



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA NUMERO	102007901560481
Data Deposito	01/10/2007
Data Pubblicazione	01/04/2009

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
G	01	N		

Titolo

METODO DIAGNOSTICO E PROGNOSTICO PER LA DIAGNOSI E LA PROGNOSI DELLA LINFOPROLIFERAZIONE NELLE MALATTIE AUTOIMMUNI.

Classe Internazionale: A 61 B 005 / 0000

Descrizione del trovato avente per titolo:

"METODO DIAGNOSTICO E PROGNOTICO PER LA DIAGNOSI E
LA PROGNOTICI DELLA LINFOPROLIFERAZIONE NELLE
5 MALATTIE AUTOIMMUNI"

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI UDINE di nazionalità ita-
liana con sede legale in Via Palladio, 8 - 33100
UDINE.

dep. il al n.

10

* * * * *

CAMPO DI APPLICAZIONE

Il presente trovato si riferisce ad un metodo per
la diagnosi e la prognosi nelle malattie autoimmuni
che si basa sull'utilizzo del dosaggio della cito-
15 china B-Lymphocyte stimulator (BlyS) come marcatore
diagnostico e prognostico di linfoproliferazione
atipica/neoplastica.

STATO DELLA TECNICA

La citochina B-Lymphocyte stimulator (BlyS), co-
20 nosciuta anche come "B-cell activating factor of
the TNF family" (BAFF), è stata scoperta e caratte-
rizzata nel 1999 sulla base della sua omologia con
i membri della superfamiglia del tumor necrosis
factor (TNF) (Schneider P, et al. J Exp Med.
25 1999;189(11):1747-56 e Nardelli B, et al. Blood.

Il mandatario
STEFANO LIGI
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.R.L.
P.le Cavendish, 6/2 - 33100 UDINE

2001;97(1):198-204).

BlyS gioca un ruolo molto importante nella risposta immunitaria essendo ormai annoverato tra i fattori chiave nella regolazione dello sviluppo e della differenziazione B cellulare (Mackay F, Browning
5 JL. Nat Rev Immunol 2002;2:465-75 e Batten M, et al. J Exp Med 2000;192(10):1453-66).

BlyS viene sintetizzato, espresso come proteina di membrana e rilasciato in forma solubile primariamente da cellule della linea mieloide come monociti, macrofagi, neutrofili, cellule dendritiche
10 (Huard B, et al. Int Immunol 2004;16:467-475 e Nardelli B, et al. Blood. 2001;97(1):198-204).

Recentemente la serie dei tipi cellulari capaci di produrre la citochina si è ulteriormente ampliata, annoverando anche cellule non-mieloidi, come le cellule dello stroma midollare (Gorelik L, et al. J
15 Exp Med 2003;198:937-945), i sinoviociti (Ohata J, et al. J Immunol 2005;174(2):864-70), gli astrociti
20 (Markus Krumbholz, et al. J Exp Med. 2005;201(2):195-200), l'epitelio ghiandolare salivare (Ittah M, Miceli-Richard C, Eric Gottenberg J, et al. Arthritis Res Ther. 2006;8(2):R51) e
l'epitelio intestinale (Xu W, He B, Chiu A et al.
25 Nature Immunol 2007;8(3):294-303).

BLYS esercita la sua funzione attraverso l'interazione con 3 recettori, il più importante dei quali, BAFF receptor (BAFFR), è espresso in maniera peculiare dai linfociti B (Ng LG, et al. J Immunol. 2004;173(2):807-17). Il legame tra BLYS e BAFFR induce l'incremento dell'espressione del fattore anti-apoptotico per eccellenza, Bcl2, favorendo la sopravvivenza cellulare (Craxton A, et al. J Exp Med. 2005;202(10):1363-74).

10 BLYS presenta un'elevata omologia con un altro membro della superfamiglia del TNF chiamato APRIL (A Proliferation Inducing Ligand) (Hahne M, et al. J Exp Med 1998;188:1185-1190) che condivide con BLYS gli altri suoi 2 recettori denominati TACI
15 (transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin ligand) e BCMA (B cell maturation antigen) (Thompson JS, Schneider P, Kalled SL, et al. J Exp Med. 2002;192(1):129-35 e Seshasayee D, Valdez P, Yan M, et al. Immunity 2003;18(2):279-88).

20 L'importanza di BlyS nell'omeostasi B cellulare è stata messa in luce dagli studi sui modelli murini.

Nei topi knock-out per BlyS, cioè ove è stata spenta l'espressione di BLYS, si osserva una profonda alterazione del pool dei linfociti B maturi
25 (Gross JA, et al. Immunity 2001;15:289-302), mentre

i topi che iperesprimono BlyS (BlyS transgenic mice) sviluppano molte caratteristiche tipiche delle malattie autoimmuni.

Tra queste si riscontrano spleno - e linfadenomegalia, elevati livelli serici di autoanticorpi (fattore reumatoide, anti-DNA), infiltrazione B cellulare delle ghiandole parotidi con sovvertimento dell'architettura ghiandolare e perdita della funzione secretrice, come si riscontra in corso di sindrome di Sjögren (SS), alterazioni renali che ricordano molto la glomerulonefrite tipica del Lupus Eritematoso Sistemico (LES) ed infine una franca neoplasia B cellulare (Mackay F, et al J Exp Med. 1999;190(11):1697-710 e Thien M, et al. Immunity. 2004;20(6):785-98).

Le evidenze sperimentali dimostrano pertanto che a livelli fisiologici BlyS promuove la sopravvivenza e la differenziazione B cellulare (Mackay F, Browning JL. Nat Rev Immunol 2002;2:465-75), ma, in concentrazioni troppo elevate, permette la sopravvivenza e la proliferazione di linfociti B autoreattivi, che normalmente verrebbero soppressi dal sistema immunitario (Thien M, et al. Immunity. 2004;20(6):785-98).

In accordo con tali evidenze sperimentali, negli

ultimi anni, sono stati descritti elevati livelli serici e tissutali di BLYS in numerose malattie autoimmuni.

Tra queste malattie autoimmuni vi sono la sindrome di Sjögren (SS), l'artrite reumatoide (AR), il lupus eritematoso sistemico (LES), la sclerosi sistemica (SSc), la sclerosi multipla (SM), la granulomatosi di Wegener (Stohl W. B Curr Rheumatol Rep 2002;4(4):345-50, Seyler TM, et al. J Clin Invest. 2005;115(11):3083-92, Mariette X, et al. Ann Rheum Dis. 2003;62(2):168-71, Matsushita T, et al. Arthritis Rheum. 2006;54(1):192-201, M. Thangarajh, et al, J Neuroimmunol 2004;152:183-190 e M. Krumholz, et al, J Autoimmun 2005;25:298-302).

In generale, nelle suddette malattie autoimmuni, i livelli serici e tissutali di BLYS sono correlati con il titolo autoanticorpale e la presenza ed il livello di infiltrazione linfocitaria nei tessuti sede di flogosi (membrana sinoviale, ghiandole salivari) e, in particolare, la formazione di centri germinativi ectopici, sono correlati con la presenza di BLYS ed APRIL (Jonsson MV, et al. J Clin Immunol 2005;25:189-201, Szodoray P, Jonsson R. Scand J Immunol 2005;62:421-428 e Szodoray P, et al. Clin Immunol 2005;17:168-176).

Le malattie autoimmuni in generale presentano un più elevato rischio di sviluppare neoplasie linfatiche rispetto alla popolazione generale.

5 Alla base di questo aumentato rischio ci sono diversi fattori, sia genetici, che acquisiti (trattamenti terapeutici) (Quartuccio L, et al. Haematologica 2006;91(5):691-4).

10 In particolare, tra le malattie autoimmuni sono note tre diverse patologie caratterizzate da una risposta autoimmune responsabile di sintomi sistemici e da un aumentato rischio di sviluppare un linfoma, la sindrome crioglobulinemica (SC), la sindrome di Sjögren (SS) e la celiachia.

