



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

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102008901683483
Data Deposito	02/12/2008
Data Pubblicazione	02/06/2010

Classifiche IPC

Titolo

USO DELL'APTOGLOBINA, PEPTIDI LEGANTI L'APTOGLOBINA, POLIMERI CONTENENTI GLI STESSI E LORO USO

DESCRIZIONE

del brevetto per invenzione industriale dal titolo:

"USO DELL'APTOGLOBINA, PEPTIDI LEGANTI L'APTOGLOBINA,
POLIMERI CONTENENTI GLI STESSI E LORO USO"

di BIOINDUSTRY PARK DEL CANAVESE S.P.A.

di nazionalità italiana

con sede: VIA RIBES 5

COLLERETTO GIACOSA (TO)

Inventori: ABRESCIA Paolo, BUCCI Enrico, CIGLIANO Luisa,
CORPILLO Davide, SALVATORE Alfonso

* * *

La presente invenzione è relativa all'uso dell'aptoglobina, a peptidi leganti l'aptoglobina, a polimeri contenenti gli stessi e al loro uso.

Stato dell'Arte

L'apolipoproteina E (ApoE) è una proteina che nell'uomo si compone di 299 aminoacidi, trasporta le lipoproteine, le vitamine liposolubili e il colesterolo nel sistema linfatico e quindi nel sangue. È sintetizzata principalmente nel fegato, ma si trova anche in altri tessuti, tra cui il cervello, i reni e la milza. Nel sistema nervoso, è sintetizzata principalmente dai tipi cellulari non neuronali, soprattutto l'astroglia e la microglia, mentre i neuroni esprimono i recettori per ApoE.

Ad oggi, sono stati identificati 7 recettori per ApoE,

Rinaldo PLEBANI
(Iscrizione Albo nr. 358/BM)

tutti appartenenti alla famiglia dei recettori per le LDL.

ApoE è una proteina essenziale per il normale catabolismo delle lipoproteine e dei trigliceridi. Inizialmente, ApoE è stata identificata come un attore importante nel metabolismo delle lipoproteine e nei disordini cardiovascolari. Più recentemente, è emerso un importante ruolo di ApoE anche in molte condizioni patologiche e fisiologiche non legate direttamente al trasporto delle lipoproteine, tra cui la regolazione della risposta immune e l'apprendimento.

Difetti in ApoE sono stati riscontrati nella disbetalipoproteinemia familiare (iperlipoproteinemia di tipo III), in cui livelli elevati di colesterolo e trigliceridi circolanti sono correlati alla alterata rimozione dal circolo dei chilomicroni, delle VLDL e delle LDL.

Nel sistema nervoso ApoE è particolarmente abbondante, e sembra giocare un ruolo particolarmente importante. In particolare, oltre al ben noto ruolo come fattore di rischio per l'Alzheimer esercitato da una particolare isoforma della proteina, alterazioni di ApoE sono state descritte in neonati a rischio di paralisi cerebrale. Inoltre, nel liquor cerebrospinale (CSF) questa apolipoproteina, in forma libera o lipidata, gioca ruoli apparentemente importanti per la aggregazione o

Rinaldo PLEBANI
(Iscrizione Albo nr. 358/BM)

solubilizzazione di β -amiloide, fenomeni alla base rispettivamente della neurodegenerazione da Alzheimer e del trasporto di β -amiloide al torrente ematico [Sadowski M, et al. e Chan W et al.]. Particelle simili alle HDL, contenenti ApoE e colesterolo, sono presenti nel CSF [Demeester N et al.] e possono veicolare β -amiloide ai neuroni attraversando la barriera ematoencefalica (BBB) [Donahue JE et al.]. La transcitosi di queste lipoproteine e del corrispondente carico di colesterolo e β -amiloide dal CSF al sangue avviene grazie ai recettori per ApoE presenti sulle cellule endoteliali dei capillari cerebrali [Rebeck GW et al.].

Nel torrente ematico, ApoE è coinvolta sia nell'aterogenesi che nella risposta infiammatoria.

Per quel che riguarda la risposta infiammatoria e la sua regolazione, è stata inizialmente dimostrata un'attività modulatoria di ApoE sui linfociti, descritta in origine come un'attività immuno-inibitoria delle LDL in vitro [Macy M et al., Akeson AL et al., Cuthbert JA et al., Hui DY et al.]. Questa attività è stata successivamente assegnata ad ApoE; in particolare, sia multimeri di ApoE che lipoproteine contenenti ApoE hanno dimostrato di inibire la proliferazione indotta da antigene su colture di linfociti [Dyer CA et al., Kelly ME et al., Mistry MJ et al., Laskowitz DT et al.]. Inoltre, è stato osservato che

Rinaldo PLEBANI
(Iscrizione Albo nr. 358/BM)

ApoE blocca la risposta di tipo I in vivo, modulando l'espressione di IL-12 e l'attività dei linfociti T-helper [K. Ali Circulation Research. 2005;97:922.]. ApoE è prodotta durante la risposta immune dai macrofagi [Basu SK et al., Werb Z et al., Takemura R et al.] che attivano le cellule T mediante presentazione dell'antigene; i linfociti T attivati rilasciano interferon-γ (IFN-γ), il quale a sua volta inibisce l'espressione di ApoE da parte dei macrofagi [Mistry MJ et al.]. Questo implica un'intricata rete di controllo della risposta immune, al cui centro vi è un meccanismo di feed-back mediato da ApoE. Nel topo, la deficienza di ApoE causa un'alterata rimozione dei corpi apoptotici generati dalla risposta infiammatoria, e risulta in una condizione proinfiammatoria sistemica.

