indica la concentrazione in micromoli del peptide richiesta per indurre il 30% della risposta massima.

I risultati mostrano chiaramente che TT3 contiene almeno 2 epitopi dei quali, uno (953-967) è riconosciuto dai cloni DR5 ristretti, e l'altro (947-960) è riconosciuto dai cloni ristretti a tutti gli altri alleli DR e DP.

Esempio 5.

A) Produzione di anticorpi anti-TT3.

Gruppi di tre topi per ogni ceppo (C57BL/6, CBA e DBA/2) sono stati immunizzati con 50 µg del

peptide TT3 in 50 μ l di adiuvante completo di Freund (CFA) alla base della coda. I topi C57BL/6 risultano naturalmente "responder" al (NANP)₄₀, mentre i topi CB4/ca e DBA/2 risultano "non responder".

Dopo 15 giorni il loro siero è stato prelevato e testato individualmente mediante saggio ELISA (Fig. 1)

Solo i topi C57BL/6 avevano prodotto anticorpi anti-TT3 il cui titolo aumentava dopo boosting (Fig. 2).

L'uso di CFA non era indispensabile per ottenere un alto titolo anticorpale in topi C57BL/6 immunizzati con il peptide TT3. Gli stessi valori erano infatti ottenuti immunizzando in parallelo un gruppo di topi con 50 μ g di TT3 in 50 μ l di adiuvante incompleto di Freund (IFA) (Fig. 3).

B) Risposta proliferativa al TT3 e suoi frammenti di delezione.

Gruppi di tre topi per ogni ceppo (C57BL/6, CBA e DBA/2) sono stati immunizzati alla base della coda con 50 μ g di TT3 in 50 μ l di CFA.

Dopo 5 e 10 giorni sono stati asportati i linfonodi (LN) inguinali e paraaortici e le sospensioni delle cellule linfonodali dei singoli topi sono

state coltivate con diverse concentrazione di TT3. Tutti i topi testati hanno mostrato un buona risposta proliferativa di cellule T verso il peptide TT3 (Fig. 4).

Lo stesso saggio è stato condotto utilizzando al posto del TT3 i seguenti peptidi:

TT3 (947-967);

TT178C (949-967);

TT178B (951-967);

TT178A (953-967);

TT160 (955-967);

TT200 (947-960).

I risultati riportati in Tabella IV mostrano che i differenti ceppi di topi riconoscono un frammento simile sul peptide.

Tabella IV

Risposta proliferativa al TT3 e suoi analoghi

		C57BL/6	DBA/2	CBA
TT3	947-967	+	+	+
TT178C	949-967	+	+	+
TT178B	951-967	+	+	+
TT178A	953-967	+	-	-
TT160	955-967	-	-	-
TT200	947-960	-	-	-
Esempio 6				

Sintesi dei coniugati TT3-(NANP)_n.A) Preparazione del coniugato TT3-(NANP)₄₀.

40 mg di (NANP)₄₀ sono stati sciolti in 2.5 ml di soluzione tampone fosfato a pH 7.44 e quindi trasferiti in un reattore di 3 ml di volume contenente 52 µl (260 meq) di soluzione acquosa al 5% di glutaraldeide (Fluka) che corrisponde ad un eccesso rispetto a (NANP)₄₀ di 100 volte.

La miscela di reazione è stata mantenuta sotto blanda agitazione a temperatura ambiente per una notte.

Al termine la soluzione è stata cromatografata su una colonna 85 x 2.5 cm. con riempimento Sephadex G-25 eluendo con acido acetico 0.1 M.

Sono state quindi raccolte e liofilizzate le frazioni relative al picco che eluisce con il volume vuoto della colonna corrispondente a (NANP)₄₀ legato alla glutaraldeide.

In un reattore con una capacità di 3 ml contenente 88 mg (0.0375 mmoli) di TT3 sono stati aggiunti 2.5 ml di Dimetilsolfossido (DMSO) contenente il (NANP)₄₀-glutaraldeide. L'eccesso molare di TT3 rispetto al (NANP)₄₀-glutaraldeide era di circa 15 volte.

La soluzione giallina così ottenuta è stata

lasciata sotto agitazione per 3 giorni. Al termine della reazione sono stati aggiunti 25 μg di riducente NaBH_4 .

La soluzione risultante è stata mantenuta sotto agitazione per altre due ore ottenendo un precipitato in sospensione.

Tale precipitato è stato sciolto portando il valore del pH a circa 4.0 mediante aggiunta di acido acetico 1M.