15 La sindrome di Sjögren è un'esocrinopatia autoimmune (Fox RI, Kang HI. Rheum Dis Clin North Am 1992; 18: 517-38) che colpisce soprattutto le ghiandole salivari e lacrimali, la cui etiologia è ancora ignota, anche se, viste le forti analogie e spesso la sovrapposizione con la sindrome crioglobulinemica, si ipotizza un trigger iniziale di tipo infettivo.

25 Nella celiachia, gli anticorpi a-tTG rappresentano un fondamentale aspetto, sia dal punto di vista patogenetico, che soprattutto diagnostico (Dietrich W, et al. Nat Med 1997;3:797-801 e Tonutti E,

et al. J Clin Pathol 2003;56:389-93).

Classicamente, la malattia celiaca attiva è caratterizzata da sintomi intestinali e/o extraintestinali e da una netta positività degli a-tTG.

5 Istologicamente, si nota un marcato infiltrato T linfocitario della mucosa duodeno-digiunale, associato alle tipiche alterazioni morfologiche: iperplasia delle cripte e atrofia dei villi.

La biopsia duodeno-digiunale è considerata il
10 gold standard per la diagnosi, ma nella pratica esistono alcuni problemi, di ordine sia analitico, che pre-analitico.

La malattia celiaca si associa frequentemente ad altre malattie autoimmuni, in particolare il diabete mellito di tipo I e la tiroidite di Hashimoto,
15 ma frequenti sono anche le segnalazioni di sindrome di Sjögren.

Le neoplasie linfatiche rappresentano una delle maggiori complicanze della malattia celiaca.

20 Tra queste, il linfoma T intestinale è certamente il più frequente e temibile, ma sono descritti anche linfomi di tipo B (Celier C, et al. Lancet 2000;356;203-8).

Il linfoma si sviluppa per stadi a partire da un
25 infiltrato linfocitario intraepiteliale reattivo

attraverso una proliferazione a basso grado indolente, fino alla trasformazione in linfoma ad alto grado che è causa di un persistente malassorbimento anche dopo introduzione di dieta priva di glutine e
5 terapie immunosoppressive (Cerf-Bensussan N, et al. Gut 2002;51:304-5).

La sindrome crioglobulinemica (Ferri C, et al. J Clin Pathos 2002;55:4-13) e la celiachia (Rodrigo L. World J Gastroenterol 2006;12(41):6585-6593)
10 rappresentano due modelli molto importanti per lo studio dei meccanismi che conducono allo sviluppo di autoimmunità, in quanto nella crioglobulinemia è ben noto il ruolo molto frequente dell'infezione da virus dell'epatite C (HCV) nell'innescare la risposta anticorpale fattore reumatoide (FR positiva)
15 responsabile dalla formazione delle crioglobuline e della vasculite, mentre nella celiachia è stato ampiamente dimostrato che l'alterata risposta al glutine si associa a un ben preciso assetto genetico,
20 l'HLA DQ2 e 8.

Le più recenti evidenze tuttavia suggeriscono che un'infezione virale, precisamente da Rotavirus (Troncone R, Auricchio S. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2007;44(5):527-8), potrebbe giocare un ruolo
25 importante anche nella patogenesi della malattia

Il mandatario
STEFANO LIGI
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
P.le Cavallotti, 6/2 - 33100 UDINE

celiaca.

Ulteriormente, la produzione autocrina di BLYS è stata recentemente dimostrata da parte di linfociti B neoplastici in corso di alcune fra le più frequenti malattie linfoproliferative (linfoma di Hodgkin e non-Hodgkin, leucemia linfatica cronica, mieloma multiplo, macroglobulinemia di Waldenstrom) (Chiu A, et al. Blood. 2007;109(2):729-39, J. Novak, et al., Blood 2004;104:2247-2253, Kern C, et al. Blood 2004;103(2):679-88, Mackay F, Tangye SG. Curr Opin Pharmacol. 2004;4(4):347-54, Moreaux J, et al. Blood 2004;103(8):3148-57).

Al momento attuale il monitoraggio del rischio di evoluzione neoplastica nelle malattie sopra elencate viene effettuato clinicamente mediante l'esame fisico del paziente al fine di evidenziare i principali segni e sintomi di neoplasia linfatica (linfadenomegalia, splenomegalia, febbre, prurito, dimagrimento, astenia, tumefazione parotidea persistente in caso di SS), oppure mediante esami radiologici (ecografia, TC) coadiuvati o meno da prelievo bioptico ed esame istologico.

In corso di malattia celiaca il sospetto di evoluzione linfomatosa nasce nei casi di sintomatologia intestinale persistente e ingravescente pur in

Il mandatario

STEFANO FIGI

(per sé e per gli altri)

STUDIO GLP S.A.I.

P.le Cavedalis, 6/2 - 33100 UDINE

presenza di dieta priva di glutine, ma la conferma diagnostica spesso è tardiva a causa della difficoltà di ottenere un sicuro riscontro bioptico.

La possibilità di eradicare il tumore in questi
5 casi è molto ridotta, sia per il ritardo diagnostico sia perchè si tratta di forme molto aggressive, che poco rispondono alle terapie attualmente disponibili.

Mancano allo stato della tecnica attuale dei mar-
10 catori utili nel monitoraggio del rischio di neoplasia linfatica nelle malattie autoimmuni.

Inoltre sono ancora largamente ignoti i trigger (virali, batterici, ambientali in genere) responsabili dell'innesco del processo autoimmunitario e i
15 fattori che ne favoriscono la perpetuazione fino alla cronicità della malattia conclamata.

Uno scopo del presente trovato è quello di mettere a punto un metodo diagnostico e prognostico per la diagnosi e la prognosi di linfoproliferazione
20 atipica/neoplastica delle malattie autoimmuni che superi i limiti di cui alla tecnica nota.

Ulteriore scopo del presente trovato è utilizzare il dosaggio della citochina BLYS come metodo per il monitoraggio dell'insorgenza di linfoproliferazione
25 neoplastica in corso di malattia autoimmune.

Altro scopo del presente trovato è utilizzare il dosaggio della citochina BLYS come metodo per il monitoraggio dell'aderenza alla terapia (es: dieta senza glutine nella celiachia) e dell'efficacia della terapia nelle malattie autoimmuni.

Ancora un altro scopo è di utilizzare il dosaggio della citochina BLYS come metodo per confermare la diagnosi di malattia autoimmune in caso di situazioni suggestive e/o di dubbio e/o di predisposizione (infezioni microbiche, deficit immunologici, predisposizione genetica basata sui geni HLA).

Ancora un altro scopo è quello di utilizzare il dosaggio della citochina BLYS come metodo per la conferma diagnostica di malattie immuno-mediate di pertinenza trasfusionale (immunizzazione post-trasfusionale, incompatibilità materno-fetale, reazioni trasfusionali).

Ancora un altro scopo è quello di utilizzare il BLYS come marcatore per l'uso di un metodo di terapia innovativa in corso di linfoproliferazione neoplastica nelle malattie autoimmuni.

Ulteriore scopo del presente trovato è preparare una medicazione per l'uso in un metodo per il trattamento della linfoproliferazione neoplastica/atipica nelle malattie autoimmuni.

Ancora un altro scopo è preparare una composizione farmaceutica come medicazione per l'uso in un metodo per il trattamento della linfoproliferazione neoplastica/atipica nelle malattie autoimmuni.

5 Per ovviare agli inconvenienti della tecnica nota e per ottenere questi ed ulteriori scopi e vantaggi, la Richiedente ha studiato, sperimentato e realizzato il presente trovato.

ESPOSIZIONE DEL TROVATO

10 Il presente trovato è espresso e caratterizzato nelle rivendicazioni indipendenti.

Le relative rivendicazioni dipendenti espongono altre caratteristiche del presente trovato, o varianti dell'idea di soluzione principale.