Per quel che riguarda invece la patologia aterosclerotica, nella maggioranza dei casi l'aterosclerosi è di fatto un disturbo infiammatorio. Sebbene l'attenzione sia stata inizialmente puntata sull'accumulo dei lipidi nel lume vasale, con la conseguente formazione della placca, l'aterosclerosi trova la sua origine in una simultanea alterazione sia del trasporto dei lipidi, che del potere ossidativo ematico e della risposta immune. In particolare, la progressione nello sviluppo della placca sembra essere guidata da un complesso gioco di citochine e cellule infiammatorie, che vede coinvolte interleuchine, macrofagi

e linfociti T. ApoE regola l'efflusso di colesterolo dai macrofagi, oltre che dalle cellule schiumose all'origine della placca aterosclerotica. I linfociti T, regolati da ApoE, partecipano all'accrescimento della placca aterosclerotica, alimentando la risposta infiammatoria contro di essa. La conseguenza della deficienza di ApoE nella patogenesi aterosclerotica è ben documentata ed è stata studiata su un modello murino ApoE-/- disponibile da qualche anno. Tale modello ha evidenziato il ruolo sostanzialmente protettivo di ApoE, la cui mancanza provoca un'estesa aterogenesi.

Attualmente si sta cercando di individuare ligandi di ApoE che blocchino la sua attività per identificare una possibile via attraverso la quale la patologia aterosclerotica può svilupparsi.

Si è inoltre alla ricerca di inibitori di tali ligandi in modo che quest'ultima possa svolgere il suo ruolo protettivo contro lo sviluppo della placca aterosclerotica.

L'individuazione di un meccanismo che aumenti il livello di ApoE sarebbe quindi auspicabile; in questo senso, sebbene siano stati fatti tentativi di utilizzo di terapia genica nel modello murino, che in qualche caso hanno portato anche all'innalzamento della proteina circolante, non sono stati ottenuti risultati soddisfacenti.

Rinaldo PLEBANI
(Iscrizione Albo nr. 358/BM)

Scopo della presente invenzione è pertanto quello di individuare ligandi di ApoE che portano ad una deficienza di tale proteina per poter comprendere i meccanismi della patologia aterosclerotica.

Inoltre scopo della presente invenzione è quello di individuare inibitori di tali ligandi utili nei casi in cui è necessario innalzare l'attività di ApoE in modo che quest'ultima possa svolgere ad esempio il suo ruolo protettivo contro una eccessiva risposta infiammatoria e di conseguenza anche contro lo sviluppo della placca aterosclerotica.

Tali scopi sono raggiunti mediante l'uso di aptoglobina secondo le rivendicazioni 1 e 2, mediante i peptidi delle rivendicazioni 3 e 4 ed il loro uso secondo le rivendicazioni 15 e 16.

Definizioni

A meno che non sia specificato esplicitamente il contrario, i seguenti termini presentano il significato qui sotto indicato.

Nel presente testo per "percentuale di identità" e "% di identità" tra due sequenze di amminoacidi (peptidi) o di acidi nucleici (nucleotidi) si intende la percentuale di residui amminoacidici o nucleotidici identici in posizioni corrispondenti nelle due sequenze allineate in modo ottimale.

Rinaldo PLEBANI
(Iscrizione Albo nr. 358/BM)

Per determinare la "percentuale di identità" delle due sequenze di amminoacidi o di acidi nucleici, le sequenze vengono tra loro allineate; per raggiungere un confronto ottimale, nelle sequenze possono venire introdotte interruzioni (vale a dire cancellazioni o inserimenti - i quali possono eventualmente essere anche disposti all'estremità delle sequenze) (gap). I residui amminoacidici e nucleotidici in posizioni corrispondenti vengono quindi confrontati. Quando una posizione nella prima sequenza è occupata dal medesimo residuo amminoacidico o nucleotide che occupa la corrispondente posizione nella seconda sequenza, le molecole sono identiche in quella posizione. La percentuale di identità tra due sequenze è funzione del numero di posizioni identiche condivise dalle sequenze [vale a dire % di identità = (numero delle posizioni identiche / numero totale delle posizioni) X 100].

Secondo una vantaggiosa forma di attuazione, le sequenze hanno la stessa lunghezza.

Vantaggiosamente, le sequenze confrontate non presentano interruzioni (o inserimenti).

La percentuale di identità può venire ottenuta utilizzando algoritmi matematici. Un esempio non limitativo di un algoritmo matematico utilizzato per il confronto di due sequenze è l'algoritmo di Karlin ed Altschul [Proc.

Rinaldo PLEBANI
(Iscrizione Albo nr. 358/BM)

Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990) 2264-2268] modificato da Karli ed Altschul [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 5873-5877]. Tale algoritmo è incorporato nei programmi BLASTn e BLASTp di Altschul [Altschul, et al, J. Mol. Biol. 215 (1990) 403-410].

Allo scopo di ottenere allineamenti anche in presenza di una o più interruzioni (o inserimenti) è possibile utilizzare metodi che assegnano una penalità relativamente elevata a ciascuna interruzione (o inserimento) ed una penalità inferiore per ciascun residuo amminoacidico o nucleotidico aggiuntivo nell'interruzione (tale residuo amminoacidico o nucleotide aggiuntivo viene definito come estensione dell'interruzione). Alte penalità determineranno, ovviamente, allineamenti ottimizzati con un minore numero di interruzioni.

Un esempio di un programma atto a realizzare questo tipo di allineamento è il programma BLAST come descritto in Altschul, et al., Nucleic Acids Res. 25 (1997) 3389-3402. A questo scopo i programmi BLASTn e BLASTp possono essere utilizzati con i parametri di default. Utilizzando i programmi BLAST viene tipicamente impiegata la matrice BLOSUM62.