La soluzione è stata quindi purificata mediante gel filtrazione su Sephadex G-25 eluendo con acido acetico 0.1 M allo scopo di separare il coniugato risultante dal TT3 in eccesso.

La resa della reazione di coniugazione, calcolata mediante analisi amminoacidica, è risultata del 70%.

Il gruppo protettore TFA della Lisina è stato rimosso per trattamento con una soluzione acquosa di Piperidina (1 M), a temperatura ambiente ($20-25^\circ\text{C}$) per 2 ore. La soluzione così ottenuta è stata portata a pH 4 con acido acetico diluito e poi nuovamente caricata in colonna Sephadex G-25 ed eluita come sopra riportato.

Dopo liofilizzazione della frazione corrispondente al coniugato, il gruppo protettore (Mtr)

dell'arginina del peptide TT3 è stato rimosso per trattamento con 5 ml di soluzione TFA/fenolo (95.5, v/p) per 5 ore.

La soluzione è stata portata a secco sotto vuoto e il residuo ottenuto è stato sciolto in 5 ml di H_2O , trasferito in un imbuto separatore da 25 ml ed estratto due volte con etere etilico.

La fase eterica è stata riestratta con acqua e le fasi acquose recuperate sono state combinate e liofilizzate.

Analogamente sono stati preparati i coniugati TT3-Tyr(NANP)₃NA (0.0085 mmoli, 20 mg di TT3 più 0.0085 mmoli (13.3 mg) di Tyr(NANP)₃NA, resa del 50%) e TT3-(NANP)₂₀ (88 mg di TT3, 0.0375 mmoli, più 20 mg (0.0025 moli) di (NANP)₂₀, resa del 73%).

Esempio 7

Uso del coniugato TT3-Tyr(NANP)₃NA per la produzione in vivo di anticorpi anti-NANP

Gruppi di tre topi CBA (H2-K) e Balb/c (H2-d) sono stati immunizzati con 50 µg del coniugato TT3-Tyr(NANP)₃NA in 50 µl di CFA e dopo 2 settimane sono stati nuovamente immunizzati con la stessa dose in IFA. I risultati dei saggi ELISA condotti su differenti diluizioni del siero prelevato da

ciascun topo sono riportati in Fig. 5 .

Gruppi di controllo sono stati immunizzati in parallelo con Tyr(NANP)₃NA polimerizzato mediante gluteraldeide (Figura 6).

I risultati mostrano che il peptide TT3 è riconosciuto da diversi DR umani e da diversi Ia murini nei quali può essere usato come carrier di un epitopo B.

* * * *

Rivendicazioni

1. Peptidi sintetici utili come carriers universali per la preparazione di coniugati immunogenici caratterizzati dalla sequenza amminoacidica:
 - a) Phe-Asn-Asn-Phe-Thr-Val-Ser-Phe-Trp-Leu-Arg-Val-Pro-Lys-Val-Ser-Ala-Ser-His-Leu-Glu; o
 - b) Phe-Asn-Asn-Phe-Thr-Val-Ser-Phe-Trp-Leu-Arg-Val-Pro-Lys.
2. Coniugato immunogenico costituito da un carrier peptidico sintetico covalentemente legato ad un aptene naturale o sintetico peptidico o polisaccaridico derivato da un agente patogeno di interesse dove detto carrier peptidico ha la sequenza amminoacidica:

ciascun topo sono riportati in Fig. 5 .

Gruppi di controllo sono stati immunizzati in parallelo con Tyr(NANP)₃NA polimerizzato mediante gluteraldeide (Figura 6).

I risultati mostrano che il peptide TT3 è riconosciuto da diversi DR umani e da diversi Ia murini nei quali può essere usato come carrier di un epitopo B.

* * * *

Rivendicazioni

1. Peptidi sintetici utili come carriers universali per la preparazione di coniugati immunogenici caratterizzati dalla sequenza amminoacidica:
 - a) Phe-Asn-Asn-Phe-Thr-Val-Ser-Phe-Trp-Leu-Arg-Val-Pro-Lys-Val-Ser-Ala-Ser-His-Leu-Glu; o
 - b) Phe-Asn-Asn-Phe-Thr-Val-Ser-Phe-Trp-Leu-Arg-Val-Pro-Lys.
2. Coniugato immunogenico costituito da un carrier peptidico sintetico covalentemente legato ad un aptene naturale o sintetico peptidico o polisaccaridico derivato da un agente patogeno di interesse dove detto carrier peptidico ha la sequenza amminoacidica:

- a) Phe-Asn-Asn-Phe-Thr-Val-Ser-Phe-Trp-Leu-Arg-Val-Pro-Lys-Val-Ser-Ala-Ser-His-Leu-Glu; o
- b) Phe-Asn-Asn-Phe-Thr-Val-Ser-Phe-Trp-Leu-Arg-Val-Pro-Lys.
3. Coniugato immunogenico in accordo alla rivendicazione 2, in cui l'aptene è derivato da virus o batteri.
4. Coniugato immunogenico in accordo alla rivendicazione 3, in cui l'aptene è una molecola polisaccaridica derivata da pneumococchi, meningococchi, Haemophilus influenzae, Escherichia coli, B-hemolytic streptococchi.
5. Coniugato immunogenico in accordo alla rivendicazione 2, in cui l'aptene è il peptide sintetico di sequenza:
- $$\text{H- (Asn-Ala-Asn-Pro)}_n\text{-OH}$$
- dove n assume un valore compreso tra 3 e 40.
6. Coniugato immunogenico in accordo alla rivendicazione 2, utile per la preparazione di vaccini sintetici capaci di indurre una risposta anticorpale protettiva contro un agente patogeno di interesse non ristretta geneticamente o con una restrizione genetica ridotta.
7. Coniugato immunogenico in accordo alla

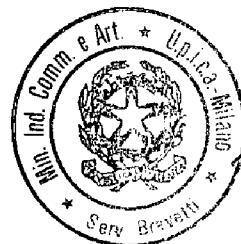
rivendicazione 5, utile per la preparazione di un vaccino antimalaria capace di indurre una risposta anticorpale protettiva e non ristretta geneticamente o con una restrizione genetica ridotta contro Plasmodium falciparum.

8. Vaccino sintetico capace di indurre nell'uomo una risposta anticorpale protettiva verso un agente patogeno non ristretta geneticamente o con una restrizione genetica ridotta che comprende (a) una quantità immunologicamente efficace del coniugato in accordo alla rivendicazione 2, (b) un mezzo fisiologicamente accettabile e (c) eventualmente un adiuvante.
9. Vaccino sintetico antimalaria capace di indurre nell'uomo una risposta anticorpale protettiva verso il Plasmodium falciparum non ristretta geneticamente o con una restrizione genetica ridotta che comprende una quantità immunologicamente efficace del coniugato in accordo alla rivendicazione 5.