15 In accordo con i suddetti scopi, un metodo di conferma per la diagnosi di linfoproliferazione atipica/neoplastica in corso di malattie autoimmuni in un paziente, comprende le seguenti fasi:

- una prima fase di prelievo di un campione di
20 sangue del paziente da cui estrarre il siero;

- una seconda fase di esame del campione di siero per la determinazione della concentrazione della citochina BlyS;

- una terza fase di confronto tra la concentrazione
25 della citochina BlyS determinata nella seconda fase

ed uno o più valori standard di concentrazione di citochina B-Lymphocyte stimulator (BlyS); vantaggiosamente tali valori sono compresi in un intervallo di valori di riferimento di BlyS precedentemente ottenuti su una serie di pazienti con la tale malattia autoimmune e diagnosi accertata di malattia linfoproliferativa;

5

- una quarta fase di individuazione di una deviazione significativa tra la concentrazione di citochina BlyS determinata nella seconda fase ed i valori di riferimento di concentrazione di citochina BlyS indicati nella terza fase;

10

- una quinta fase di attribuzione di una diagnosi della linfoproliferazione neoplastica/atipica in corso di malattie autoimmuni alla deviazione individuata nella quarta fase.

15

Il presente trovato trova vantaggiosa applicazione alla conferma diagnostica di linfoproliferazione neoplastica nel corso delle seguenti malattie:

20 - malattie autoimmuni sistemiche quali:

artrite reumatoide, lupus eritematoso sistemico, citopenie autoimmuni, sclerosi sistemica, sclerosi multipla, sclerodermia, sindrome di Sjögren, polidermatomiosite, sindrome crioglobulinemica, altre

25 vasculiti sistemiche; e

-malattie autoimmuni organo specifiche quali:
celiachia, morbo di Crohn, tiroidite di Hashimoto, diabete mellito di tipo I, morbo di Basedow, morbo di Addison, dermatiti bollose; e

5 -malattie immuno-mediate di pertinenza trasfusionale quali:

immunizzazione post-trasfusionale, incompatibilità materno-fetale, reazioni trasfusionali.

Il presente trovato impiega vantaggiosamente,
10 nella seconda fase, per l'analisi della concentrazione di BLYS nel siero dei pazienti, un'apparecchiatura automatizzata atta ad effettuare dosaggi immunoenzimatici (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA), di tipo comunemente presente
15 presso i maggiori laboratori di analisi ospedaliere, senza la necessità di sostanziali modifiche agli impianti od alle strutture organizzative dei reparti interessati.

Una variante del presente trovato prevede
20 l'integrazione del metodo con uno o più dei seguenti esami:

- esame fisico del paziente atto ad evidenziare i principali segni e sintomi di neoplasia linfatica;
- uno o più esami radiologici del paziente;
- 25 - esame istologico di un campione bioptico prele-

vato dal paziente.

Il presente trovato è diretto anche ad un metodo per il monitoraggio nel tempo dell'insorgenza di una linfoproliferazione neoplastica in corso di malattie autoimmuni in un paziente, che comprende le
5 seguenti fasi:

- una prima fase di prelievo di un campione di sangue dal paziente per l'ottenimento del siero;
- una seconda fase di esame del campione di siero
10 per la determinazione della concentrazione di citochina BlyS;
- una terza fase di confronto tra la concentrazione di citochina BlyS determinata nella seconda fase ed uno o più valori di concentrazione di BlyS
15 precedentemente rilevati nel paziente;
- una quarta fase di individuazione di un incremento significativo tra la concentrazione di citochina BlyS determinata nella seconda fase ed uno o più valori di concentrazione di BlyS precedentemen-
20 te rilevati nel paziente;
- una quinta fase di attribuzione di una diagnosi di evoluzione in una linfoproliferazione neoplastica/atipica in corso di malattie autoimmuni alla presenza di BlyS individuata nella quarta fase;
- 25 - una sesta fase di decisione di ripetizione nel

Il mandatario
STEFANO LIGI
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
P.le Cavedalis, 6/2 - 33100 UDINE

tempo, ad intervalli temporali predeterminati, delle fasi dalla prima fase alla quinta fase in base, in funzione dell'esito della diagnosi della quinta fase.

5 In tal caso si possono valutare, nel corso del tempo, l'efficacia della dieta nei celiaci, i marker di attivazione del sistema immunitario, la presenza di proliferazione clonale dei linfociti B nel sangue periferico o nel midollo dei pazienti, 10 esami fisici, radiologici o biotici sul paziente, o altro.

Ulteriormente, il presente trovato riguarda un metodo prognostico, ovvero di conferma diagnostica di malattie autoimmuni sistemiche e organo specifiche e di malattie immuno-mediate di pertinenza tra- 15 sfusionale nei pazienti che presentano sintomi clinici e/o esami fisici o biochimici suggestivi o in pazienti con le seguenti situazioni predisponenti: infezione microbica (virus epatitici, virus erpeti- 20 ci, clamidie, altro), deficit di IgA, predisposizione genetica associata ai geni HLA, che comprende le seguenti fasi:

-una prima fase di prelievo di un campione di sangue da uno dei pazienti selezionati per 25 l'ottenimento del siero;

- una seconda fase di esame del campione di siero per la determinazione della concentrazione di citochina BlyS;

5 - una terza fase di confronto tra la concentrazione di citochina BlyS determinata nella seconda fase ed il range di concentrazione di citochina BlyS riferita a una popolazione sana di controllo;

10 - una quarta fase di individuazione di un incremento significativo della concentrazione di citochina BlyS determinata nella seconda fase ed i valori di riferimento di concentrazione di citochina BlyS nella popolazione sana;

15 - una quinta fase di attribuzione di una prognosi di malattia autoimmune all'incremento di BlyS individuato nella quarta fase.

Inoltre, il presente trovato è relativo anche a presidi terapeutici (tra i quali sono preferiti gli anticorpi monoclonali anti-BlyS, antagonisti dei recettori del BlyS o delle vie di traduzione del
20 segnale intracellulare mediato dall'interazione tra il BlyS e i suoi recettori) per l'uso in un metodo per il trattamento ed il successivo monitoraggio della linfoproliferazione neoplastica/atipica in corso di malattie autoimmuni comprese in un gruppo
25 di malattie autoimmuni comprendente:

- malattie autoimmuni sistemiche quali:
artrite reumatoide, lupus eritematoso sistemico,
citopenie autoimmuni, sclerosi sistemica, sclerosi
multipla, sclerodermia, sindrome di Sjögren, poli-
5 dermatomiosite, sindrome crioglobulinemica, altre
vasculiti sistemiche;e
- malattie autoimmuni organo specifiche quali:
celiachia, morbo di Crohn, tiroidite di Hashimo-
to, diabete tipo I, morbo di Basedow, morbo di Ad-
10 dison, dermatiti bollose; e
- malattie immuno-mediate di pertinenza trasfu-
sionale (immunizzazione post-trasfusionale, incom-
patibilità materno-fetale, reazioni trasfusionali);
che comprende le seguenti fasi:
- 15 - una prima fase di prelievo di un campione di
sangue dal paziente per l'ottenimento del siero;
- una seconda fase di esame del campione di siero
per la determinazione della concentrazione di cito-
china BlyS;
- 20 - una terza fase di confronto tra la concentra-
zione di citochina BlyS determinata nella seconda
fase ed il range di concentrazione di citochina
BlyS in una popolazione sana di controllo oppure
con uno o più valori di concentrazione di citochina
25 BlyS precedentemente rilevati nel paziente;

- una quarta fase di individuazione di una deviazione significativa tra la concentrazione di citochina BlyS determinata nella seconda fase ed i valori di riferimento della concentrazione di citochina BlyS indicati nella terza fase;

- una quinta fase di decisione di utilizzare i presidi terapeutici anti-BLyS e/o di attribuzione di efficacia del trattamento terapeutico alla deviazione individuata nella quarta fase.

10 Il presente trovato permette di migliorare l'approccio diagnostico/prognostico, le possibilità di trattamento innovativo ed il monitoraggio terapeutico dei pazienti con malattie autoimmuni.

15 Il presente trovato è particolarmente efficace per la diagnosi, la prognosi e l'uso in un metodo per il trattamento della linfoproliferazione neoplastica in corso di crioglobulinemia mista, celiachia e sindrome di Sjögren.