Un esempio vantaggioso e non limitativo di un programma per realizzare un allineamento ottimale è GCG Winsconsin Bestfit package [Università del Winsconsin, USA;

Rinaldo PLEBANI
(Iscrizione Albo nr. 358/BM)

Devereux et al., 1984, Nucleic Acids Research 12:387].

Anche in questo caso vengono utilizzati i parametri di default che per una sequenza di amminoacidi prevedono una penalità di -12 per una interruzione ed una penalità di -4 per ciascuna estensione.

Nel presente testo per "percentuale di omologia" e "% di omologia" tra due sequenze di amminoacidi o di acidi nucleici si intende la percentuale di residui amminoacidici o nucleotidi omologhi in posizioni corrispondenti nelle due sequenze allineate in modo ottimale.

La percentuale di omologia fra due sequenze viene determinata in modo sostanzialmente identico a quanto sopra descritto per la determinazione della percentuale di identità eccetto per il fatto che nel calcolo vengono considerate anche le posizioni omologhe e non solo le posizioni identiche.

Per quanto riguarda una sequenza di nucleotidi, due posizioni omologhe presentano due nucleotidi differenti ma che all'interno del proprio codone portano alla codificazione del medesimo amminoacido.

Per quanto riguarda una sequenza di amminoacidi, due posizioni omologhe presentano due amminoacidi omologhi, vale a dire amminoacidi dotati di proprietà chimico-fisiche simili, per esempio, amminoacidi appartenenti a medesimi gruppi come: aromatici (Phe, Trp, Tyr), acidi (Glu, Asp),

Rinaldo PLEBANI
(Iscrizione Albo nr. 358/BM)

polari (Gln, Asn), basici (Lys, Arg, His), alifatici (Ala, Leu, Ile, Val), con un gruppo idrossi (Ser, Thr), con catena laterale corta (Gly, Ala, Ser, Thr, Met). Ci si aspetta che sostituzioni tra tali amminoacidi omologhi non cambino il fenotipo delle proteine (sostituzioni conservative di amminoacidi). Specifici esempi di sostituzioni conservative sono note in questo campo tecnico e sono descritte in varia letteratura (ad es., Bowie et al., *Science*, 247:1306-1310 (1990)].

Ulteriori esempi di programmi e/o articoli relativi alla determinazione di allineamenti e delle percentuali di omologia e/o identità sono indicati in, ad esempio, US2008003202, US2007093443, WO06048777.

Nel presente testo per "posizione corrispondente" si intende una posizione in una sequenza di un polipeptide o di acidi nucleici che corrisponde (si affaccia), a seguito di un allineamento, ad una determinata posizione di una sequenza di riferimento.

Breve descrizione delle figure

Per una migliore comprensione della presente invenzione, essa viene ora descritta anche con riferimento alle figure allegate, che illustrano quanto segue:

- la Figura 1 illustra i risultati dell'elettroforesi su gel denaturante e riducente di una miscela di peptidi ottenuta dalla digestione di ApoE con CNBr;

Rinaldo PLEBANI
(*Iscrizione Albo nr. 358/BM*)

- la Figura 2 illustra i risultati dell'elettroforesi su gel denaturante e riducente di una miscela di peptidi ottenuta dalla digestione di ApoE con trombina;
- la Figura 3 illustra i peptidi ottenuti dalla frammentazione della sequenza 65-191 di ApoE;
- la Figura 4 illustra la percentuale di aptoglobina legata in funzione della concentrazione dei peptidi secondo la presente invenzione.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

E' stato identificato che l'aptoglobina è un ligando dell'apolipoproteina E e che quindi è utilizzabile per poter identificare e comprendere i meccanismi della patologia aterosclerotica.

Secondo un altro aspetto dell'invenzione, l'aptoglobina può essere inoltre utilizzata per la preparazione di un medicamento per la diagnosi di una patologia selezionata nel gruppo costituito da Alzheimer, diabete, patologie cardiovascolari.

L'aptoglobina è una proteina polimorfa, costituita da due catene (α e β) unite tra loro a formare multimeri con stecchiometrie diverse. L'aptoglobina è sintetizzata principalmente nel fegato, ma molti altri organi e tessuti sono stati riconosciuti come siti di sintesi di questa proteina [Smeets MB et al., Kalmovarin N et al.].

L'aptoglobina è nota da molto tempo per la sua

Rinaldo PLEBANI
(Iscrizione Albo nr. 358/BM)

capacità di legare l'emoglobina libera e trasportarla al fegato per la sua distruzione catabolica [Sadrzadeh SM et al.].

Recentemente, è stato descritto il legame fra l'aptoglobina e la principale apolipoproteina ematica, ApoA-I [Porta A et al.]. ApoA-I è il maggior costituente delle HDL e promuove l'efflusso del colesterolo dalle cellule, stimola l'enzima LCAT ad esterificare il colesterolo per il trasporto al fegato, e favorisce la cattura e l'endocitosi delle HDL da parte degli epatociti [Xu S et al, Temel RE et al]. Livelli elevati di aptoglobina, come quelli riscontrabili durante un processo infiammatorio, aboliscono la capacità di ApoA-I di stimolare LCAT [Balestrieri M et al.]. In vitro, è stato dimostrato che un peptide mimetico di ApoA-I, con sequenza corrispondente alla sequenza di ApoA-I identificata per la sua capacità di legare LCAT, spiazza l'aptoglobina da ApoA-I, ripristinando la capacità di quest'ultima proteina di stimolare LCAT anche in presenza di elevate concentrazioni di aptoglobina [Spagnuolo MS et al.].