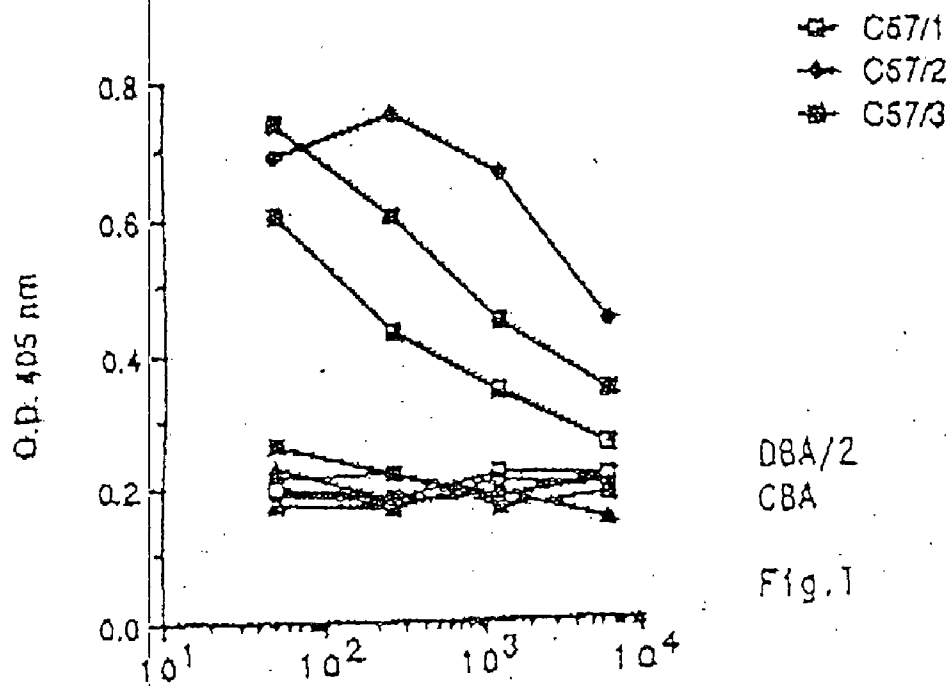
Il mandatario Dott. CIONI Carlo

Carlo Cioni

10 NOV. 1989



2235 5A/89



DBA/2
CBA

Fig. 1

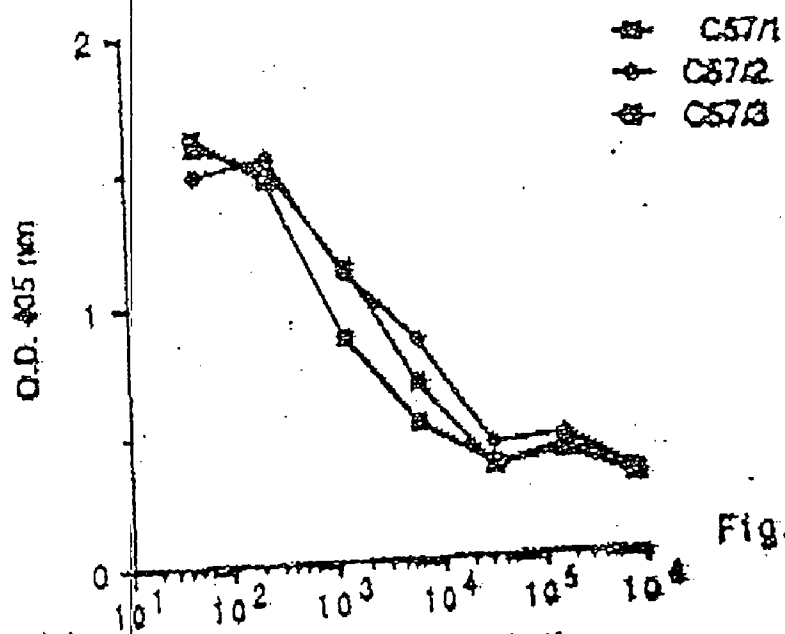
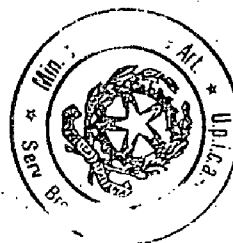
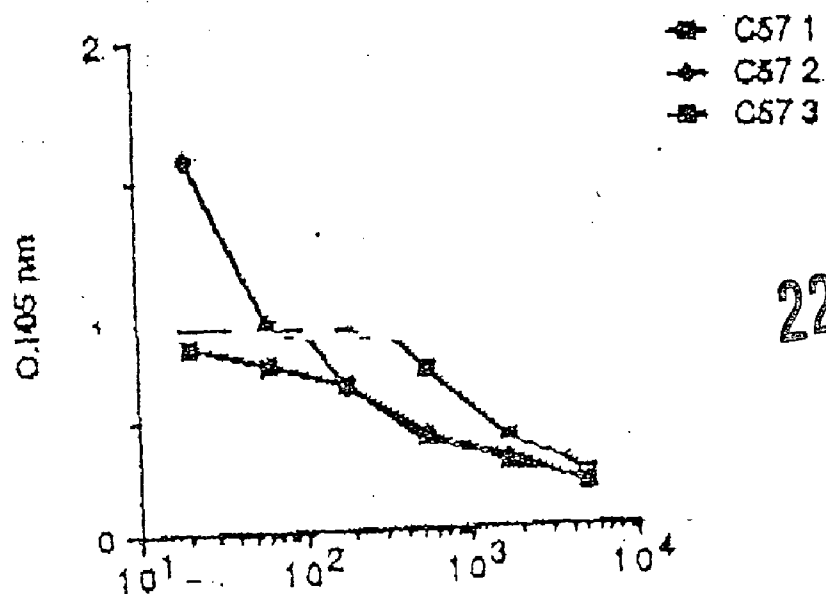