ILLUSTRAZIONE DEI DISEGNI

20 Queste ed altre caratteristiche del presente trovato appariranno chiare dalla seguente descrizione di una forma preferenziale di realizzazione, fornita a titolo esemplificativo, non limitativo, con riferimento agli annessi disegni in cui:

25 - la fig. 1 è un grafico che mette a confronto la

percentuale di soggetti con livelli serici di BLYS sopra il limite di sensibilità del test ELISA (>0.85 ng/ml) nelle seguenti popolazioni di soggetti:

5 pazienti con sindrome crioglobulinemica (SC), soggetti HCV positivi senza SC, popolazione sana di controllo (healthy blood donors: HBDs). BLOQ: below the level of quantitation, sotto il limite

10 di sensibilità del test ELISA);

- la fig. 2 è un grafico che mette a confronto i livelli serici di BLYS nelle seguenti popolazioni di soggetti: pazienti con

15 sindrome crioglobulinemica (SC), soggetti HCV positivi senza SC, popolazione sana di controllo (healthy blood donors: HBDs). Il valore di 2.82 ng/ml è pari alla media + 2 deviazioni standard della distribuzione dei livelli serici

20 di BLYS nei soggetti HCV-positivi senza SC;

- la fig. 3 è un grafico che mette a confronto i livelli serici di BLYS nei pazienti celiaci rispetto alla popolazione sana di

25 controllo (HBDs) [Range di normalità:

<1.145 ng/ml, media+2SD];

- 5 - la fig. 4 è un grafico che dimostra la significativa correlazione tra la concentrazione di citochina B-Lymphocyte stimulator (BlyS) e la concentrazione di anticorpi a-tTG nei pazienti con celiachia;
- 10 - la fig. 5 è un grafico che mostra la significativa riduzione della concentrazione di citochina B-Lymphocyte stimulator (BlyS) a seguito di dieta senza glutine nei pazienti con celiachia (da 1.619 ± 0.410 ng/ml a 1.283 ± 0.310 ng/ml; * $p=0.0122$, Wilcoxon signed rank test).

DESCRIZIONE DI UNA FORMA PREFERENZIALE DI
15 REALIZZAZIONE

Il presente trovato prende per base quanto noto nella tecnica relativamente alla citochina B-Lymphocyte stimulator (BlyS) per mettere a punto un innovativo metodo diagnostico e prognostico per la
20 diagnosi e la prognosi della linfoproliferazione neoplastica/atipica nelle malattie autoimmuni, che utilizza il dosaggio, ovvero la determinazione della concentrazione, di BlyS serico.

In particolare, i risultati sperimentali che la
25 Richiedente ha ottenuto riguardo l'espressione e il

ruolo di BlyS in tre diverse patologie:

- la sindrome crioglobulinemica,
- la sindrome di Sjögren e
- la celiachia,

5 caratterizzate da una risposta autoimmune respon-
sabile di sintomi sistemici e da un aumentato ri-
schio di sviluppare un linfoma, hanno portato a i-
dentificare e proporre BlyS quale nuovo marker dia-
gnostico, prognostico e, come si vedrà in seguito,
10 bersaglio terapeutico in queste patologie autoimmu-
ni.

Inoltre, sulla base dei risultati ottenuti in
queste patologie, il presente trovato si può esten-
dere a tutti gli altri disordini autoimmuni dove
15 BlyS è già stato descritto (AR, LES, SSc, SM) o
verrà in futuro identificato.

Lo studio di BlyS nella sindrome crioglobulinemi-
ca ha permesso alla Richiedente, per la prima volta
dalla scoperta di questa citochina, di evidenziare
20 il probabile ruolo chiave nell'up-regolazione
dell'espressione di BlyS da parte dell'infezione da
virus dell'epatite C (HCV) e di ipotizzare che al-
tri virus, con meccanismi analoghi, possano produr-
re lo stesso effetto.

25 Tale effetto sembrerebbe principalmente mediato

dalla risposta antivirale endogena, ossia dall'interferone, che diversi lavori hanno dimostrato essere in vitro un potente induttore dell'espressione di BlyS.

5 Si è dimostrato che livelli serici di BlyS più elevati dell'intervallo di normalità (ottenuto dal dosaggio del BlyS su una popolazione di soggetti sani, donatori di sangue, comparabili per età e sesso ai pazienti in studio) caratterizzano più di
10 un terzo dei pazienti con sindrome crioglobulinemica, ma anche un terzo dei pazienti con infezione cronica da HCV senza crioglobulinemia (fig. 1).

In tale fig. 1, i pazienti con sindrome crioglobulinemica (SC) presentano una percentuale di soggetti con livelli serici di BlyS sopra il limite di
15 sensibilità del test ELISA (>0.85 ng/ml) utilizzato per la determinazione serica di BlyS (Human Genome Science, Rockville, USA) significativamente maggiore rispetto alla popolazione sana di controllo (healthy blood donors: HBDs) (*36.5% versus 4.2%;
20 OR=14.02; CI=3.13-62.91, $p<0.0001$), ma confrontabile con quella dei soggetti HCV positivi senza SC (30.3%), anch'essi significativamente superiori ai controlli (**30.3% versus 4.2%; OR=10; CI=2.021-
25 49.48, $p=0.0026$).

L'infezione da HCV sarebbe dunque in grado di indurre un'aumentata espressione di BlyS e contribuire, in un subset di soggetti predisposti, a sostenere la proliferazione B cellulare in senso autoimmune fino all'insorgenza della sindrome crioglobulinemica.

Lo sviluppo della sindrome coincide tuttavia con un ulteriore incremento dell'espressione di BlyS, visto che i valori serici di BLYS presenti nei pazienti con sindrome crioglobulinemica sono significativamente maggiori dei soggetti con sola infezione cronica da HCV (fig. 2).

In tale fig. 2, i pazienti con sindrome crioglobulinemica (SC) presentano livelli serici di BLYS significativamente più elevati rispetto ai soggetti HCV positivi senza SC (*p=0.0044).

Prendendo il valore di 2.82 ng/ml (dato dalla media + 2 deviazioni standard della distribuzione dei livelli serici di BLYS nei soggetti HCV-positivi senza SC) come il cut-off per definire il contributo dell'infezione da HCV all'incremento di BlyS serico nei pazienti con SC, 10/66 (15.2%) pazienti con SC presentavano livelli sopra questo cut-off e 2 di loro erano HCV-negativi (frecce).

Prendendo come base lo schema patogenetico propo-

sto da Ferri et al., il persistere del trigger antigenico, l'HCV, o di un altro stimolo antigenico ignoto nei pazienti HCV negativi, insieme all'autoreattività B-cellulare fattore reumatoide-positiva e agli elevati livelli di BlyS, con il suo potente effetto anti-apoptotico, favorirebbero ulteriori mutazioni geniche nei linfociti B espansi fino all'escape dal trigger iniziale e alla trasformazione neoplastica.

10 Nella popolazione dei 66 pazienti con SC analizzata dalla Richiedente, l'unica caratteristica clinica che ha mostrato una significativa associazione con i livelli più elevati di BlyS è la presenza del linfoma e/o di una linfoproliferazione atipica pre-
15 linfomatosa (si veda la seguente tabella 1).

Nella tabella 1 si rappresenta la associazione tra BlyS serico e presenza di linfoma non Hodgkin (NHL) o disordine linfoproliferativo atipico (LPD) nei pazienti con SC.

20 I pazienti con NHL/LPD presentano una percentuale di soggetti con livelli di BlyS molto elevati (>2.82 ng/ml) significativamente maggiore rispetto ai pazienti senza NHL/LPD (33.3% versus 9.8%; *OR=4.6; CI=1.12-18.96, p=0.04).

Tabella 1

Pazienti con SC	BLyS dosabile (>0.85ng/ml)	Elevato	
		BLyS (>2.82 ng/ml)	BLyS serico (media±ds)
Con NHL/LPD (15)	8/15 (53.3%)	5/15* (33.3%)	5.05±3.39 ng/ml
Con NHL/LPD (51)	17/51 (33.3%)	5/51* (9.8%)	3.06±2.62 ng/ml

In questi casi si può pensare che, come dimostrato in alcune neoplasie B cellulari (linfoma di Hodgkin e non Hodgkin, mieloma multiplo, leucemia linfatica cronica) e più recentemente anche nei
5 linfociti B infiltranti le ghiandole salivari dei pazienti con SS primaria (Daridon C et al. Arthritis Rheum 2007;56:1134-44), al rilascio di BlyS contribuiscano anche i cloni B neoplastici o pre-
10 linfomatosi, con un meccanismo di stimolazione autocrina.