Per quel che riguarda l'aterosclerosi, è stato ampiamente dimostrato il coinvolgimento diretto dell'aptoglobina, ed in particolare del suo fenotipo 2-2, che è un fattore di rischio per disordini aterosclerotici e connesse complicazioni cardiovascolari. Possono essere

Rinaldo PLEBANI
(Iscrizione Albo nr. 358/BM)

coinvolti molti, distinti meccanismi mediati dall'aptoglobina: per esempio, è risultato che il genotipo dell'aptoglobina è predittivo per quel che riguarda l'accumulo di ferro nella placca, la perossidazione dei lipidi in situ e la quantità di macrofagi ritrovati sulla placca stessa [Levy AP et al.].

E' infine interessante notare come in studi di popolazione i fenotipi di ApoE e di aptoglobina, che come si è visto sono entrambe coinvolte nella patologia aterosclerotica, quando considerati in combinazione hanno effetto moltiplicativo per quanto riguarda il rischio di patologia aterogenetica, con il rischio massimo osservato in presenza dell'allele 4 di ApoE e del fenotipo 2-2 dell'aptoglobina [Braeckman L et al.].

Secondo un ulteriore aspetto dell'invenzione vengono forniti dei peptidi leganti l'aptoglobina comprendenti da 11 a 30 aminoacidi di una sequenza avente il 90% di identità con una sequenza selezionata tra SEQ ID:1 e SEQ ID: 2.

Vengono inoltre forniti peptidi leganti l'aptoglobina comprendenti da 11 a 30 aminoacidi di una sequenza selezionata tra SEQ ID:1 e SEQ ID: 2.

Vantaggiosamente i peptidi secondo l'invenzione sono ligandi selettivi di aptoglobina in grado di competere con ApoE per la formazione di un complesso stabile.

Rinaldo PLEBANI
(Iscrizione Albo nr. 358/BM)

I ligandi ad oggi utilizzati per l'aptoglobina sono anticorpi mono- e policlonali specifici, utilizzati principalmente per saggi diagnostici di tipo nefelometrico o turbidimetrico e per la purificazione mediante immunoaffinità. In particolare, gli anticorpi disponibili hanno applicazione soprattutto nella diagnostica umana, in particolare di emolisi intravascolare, stati infiammatori e oncologici specifici e nella diagnostica veterinaria, ad esempio, per determinare mastiti, disordini respiratori, infezioni in atto. Svantaggiosamente l'utilizzo in vivo su paziente umano a scopo terapeutico dei suddetti anticorpi non è proponibile, perché gli anticorpi non sono umani/umanizzati.

Al contrario, molecole di dimensioni ridotte, contenenti uno o più peptidi secondo la presente invenzione, possono essere ingegnerizzate per aumentarne la stabilità e la vita plasmatica e abbassarne l'immunogenicità. Infine, dal punto di vista della produzione, piccoli peptidi presentano costi ridotti e una più facile produzione GMP rispetto ad anticorpi e proteine ricombinanti in genere.

Preferibilmente, i peptidi secondo la presente invenzione presentano l'estremità N terminale acetilata e/o l'estremità C terminale ammidata e possono essere polipeptidi ricombinanti, polipeptidi sintetici e

Rinaldo PLEBANI
(Iscrizione Albo nr. 358/BM)

peptidomimetici.

Secondo un ulteriore aspetto vengono forniti acidi nucleici codificanti i peptidi dell'invenzione, preferibilmente selezionati nel gruppo costituito da RNA, DNA, e cDNA.

Le sequenze identificate possono essere clonate in una cellula bersaglio, che esprima i peptidi stessi o polipeptidi contenenti la loro sequenza, allo scopo di ottenerne quantità elevate, ed eventualmente di secernere le sequenze prodotte nel mezzo extracellulare, per applicazioni *in vitro* e *in vivo*.

Inoltre, le sequenze aminoacidiche identificate o sequenze ad esse omologhe possono essere clonate all'interno di vettori virali, per ottenere particelle virali altamente funzionalizzate con i peptidi stessi, da usare come agenti ad alta affinità in grado di spiazzare efficientemente ApoE dal suo complesso con aptoglobina.

I peptidi dell'invenzione possono essere inoltre utilizzati anche come monomeri per la preparazione di polimeri sia dendrimerici o lineari.

I peptidi possono essere covalentemente coniugati, in un peptide lineare o ramificato, attraverso un linker di natura peptidica o meno, consistente per esempio ma non esclusivamente in residui di lisina, acido glutammico, zuccheri ramificati o meno, polietilenglicoli.

Rinaldo PLEBANI
(Iscrizione Albo nr. 358/BM)

Alternativamente possono essere preparati multimeri delle sequenze proposte, allo scopo di aumentare l'affinità e/o l'avidità dei peptidi ottenuti.

Ancora in alternativa, le sequenze identificate possono essere funzionalizzate con gruppi atti ad aumentarne solubilità, trasporto, emivita serica, stabilità, oppure in grado di migliorarne la farmacocinetica, includendo tra le modifiche a titolo non esclusivo l'aggiunta di gruppi carichi, di glicani e/o glucosidi, gruppi fosforici, gruppi acetile, gruppi eteroaromatici più o meno coniugati.

I peptidi, come tali o in forma di polimeri, possono essere formulati in una composizione farmaceutica con eccipienti, solubilizzanti, stabilizzanti, al fine di ottenere uno o più prodotti con migliorate proprietà farmacologiche.