Fig. 2



Handwritten signature



2235 5A/89

FIG. 3

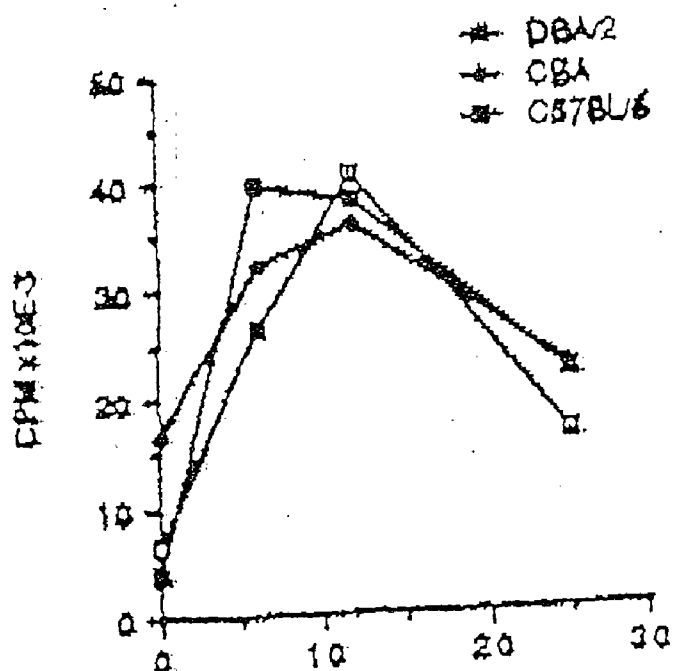
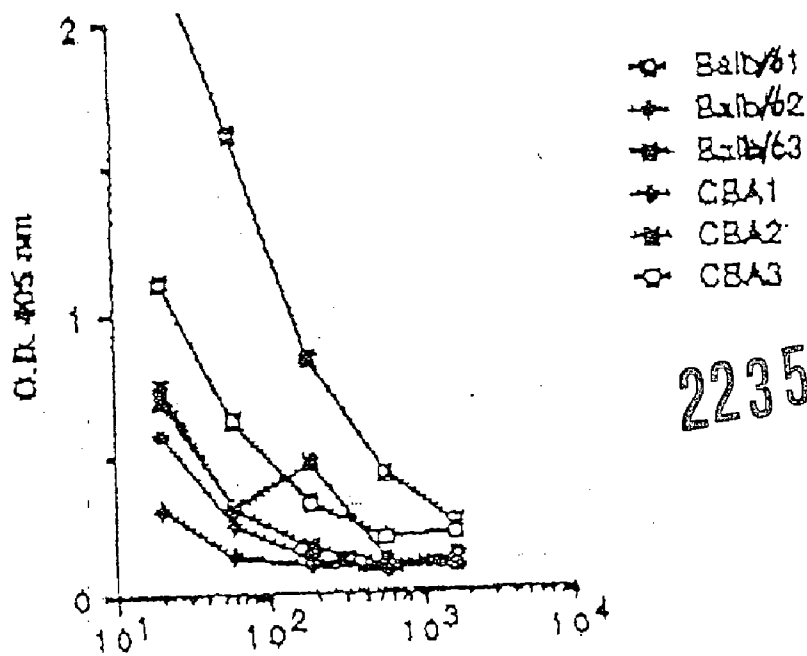


FIG. 4



cc



2235 5A/89

FIG. 5

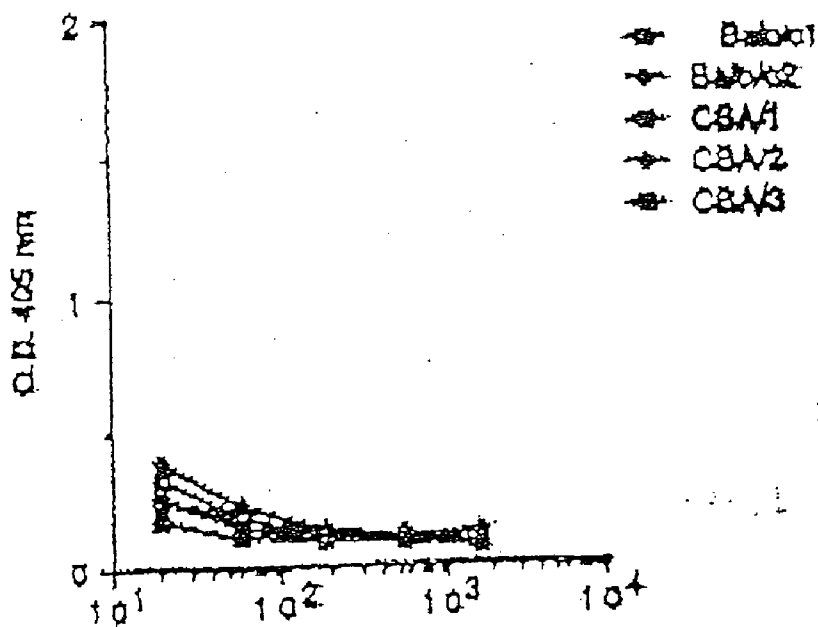


FIG. 6



Curat