Sulla base di questi risultati sulla SC, dove il

ruolo etiologico dell'HCV è ben noto, il riscontro di elevati livelli serici di BlyS anche in altri disordini autoimmuni come il LES, l'AR, la SS, rinforza l'ipotesi che anche in queste malattie vi sia un trigger iniziale infettivo, magari anche solo transiente.

Se si considera il modello largamente accettato che prevede una causa infettiva responsabile dell'innescò di autoimmunità e lifoproliferazione, i dati sulla SC identificano nell'infezione da HCV lo step iniziale dell'up-regolazione di BlyS e indicano BlyS quale importante fattore che lega l'infezione allo sviluppo di autoimmunità e linfoproliferazione, almeno in una parte di soggetti predisposti.

Tale predisposizione è determinata da molteplici fattori geneticamente determinati, che potrebbero riguardare l'espressione di BlyS e poi quella dei fattori che ne regolano la funzione.

La SS è una causa frequente di crioglobulinemia HCV negativa e può o meno sfociare in una vera e propria sindrome crioglobulinemica. Le sequenze geniche delle Ig utilizzate dai linfociti B espansi in corso di SS sono molto simili a quelle utilizzate dai cloni B in corso di SC HCV-relata (De Re V,

et al. Eur J Immunol 2002; 32:903-10). Ciò fa pensare che vi siano comuni vie patogenetiche. La SS è forse, fra tutti i disordini autoimmuni ove è stato studiato BlyS, quella in cui sono stati documentati i livelli più elevati e in una larga percentuale di pazienti (fino al 50%).

Lo studio integrato molecolare, biologico e clinico che la Richiedente ha effettuato su un caso di una paziente con SS HCV-negativa con associata SC che ha sviluppato, nel corso del follow-up, un linfoma B cellulare del tessuto linfoide della ghiandola parotidea, ha permesso di confermare il ruolo chiave di BlyS nelle varie tappe patogenetiche della malattia linfomatosa in corso di SS.

In questo modo La Richiedente è in grado di indicare BlyS come un nuovo potenziale target terapeutico, da aggredire in combinazione con gli altri trattamenti anti-linfocita B già in uso ma che non riescono ad essere sufficientemente efficaci (come il Rituximab, anticorpo monoclonale anti-CD20 che, tuttavia non è efficace per i fattori di espressione di linfocita B) per tentare di bloccare, non solo la linfoproliferazione B cellulare, ma anche l'epitelio salivare, che le recenti evidenze hanno dimostrato capace di produrre BlyS e contribuire a

ripristinare il pool B cellulare non appena svanito l'effetto delle terapie anti-B o immunosoppressive in genere (corticosteroidi).

Pertanto il dosaggio, ovvero la determinazione
5 della concentrazione, serico ed istologico sulla biopsia salivare di BlyS, accanto alle analisi molecolari per valutare l'espansione B clonale e radiologiche già previste in caso di tumefazione parotidea persistente, appaiono di grande importanza
10 nel follow-up dei pazienti con SS, per poter individuare i pazienti a maggiore rischio di proliferazione maligna e poter eventualmente attuare il più precocemente possibile una terapia mirata, vista l'attuale disponibilità di un anticorpo monoclonale
15 anti-BlyS (Belimumab) (Ramos-Casals M, Brito-Zeron P. Rheumatology 2007;46(9): 1389-96).

Il ruolo dei linfociti B nella patogenesi della malattia celiaca è finora apparso marginale rispetto al fondamentale ruolo giocato da HLA e attivazione T linfocitaria (Sollid LM, Thorsby E. Gastroenterology 1993;105: 910-22, Spurkland A, et al. Tissue antigens 1997;49:29-34 e Molberg Ø, et al. Gastroenterology 2003; 125:337-44).

Tuttavia, la Richiedente ha dimostrato che BlyS
25 si trova ad elevati livelli serici in un'elevata

percentuale (>80%) di pazienti affetti da malattia celiaca (fig. 3).

In particolare, nella fig. 3 si rappresentano i livelli serici di BlyS in pazienti celiaci versus
5 controlli sani (HBDS). I livelli serici di BlyS sono significativamente maggiori nei pazienti celiaci rispetto alla popolazione sana di controllo (Mann Whitney t-test, *p<0.0001). [Range di normalità: <1.145 ng/ml, media+2SD].

10 Questo risultato, finora mai dimostrato, propone una nuova chiave nell'interpretazione della patogenesi di questa diffusa (circa l'1% della popolazione) enteropatia. Di particolare rilievo è che rispetto a tutti i disordini autoimmuni dove finora è
15 stato studiato BlyS, nella malattia celiaca l'up-regolazione di BlyS è la più ampia mai registrata, in quanto riguarda 4 pazienti su 5. Inoltre i livelli serici di BlyS misurati ed analizzati dalla Richiedente mostrano una significativa correlazione
20 con quelli degli anticorpi malattia-specifici, gli antitransglutaminasi (a-tTG) (fig. 4, in cui si rappresenta la correlazione tra livelli serici di BlyS e livelli di a-tTG IgA. *Spearman rank test: r=0.399, 95% CI: 0.1724-0.5856, p=0.0007.), ed entrambi,
25 BlyS e a-tTG si riducono in concomitanza

con l'introduzione della dieta senza glutine e la remissione clinica della malattia (fig. 5, in cui si rappresenta la modulazione dei livelli serici di BLYS dopo dieta senza glutine). Si osserva una generale significativa riduzione dei livelli di BLYS post-dieta (da 1.619 ± 0.410 ng/ml a 1.283 ± 0.310 ng/ml; * $p=0.0122$, Wilcoxon signed rank test), anche se 8/12 (75%) dei pazienti presentano ancora valori di BLYS post-dieta sopra il range di normalità (1.145 ng/ml, dosaggio con il kit ELISA R&D Systems Quantikine ELISA kit, Minneapolis, 55413 USA).

Tuttavia, anche nei casi che divengono a-tTG negativi e che giungono alla remissione clinica, i livelli di BlyS, seppur sostanzialmente ridotti, non raggiungono il range di normalità (fig. 5), suggerendo la persistenza di uno stato subclinico di malattia o di un livello di base di BlyS più elevato predisponente alla malattia stessa e largamente condiviso, al pari dell'assetto HLA.

Le recenti evidenze di una possibile compartecipazione infettiva (Rotavirus) nella patogenesi della malattia celiaca, forniscono un'ulteriore ipotesi all'innalzamento dei livelli serici di BlyS, in analogia a quanto osservato nella sindrome crioglo-

bulinematica.

Il dosaggio di BlyS potrebbe dunque rappresentare un mezzo diagnostico addizionale nei casi dubbi, con presentazione atipica o con livelli serici negativi di a-tTG, o dove la biopsia intestinale sia preclusa o non eticamente indicata o ancora come screening nelle classi di individui a maggior rischio di sviluppare la malattia.

La persistenza a livello sistemico di elevati livelli serici di BlyS potrebbe contribuire allo sviluppo di altre malattie autoimmuni in individui geneticamente predisposti.

BlyS, come precedentemente dimostrato in corso di SC e SS, ed in numerosi disordini neoplastici, potrebbe giocare un ruolo importante nel processo multi-step che porta allo sviluppo del linfoma anche nella malattia celiaca, potendo comunque stimolare sia B che T cellule (Mackay F, Leung H. Semin Immunol. 2006;18(5):284-9). In accordo con questa ipotesi sta il riscontro della Richiedente di un elevatissimo livello di BlyS (8.5 ng/ml) in un paziente celiaco con linfoma B diffuso a grandi cellule intestinale.

Questo risultato suggerisce dunque un possibile utilizzo del dosaggio di BlyS come supporto diagno-

stico nei casi di sprue refrattaria ove si sospetti un linfoma.