Inoltre i peptidi, singolarmente, sotto forma di polimero o formulati in una composizione farmaceutica, possono essere utilizzati per la preparazione di un medicamento per il trattamento di una patologia selezionata nel gruppo costituito da aterosclerosi, disbetalipoproteinemia, disordini cardiovascolari, ipercolesterolemia, infiammazione acuta, infiammazione cronica.

In alternativa possono anche essere utilizzati per

Rinaldo PLEBANI
(Iscrizione Albo nr. 358/BM)

l'isolamento di aptoglobina in un campione biologico, preferibilmente sangue, plasma, siero, liquor cerebrospinale.

Vantaggiosamente è possibile utilizzare i peptidi dell'invenzione per legare l'aptoglobina libera, in modo da diminuirne il titolo e diminuirne quindi la capacità di interferire con ApoE. In questo caso, i peptidi possono essere funzionalizzati ad esempio ad un supporto solido per trattamento extracorporeo, che funzioni da filtro molecolare per la cattura dell'aptoglobina, oppure possono essere utilizzati in combinazione con anticorpi per marcare l'aptoglobina circolante allo scopo di rimuoverla con tecniche note.

Inoltre, la possibilità di isolare l'aptoglobina trova applicazione quando è necessario purificare aptoglobina a partire da liquidi biologici, ad esempio mediante cromatografia di affinità.

Infine, in quelle applicazioni veterinarie in cui è necessario determinare la quantità di aptoglobina presente in diversi liquidi biologici (come ad esempio sangue o latte), è possibile utilizzare i peptidi secondo l'invenzione, eventualmente utilizzando anche un anticorpo secondario per evidenziare la presenza di aptoglobina e quantificarne il livello.

La cattura extracorporea di aptoglobina può trovare

Rinaldo PLEBANI
(Iscrizione Albo nr. 358/BM)

applicazione laddove sia necessaria la determinazione e/o la purificazione dell'aptoglobina o di alcune sue isoforme, ad esempio nella diagnostica umana (emolisi intravascolare, stati infiammatori e oncologici specifici), nella diagnostica veterinaria (mastiti, disordini respiratori, infezioni in atto) o per la preparazione di aptoglobina purificata (ad esempio a scopo di ricerca, come standard per test diagnostici, come metodo per preparare la proteina per applicazioni terapeutiche).

Secondo la presente invenzione viene inoltre fornito un anticorpo monoclonale che riconosce specificamente uno dei peptidi secondo l'invenzione.

Ulteriori caratteristiche della presente invenzione risulteranno dalla descrizione che segue di alcuni esempi meramente illustrativi e non limitativi.

ESEMPI

Esempio 1

Identificazione dei siti di legame per l'aptoglobina sulla proteina ApoE.

La digestione di ApoE con CNBr è stata effettuata secondo un metodo standard, come riportato da Innerarity et al. [J Biol Chem. 1983;258:12341-12347], usando 13,5 nmoli di proteina umana purificata [Vinci Biochem, genotipo E3].

La frammentazione è risultata in una miscela di peptidi diversi. Si è quindi proceduto ad effettuare una

Rinaldo PLEBANI
(Iscrizione Albo nr. 358/BM)

elettroforesi su gel denaturante e riducente (18% di acrilammide) della miscela di peptidi ottenuta; l'elettroforesi è stata condotta come descritto da Schagger et al. [Anal Biochem. 1987;166:368-379]. Dopo l'elettroforesi, i gel sono stati fissati in acido acetico al 10% contenente 25% isopropanolo, e sono quindi stati colorati con Coomassie R-250 (0,05% nella soluzione di fissaggio) e decolorati in 10% acido acetico. Il risultato è riportato in Figura 1.

Per identificare i peptidi in grado di legare aptoglobina, l'elettroforesi è stata ripetuta omettendo il passaggio di colorazione e fissazione. Si è proceduto quindi ad un esperimento di western blotting, come descritto da Porta et al. [Zygote 1999;7:67-77]. In particolare, le proteine sono state trasferite sotto l'azione di un campo elettrico, utilizzando una unità per il blotting semi-dry [Schleicher & Schuell, Dassel, Germany], per 3 h a 4°C. La membrana è stata incubata per una notte a 4°C con 0,1 mg/ml di aptoglobina in TBS (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4) contenente 0,05% Tween-20 (T-TBS). Dopo ripetuti lavaggi con lo stesso tampone, la membrana è stata trattata (1 h, 37°C) con anticorpo antiaptoglobina rabbit anti-Hpt IgG (diluizione 1:100 in T-TBS), e subito dopo la membrana è stata incubata (1 h, 37°C) con anticorpo secondario GAR-HRP IgG (diluizione

Rinaldo PLEBANI
(Iscrizione Albo nr. 358/BM)

1:300), per essere quindi sviluppata mediante incubazione con 0,02% H₂O₂ e 4 mM 4-cloro-1-naftolo.

Le bande ottenute per western-blotting corrispondono a peptidi di ApoE in grado di legare aptoglobina, e sono mostrate in Figura 1; le corrispondenti bande del gel colorato mediante Coomassie sono quindi state tagliate, tripsinizzate e identificate mediante spettrometria di massa HPLC-ESI con tecniche standard. In particolare, la banda a 24 KDa che mostra maggiore reattività per l'aptoglobina è risultata corrispondere a due frammenti di ApoE, che coprono gli aminoacidi 65-272 e 68-272 rispettivamente. Per restringere ulteriormente il sito di legame con aptoglobina, si è effettuata una digestione di ApoE con trombina. Il taglio con trombina produce due frammenti (residui 1-191 e 216-299 rispettivamente), che sono stati esaminati per la loro capacità di legare aptoglobina esattamente come descritto per i peptidi derivati da taglio con CNBr. Il frammento di dimensioni maggiori è risultato legare aptoglobina, come illustrato in Figura 2, incrociando i dati delle due digestioni appare evidente che il sito di legame di ApoE per l'aptoglobina deve essere compreso tra gli aminoacidi D65 e R191.

Esempio 2

Sintesi di peptidi contenenti il sito di legame di ApoE per l'aptoglobina

Rinaldo PLEBANI
(Iscrizione Albo nr. 358/BM)

La sequenza 65-191 di ApoE, identificata come contenente il sito di legame per l'aptoglobina, è stata suddivisa in nove peptidi parzialmente sovrapposti, la cui sequenza è riportata in Figura 3. La sintesi è stata effettuata con chimica Fmoc standard in fase solida [Inbios Srl, Napoli], e tutti i peptidi sono stati biotinilati in posizione N terminale e amidati in posizione C terminale. La purezza di tutti i peptidi è risultata superiore al 98%, come evidenziato dal tracciato HPLC e dall'analisi di spettrometria di massa effettuata dal fornitore.

Esempio 3

Test di legame all'aptoglobina dei peptidi e loro identificazione

Allo scopo di identificare fra i 9 peptidi dell'esempio 2 quelli capaci di legare l'aptoglobina, è stata effettuata una batteria di test ELISA, essenzialmente come descritto in letteratura [Spagnuolo MS et al.]. In particolare, i pozzetti delle apposite piastre di microtitolazione sono stati incubati per una notte con 1 µg di aptoglobina in 50 µl di coating buffer (7 mM Na₂CO₃, 17 mM NaHCO₃, 1,5 mM NaN₃, pH 9,6) a 10°C. Aliquote di 55 µl di ogni peptide biotinilato (1, 3, 10, 30 µM) sono state incubate nei pozzetti (1 h a 37°C). I peptidi legati sono stati rivelati mediante incubazione con 60 µl di Avidin-HRP (diluizione 1:10000 in T-TBS con 0,25% BSA). Il colore sviluppato a 492

Rinaldo PLEBANI
(Iscrizione Albo nr. 358/BM)

nm è stato quantificato per via spettrofotometrica come descritto in letteratura [Porta A et al. *Zygote*. 1999;7:67-77].

I risultati ottenuti hanno dimostrato che le sequenze SEQ ID:1 (⁸⁸ETRARLSKELQAAQARL¹⁰⁴), presente in PE2 e PE3 come da Figura 3, e SEQ ID:2 (¹³¹EELRVRLASHLRKLRKLRL¹⁵⁰), presente in PE5 e PE6 come da Figura 3, costituiscono due diversi siti di legame di ApoE per l'aptoglobina.

Esempio 4

Test di competizione in vitro dei peptidi

Allo scopo di testare in vitro l'attività dei peptidi identificati, sono stati condotti degli esperimenti ELISA di competizione fra ApoE e i peptidi per il legame all'aptoglobina. In particolare, i pozzetti delle micropiastre utilizzate sono stati preincubati con ApoE, come descritto per l'aptoglobina nell'esempio 3. Sono quindi state preparate miscele di aptoglobina (1 μ M) con ciascuno dei peptidi esaminati (0, 1, 5, 10, o 20 μ M) in CB-TBS buffer (5mM CaCl₂, 0,2% BSA, 130 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,3); queste miscele sono state quindi tenute 2 h a 37°C e quindi incubate nei pozzetti con ApoE (2 h, 37°C). I peptidi sono stati utilizzati in forma lipidata; la lipidazione è stata condotta con le procedure descritte da Sparks et al. [Biochemistry. 1999;38:1727-1735]. Come anticorpi primari per la rivelazione della formazione dei

Rinaldo PLEBANI
(Iscrizione Albo nr. 358/BM)

complessi aptoglobina-ApE, sono stati usati rabbit anti-Hpt IgG (60 μ l diluiti 1:1500 in T-TBS con 0,25% BSA). Come anticorpo secondario, è stato usato GAR-HRP IgG (65 μ l di una diluizione 1:3000, 1 h a 37°C). Il colore sviluppato a 492 nm è stato quantificato per via spettrofotometrica come descritto in letteratura [Porta A et al. Zygote. 1999;7:67-77]. I campioni sono stati analizzati in triplicato. In Figura 4 è riportata la percentuale di aptoglobina legata in funzione della concentrazione di ogni peptide competitore utilizzato nel test. I dati relativi al peptide PE4, PE8 e PE9 non sono mostrati, perché in questo saggio questi peptidi hanno mostrato forte aggregazione. È evidente che i peptidi PE5 e PE6, contenenti la sequenza $^{131}\text{EELRVRLASHLRKLRKLRLL}^{150}$ (SEQ ID:2), riescono a competere in maniera più efficiente degli altri con la proteina intera. Pertanto, questa sequenza peptidica, utilizzata a dosi opportune, è in grado di liberare ApE dall'interazione con aptoglobina.

Inoltre, nella stessa figura è evidente come un certo grado di attività sia mostrato anche dal peptide PE2, contenente la sequenza $^{88}\text{ETRARLSKELQAAQARL}^{104}$ (SEQID:1), già identificata nell'esempio 3 come legante l'aptoglobina.

RIVENDICAZIONI

1. Uso di aptoglobina come ligando per apolipoproteina E.

2. Uso di aptoglobina per la preparazione di un medicamento per la diagnosi di una patologia selezionata nel gruppo costituito da Alzheimer, diabete, patologie cardiovascolari.