Il presente trovato, pertanto, prevede, in modo innovativo, il dosaggio di BlyS serico nelle seguenti situazioni:

i) marker diagnostico di flogosi e linfoprolifera-
zione pre-neoplastica/neoplastica in corso di ma-
lattie autoimmuni ovvero necessità di conferma dia-
gnostica di malattie autoimmuni sistemiche quali:

10 - artrite reumatoide, lupus eritematoso si-
stemico, citopenie autoimmuni, sclerosi si-
stemica, sclerosi multipla, sclerodermia,
sindrome di Sjögren, polidermatomiosite, sin-
drome crioglobulinemica, altre vasculiti si-
15 stemiche;

di malattie autoimmuni organo specifiche quali:

- celiachia, morbo di Crohn, tiroidite di Hashi-
moto, diabete tipo I, morbo di Basedow, morbo
di Addison, dermatiti bollose;

20 di malattie immuno-mediate di pertinenza trasfusio-
nale quali:

- immunizzazione post-trasfusionale, incompatibi-
lità materno-fetale, reazioni trasfusionali).

Il presente trovato applicato alla diagnosi della
25 linfoproliferaazione neoplastica/atipica in corso di

malattie autoimmuni in un paziente comprende, quindi, le seguenti fasi:

- una prima fase di prelievo di un campione di sangue da cui ottenere il siero del paziente;

5 - una seconda fase di esame del campione di siero per la determinazione della concentrazione, o dosaggio, di citochina BlyS, a mezzo di tecnica ELISA;

10 - una terza fase di confronto tra la concentrazione di citochina BlyS determinata nella seconda fase ed uno o più valori di riferimento di concentrazione di citochina BlyS, valori determinati sulla base della popolazione sana di controllo (healthy blood donors: HBDs) o della popolazione di
15 pazienti con diagnosi certa di linfoproliferazione in corso della tale malattia autoimmune;

- una quarta fase di individuazione di una deviazione significativa tra la concentrazione di citochina BlyS determinata nella seconda fase ed i
20 valori di riferimento di concentrazione di citochina BlyS indicati nella terza fase;

- una quinta fase, di tipo decisionale - deduttivo, per l'attribuzione, alla deviazione individuata nella quarta fase, di una diagnosi, o particolare
25 quadro clinico, della linfoproliferazione neopla-

stica/atipica in corso delle malattie autoimmuni sopra indicate.

Vantaggiosamente, il dosaggio può essere selezionato tra i metodi atti ad identificare e quantificare BlyS su diverse matrici biologiche (sangue, urine, liquor, versamenti cavitari, sezioni istologiche, colture cellulari).

L'adozione di tale dosaggio non comporta, inoltre, modifiche sostanziali agli impianti o alle strutture organizzative dei reparti interessati all'impiego di questo nuovo marcatore, in quanto il dosaggio viene effettuato mediante tecnica ELISA utilizzando un'apparecchiatura automatizzata comunemente presente presso i maggiori laboratori di analisi ospedalieri.

ii) marker diagnostico anche in altre condizioni predisponenti all'insorgenza di malattia autoimmune quali deficit immunologici (IgA), assetto dei geni HLA, infezioni croniche virali;

iii) monitoraggio delle malattie autoimmuni sistemiche e organo specifiche indicate al punto i) (compliance alla dieta nei celiaci, marker di attivazione del sistema immunitario, efficacia della terapia in genere, riattivazione di malattia, evoluzione linfomatosa in genere, etc.);

in tal caso il metodo di monitoraggio secondo il trovato presenta le fasi di cui al suddetto metodo diagnostico, applicate ad un paziente con una malattia autoimmune nel corso del follow-up clinico con e senza trattamento terapeutico, in cui, nella terza fase il confronto può essere effettuato anche con uno o più valori di concentrazione di citochina BlyS precedentemente rilevati nel paziente ed in cui in base all'esito della quinta fase di diagnosi, in una successiva sesta fase si decide l'eventuale ripetizione, ad intervalli predeterminati, delle prime cinque fasi, in modo da valutare nel tempo l'evolversi della malattia autoimmune nel paziente.

iv) nuovo marker prognostico di infiammazione (ad esempio nella celiachia), ovvero nell'identificazione di pazienti con rischio elevato di sviluppare linfoma come complicanza di malattie autoimmuni oppure nell'individuazione di marker di predisposizione allo sviluppo di malattie autoimmuni sistemiche e organo specifiche in soggetti a rischio:

- infezione microbiche,
- deficit di IgA,
- predisposizione genetica associata ai

geni HLA;

In tal caso il metodo di prognosi secondo il trovato presenta le fasi di cui al suddetto metodo diagnostico, con in più una fase preliminare di selezione dei pazienti che presentano una o più delle situazioni predisponenti di cui sopra e sui quali viene effettuata la prognosi ed in cui la quinta fase, di tipo decisionale-deduttivo, è finalizzata alla prognosi di un particolare quadro clinico.

10 v) addizionale "decision-maker" nel processo diagnostico prima di approcci più invasivi (es. nella celiachia);

15 vi) bersaglio terapeutico, mediante applicazione di presidi terapeutici anti-BLyS da utilizzare in vivo come supporto terapeutico nelle malattie autoimmuni di cui al punto i).

In tal caso il presente trovato è diretto quindi all'uso di presidi terapeutici anti-BLyS, particolarmente, ma non solo, anticorpi monoclonali anti-BlyS, ed a composizioni farmaceutiche comprendenti tali presidi terapeutici come principio attivo, per l'uso in un metodo per il trattamento delle suddette malattie autoimmuni.

25 vii) controllo dell'efficacia di un trattamento terapeutico di pazienti con linfoproliferazione ne-

oplastica/atipica in corso di malattie autoimmuni che comprende una fase terapeutica di aggressione della citochina B-Lymphocyte stimulator (BlyS) (ad esempio aggressione dei recettori di BlyS o delle
5 vie di traduzione tra i recettori e BlyS).

Il controllo secondo il trovato prevede le cinque fasi di cui al suddetto metodo diagnostico, in cui nella terza fase il confronto può essere effettuato anche con uno o più valori di concentrazione di ci-
10 tochina BlyS precedentemente rilevati nel paziente ed in cui la quinta fase, in base alla concentrazione o dosaggio di BlyS rilevata nel campione indicativa dell'efficacia della terapia, consente di attribuire o meno una particolare efficacia alla
15 terapia stessa, influenzando, così, la decisione da parte del medico di proseguire, modificare o cessare l'iter terapeutico.

È chiaro che al metodo diagnostico e prognostico per la diagnosi e la prognosi della linfoprolifera-
20 zione nelle malattie autoimmuni fin qui descritti possono essere apportate modifiche e/o aggiunte di parti e/o fasi, senza per questo uscire dall'ambito del presente trovato.

È anche chiaro che, sebbene il presente trovato
25 sia stato descritto con riferimento ad alcuni esem-

pi specifici, una persona esperta del ramo potrà
senz'altro realizzare molte altre forme equivalenti
di metodo diagnostico e prognostico per la diagnosi
e la prognosi della linfoproliferazione nelle ma-
5 lattie autoimmuni, aventi le caratteristiche e-
sprese nelle rivendicazioni e quindi tutte rien-
tranti nell'ambito di protezione da esse definito.

RIVENDICAZIONI

1. Metodo diagnostico per la diagnosi della linfoproliferazione neoplastica/atipica in corso di malattie autoimmuni in un paziente, **caratterizzato**
- 5 **dal fatto che** comprende le seguenti fasi:
- una prima fase di prelievo di un campione di sangue dal paziente;
 - una seconda fase di esame del campione di sangue per la determinazione della concentrazione di citochina B-Lymphocyte stimulator (BlyS);

10

 - una terza fase di confronto tra la concentrazione di citochina B-Lymphocyte stimulator (BlyS) determinata nella seconda fase ed uno o più valori di riferimento di concentrazione di citochina B-

15

 - Lymphocyte stimulator (BlyS);
 - una quarta fase di individuazione di una deviazione significativa tra la concentrazione di citochina B-Lymphocyte stimulator (BlyS) determinata nella seconda fase ed i valori di riferimento di

20

 - concentrazione di citochina B-Lymphocyte stimulator (BlyS) indicati nella terza fase;
 - una quinta fase di attribuzione di una diagnosi della linfoproliferazione neoplastica/atipica in corso di malattie autoimmuni alla deviazione indi-

25

 - viduata nella quarta fase.