3. Peptide ligando dell'aptoglobina comprendente da 11 a 30 aminoacidi di una sequenza avente almeno 90% di identità con una sequenza selezionata tra SEQ ID:1 e SEQ ID: 2.

4. Peptide ligando dell'aptoglobina comprendente da 11 a 30 aminoacidi di una sequenza selezionata tra SEQ ID:1 e SEQ ID: 2.

5. Peptide secondo la rivendicazione 3 o 4, caratterizzato dal fatto che l'estremità N terminale è acetilata.

6. Peptide secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 3 a 5, caratterizzato dal fatto che l'estremità C terminale è ammidata.

7. Peptide come alla rivendicazione 3 o 4, caratterizzato dal fatto di essere un peptide selezionato nel gruppo costituito da polipeptide ricombinante, polipeptide sintetico e peptidomimetico.

8. Acido nucleico codificante per un peptide secondo

Rinaldo PLEBANI
(Iscrizione Albo nr. 358/BM)

le rivendicazioni da 3 a 7.

9. Acido nucleico secondo la rivendicazione 8, caratterizzato dal fatto che detto acido nucleico è selezionato nel gruppo costituito da RNA, DNA, e cDNA.

10. Vettore contenente l'acido nucleico secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 8 o 9.

11. Cellula ospite contenente una sequenza di acido nucleico secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 8 o 9.

12. Polimero ottenuto a partire da un monomero costituito da un peptide secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 3 a 7.

13. Polimero secondo la rivendicazione 12, caratterizzata dal fatto di essere ramificato o lineare.

14. Composizione farmaceutica comprendente un peptide secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 3 a 7 o un polimero secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 12 o 13.

15. Uso di un peptide secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 3 a 7, di un polimero secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 12 o 13, o di una composizione secondo la rivendicazione 14, per la preparazione di un medicamento per il trattamento di una patologia selezionata nel gruppo costituito da aterosclerosi, disbetalipoproteinemia, disordini cardiovascolari, ipercolesterolemia, infiammazione acuta,

Rinaldo PLEBANI
(Iscrizione Albo nr. 358/BM)

infiammazione cronica.

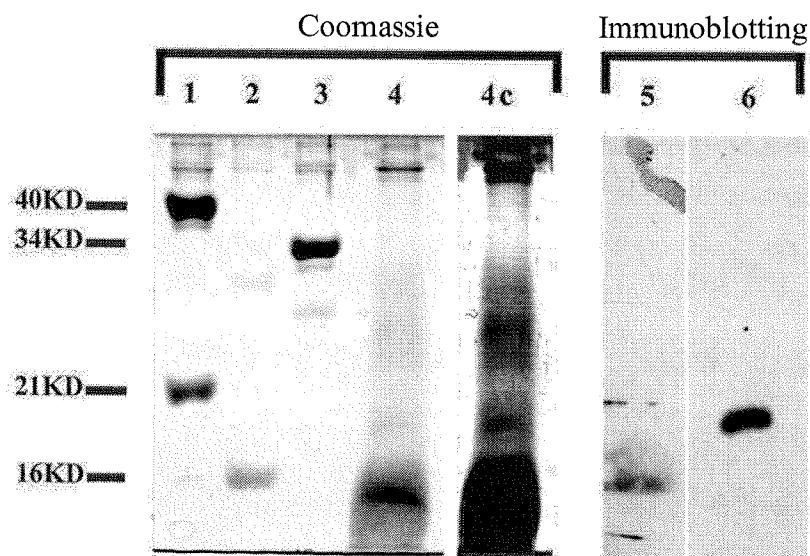
16. Uso di un peptide secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 3 a 7, di un polimero secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 12 o 13, o di una composizione secondo la rivendicazione 14, per isolare aptoglobina da un campione biologico.

17. Uso secondo la rivendicazione 17, caratterizzato dal fatto che detto campione biologico è selezionato nel gruppo costituito da sangue, plasma, siero, liquor cerebrospinale.

18. Anticorpo monoclonale che riconosca specificamente un peptide secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 3 a 7.

p.i.: BIOINDUSTRY PARK DEL CANAVESE S.P.A.

Rinaldo PLEBANI

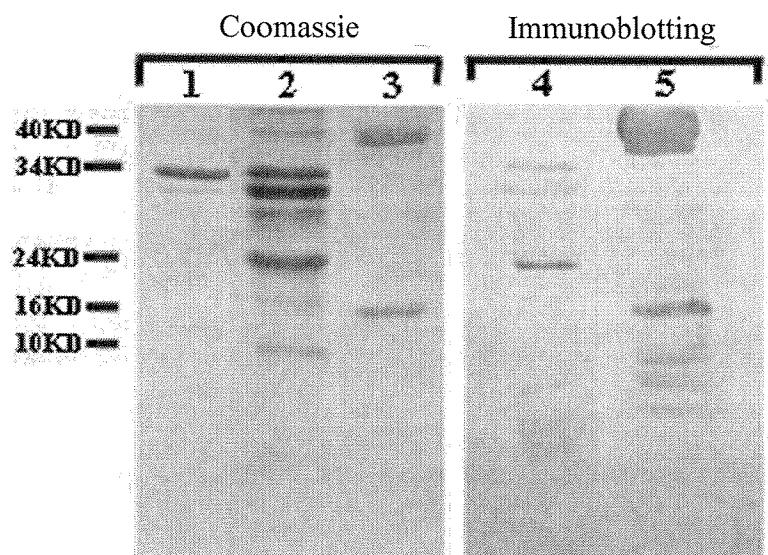


1. Standard di Aptoglobina
2. Standard di Emoglobina
3. Standard di ApoE
4. ApoE digerita con CNBr
- 4c. Come il precedente, a maggior contrasto
5. Aptoglobina legata da emoglobina
6. Aptoglobina legata da frammenti di ApoE

FIGURA 1

p.i.: BIOINDUSTRY PARK DEL CANAVESE S.P.A.