2. Metodo diagnostico come nella rivendicazione 1, **caratterizzato dal fatto che** le malattie autoimmuni sono una o più comprese in un gruppo di malattie comprendente:

5 - malattie autoimmuni sistemiche quali:

artrite reumatoide, lupus eritematoso sistemico, citopenie autoimmuni, sclerosi sistemica, sclerosi multipla, sclerodermia, sindrome di Sjögren, poli-

10 dermatomiosite, sindrome crioglobulinemica, altre vasculiti sistemiche; e

-malattie autoimmuni organo specifiche quali:

celiachia, morbo di Crohn, tiroidite di Hashimoto, diabete tipo I, morbo di Basedow, morbo di Addison, dermatiti bollose; e

15 - malattie immuno-mediate di pertinenza trasfusio-
nale quali:

immunizzazione post-trasfusionale, incompatibilità materno-fetale, reazioni trasfusionali.

3. Metodo diagnostico come nella rivendicazione 1 o

20 2, **caratterizzato dal fatto che** la seconda fase viene effettuata utilizzando un'apparecchiatura automatizzata basata sulla tecnica ELISA.

4. Metodo diagnostico come in una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, **caratterizzato dal fatto**

25 **che** comprende una fase di esame o più esami scelti

in un gruppo comprendente:

- esame fisico del paziente atto ad evidenziare i principali segni e sintomi di neoplasia linfatica;
- uno o più esami radiologici del paziente;
- 5 - esame istologico di un campione biotico prelevato dal paziente.

5. Metodo per il monitoraggio nel tempo dell'evoluzione verso una linfoproliferazione neoplastica/atipica in corso di malattie autoimmuni in
10 un paziente, **caratterizzato dal fatto che** comprende le seguenti fasi:

- una prima fase di prelievo di un campione di sangue dal paziente con una malattia autoimmune;
- una seconda fase di esame del campione di sangue
15 per la determinazione della concentrazione di citochina BlyS;
- una terza fase di confronto tra la concentrazione di citochina BlyS determinata nella seconda fase ed uno o più valori di riferimento di concentrazione
20 di citochina BlyS e/o uno o più valori di concentrazione di citochina BlyS precedentemente rilevati nel paziente;
- una quarta fase di individuazione di una deviazione significativa tra la concentrazione di citochina BlyS determinata nella seconda fase ed i va-
25

lori di riferimento di concentrazione di citochina BlyS indicati nella terza fase;

- una quinta fase di attribuzione di una diagnosi di linfoproliferazione neoplastica/atipica in corso
5 di malattie autoimmuni alla deviazione individuata nella quarta fase;

- una sesta fase di decisione di ripetizione nel tempo, ad intervalli temporali predeterminati, delle fasi dalla prima fase alla quinta fase in base,
10 in funzione dell'esito della diagnosi della quinta fase.

6. Metodo di prognosi per la conferma diagnostica di malattie autoimmuni in pazienti che presentano sintomi o segni suggestivi o situazioni predisponenti, **caratterizzato dal fatto che** comprende le
15 seguenti fasi:

- una fase preliminare di selezione di pazienti con sintomi e/o segni suggestivi o che presentano una o più situazioni predisponenti, tra le quali:

20 - infezione microbiche,
 - deficit immunologici (IgA)
 - predisposizione genetica associata ai geni HLA;

- una prima fase di prelievo di un campione di sangue da uno dei pazienti selezionati;
25

- una seconda fase di esame del campione di sangue per la determinazione della concentrazione di citochina BlyS;
 - una terza fase di confronto tra la concentrazione di citochina BlyS determinata nella seconda fase ed uno o più valori di riferimento (popolazione sana di controllo) di concentrazione di citochina BlyS;
 - una quarta fase di individuazione di una deviazione significativa tra la concentrazione di citochina BlyS determinata nella seconda fase ed i valori normali di concentrazione di citochina BlyS;
 - una quinta fase di attribuzione di una diagnosi di malattia autoimmune alla deviazione individuata nella quarta fase.
7. Presidio terapeutico anti citochina B-Lymphocyte stimulator (BlyS) per l'uso in un metodo per il trattamento della linfoproliferazione neoplastica/atipica in corso di malattie autoimmuni comprese in un gruppo di malattie autoimmuni comprendente:
- malattie autoimmuni sistemiche quali:
artrite reumatoide, lupus eritematoso sistemico, citopenie autoimmuni, sclerosi sistemica, sclerosi multipla, sclerodermia, sindrome di Sjögren, polidermatomiosite, sindrome crioglobulinemica, altre

vasculiti sistemiche; e

- malattie autoimmuni organo specifiche quali:
celiachia, morbo di Crohn, tiroidite di Hashimoto,
diabete tipo I, morbo di Basedow, morbo di Addison,

5 dermatiti bollose; e

- malattie immuno-mediate di pertinenza trasfusio-
nale quali:

immunizzazione post-trasfusionale, incompatibilità
materno-fetale, reazioni trasfusionali.

10 8. Presidio terapeutico come nella rivendicazione
7, **caratterizzato dal fatto che** comprende anticorpi
monoclonali anti citochina B-Lymphocyte stimulator
(BlyS).

9. Composizione farmaceutica comprendente uno o
15 più presidi terapeutici anti citochina B-Lymphocyte
stimulator (BlyS) come principio attivo assieme ad
una quantità farmacologicamente accettabile di ec-
cipienti o di coadiuvante, per l'uso in un metodo
per il trattamento della linfoproliferazione neo-
20 plastica/atipica in corso di malattie autoimmuni
comprese in un gruppo di malattie autoimmuni com-
prendente:

- malattie autoimmuni sistemiche quali:
artrite reumatoide, lupus eritematoso sistemico,
25 citopenie autoimmuni, sclerosi sistemica, sclerosi

multipla, sclerodermia, sindrome di Sjögren, poli-
dermatomiosite, sindrome crioglobulinemica, altre
vasculiti sistemiche; e

- malattie autoimmuni organo specifiche quali:

5 celiachia, morbo di Crohn, tiroidite di Hashimoto,
diabete tipo I, morbo di Basedow, morbo di Addison,
dermatiti bollose; e

- malattie immuno-mediate di pertinenza trasfusio-
nale quali:

10 immunizzazione post-trasfusionale, incompatibilità
materno-fetale, reazioni trasfusionali.

10. Metodo di controllo dell'efficacia di un trat-
tamento terapeutico di pazienti con linfoprolifera-
zione neoplastica/atipica in corso di malattie au-
15 toimmuni che comprende una fase terapeutica di ag-
gressione della citochina B-Lymphocyte stimulator
(BlyS), **caratterizzato dal fatto che** comprende le
seguenti fasi:

- una prima fase di prelievo di un campione di san-
20 gue dal paziente;

- una seconda fase di esame del campione di sangue
per la determinazione della concentrazione di cito-
china B-Lymphocyte stimulator (BlyS);

- una terza fase di confronto tra la concentrazione
25 di citochina B-Lymphocyte stimulator (BlyS) deter-

minata nella seconda fase ed uno o più valori standard di concentrazione di citochina B-Lymphocyte stimulator (BlyS) oppure uno o più valori di concentrazione di citochina B-Lymphocyte stimulator (BlyS) precedentemente rilevati nel paziente;

5

- una quarta fase di individuazione di una deviazione significativa tra la concentrazione di citochina B-Lymphocyte stimulator (BlyS) determinata nella seconda fase ed i valori di riferimento di

10 BLYS indicati nella terza fase;

- una quinta fase di attribuzione di efficacia del trattamento terapeutico alla deviazione individuata nella quarta fase.