Rinaldo PLEBANI
(Iscrizione Albo nr. 358/BM)



- 1: Standard di ApoE**
- 2: ApoE digerita con trombina**
- 3: Standard di Aptoglobina**
- 4: Aptoglobina legata da frammenti di ApoE**
- 5: Standard di Aptoglobina**

FIGURA 2

p.i.: BIOINDUSTRY PARK DEL CANAVESE S.P.A.

Rinaldo PLEBANI
(Iscrizione Albo nr. 358/BM)

→ DETMKELKAYKSELE <u>EEOLTPVAEETRA</u>	PE1
→ <u>EEOLTPVAEETRA</u> RLSKELOAAQARL	PE2
→ <u>RLSKELOAAQARL</u> GADMED <u>VCGRILVQY</u>	PE3
→ <u>VCGRILVQY</u> RGEVQAMILGSTEELRVRL	PE4
→ <u>GSTEELRVRL</u> ASHLRKLKRLRLLRDAD	PE5
→ <u>LASHLRKL</u> RKRLRLLRDADDLQKRLA	PE6
→ <u>LRKRLRLLRDADDLQKRL</u> AVYQAGARE	PE7
→ <u>DADDLQKRL</u> AVYQAGAREGAERGLSA	PE8
→ <u>REGAERGLSAIRERL</u> GPLVEQGRVR	PE9

FIGURA 3

Percentuale di Atioglobina Legata

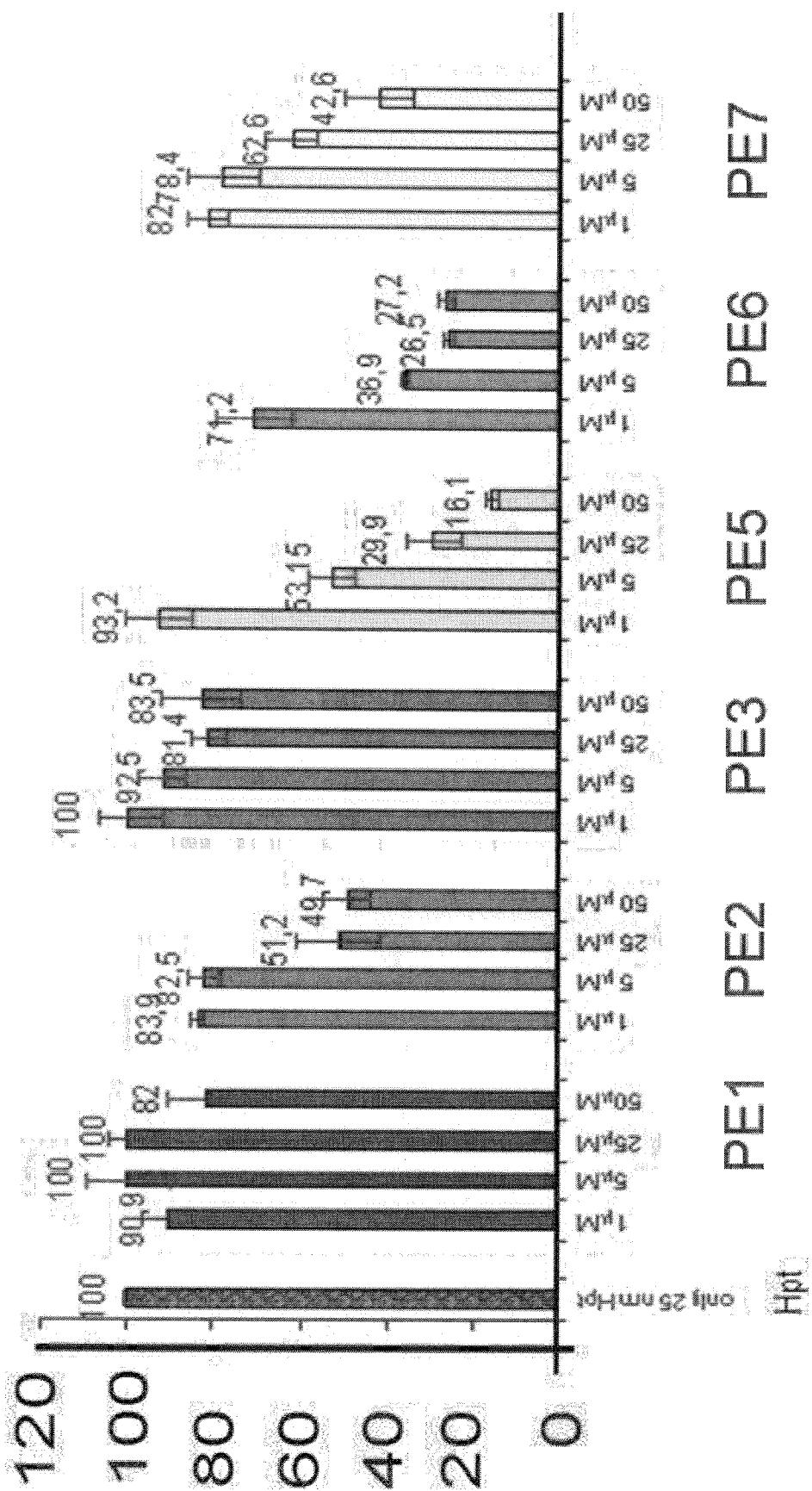


FIGURA 4.