11. Metodo diagnostico e prognostico per la diagnosi e la prognosi della linfoproliferazione nelle

15 malattie autoimmuni, sostanzialmente come descritto, con riferimento agli annessi disegni.

p. UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI UDINE

LF/SL 01.10.2007

Il mandatario
STEFANO LIGI
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
P.le Cavedalis, 6/2 - 33100 UDINE

1/2

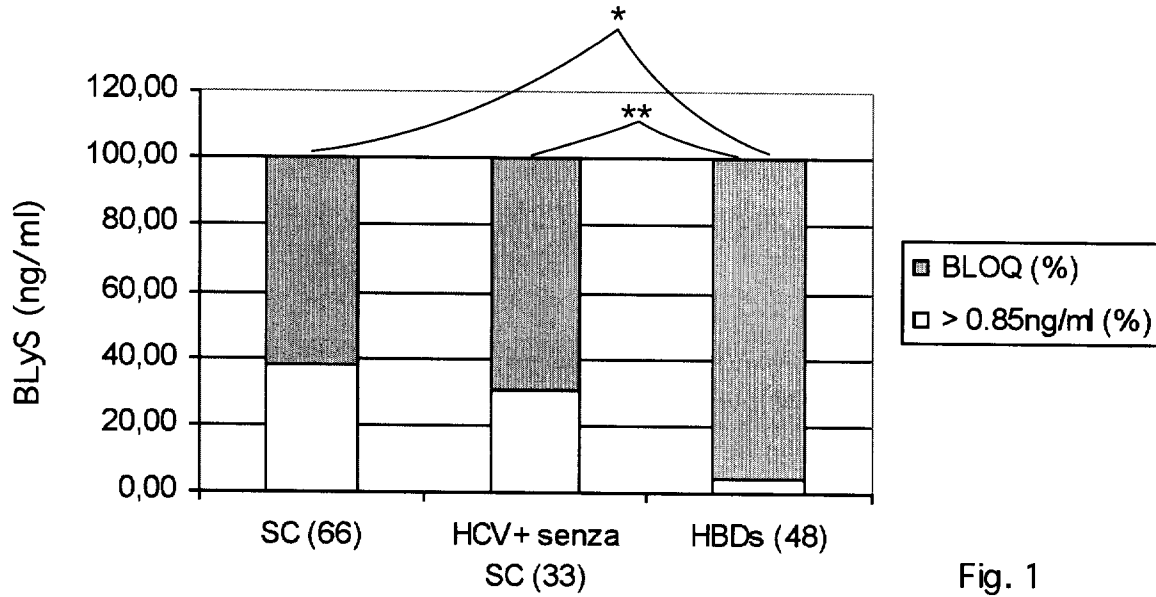


Fig. 1

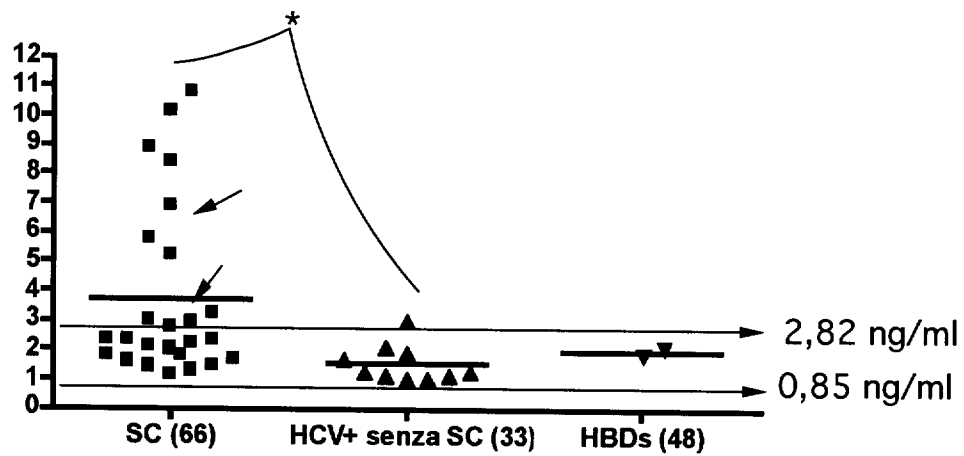


Fig. 2

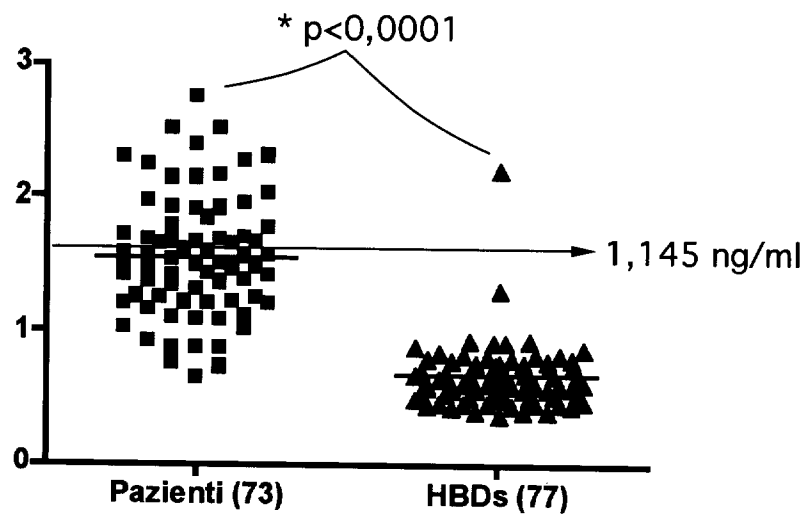


Fig. 3

2/2

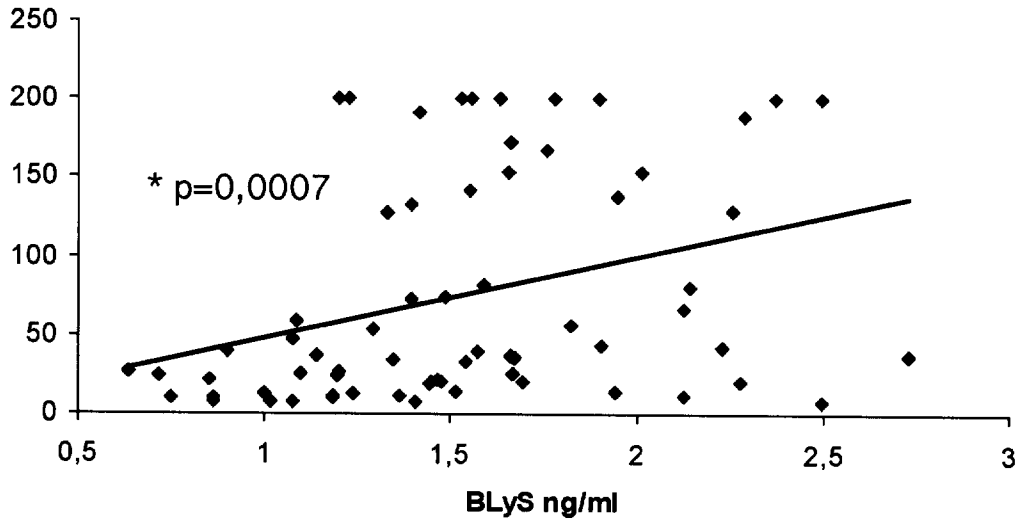


Fig. 4

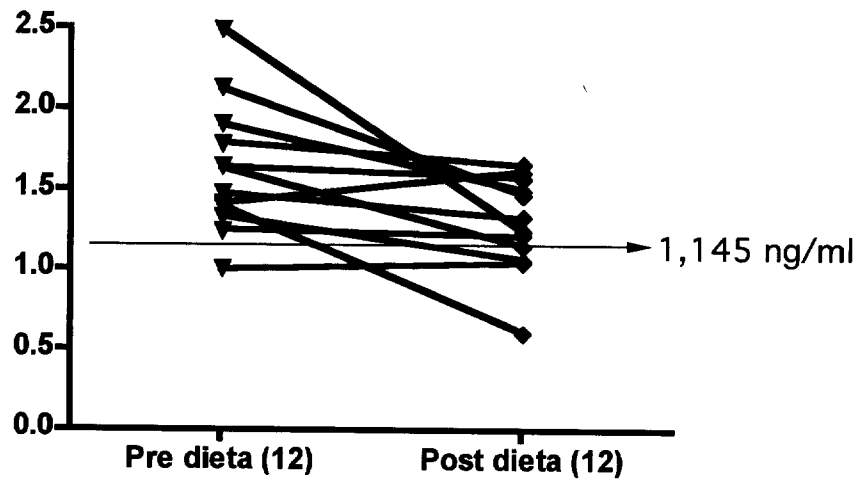


Fig. 5