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

DOMANDA NUMERO	**102006901426906**
Data Deposito	**27/06/2006**
Data Pubblicazione	**27/12/2007**

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	Q		

Titolo

GENE TEM8 (TUMOR ENDOTELIAL MARKER 8) E SUE FORME DI ESPRESSIONE ED USI DIAGNOSTICI E TERAPEUTICI

RM 2006 A 000337

SIB BI3716R

Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo: " Gene TEM8 (tumor endotelial marker 8) e sue forme di espressione ed usi diagnostici e terapeutici" a nome di BIOSOFT S.r.l. di Castelraimondo (MC)

DESCRIZIONE

La presente invenzione riguarda la modulazione dell'espressione di un gene noto come "tumor endothelial marker 8 (TEM8)" marcatore dell'endotelio tumorale 8, anche noto, in una sua variante di splicing, come il recettore 1 della tossina dell'antrace, e si riferisce ai livelli differenziali con cui il gene è espresso, nelle sue varianti, in cellule dotate di proprietà angiogeniche e migratorie quali le cellule dendritiche e le cellule tumorali metastatiche. La presente invenzione riguarda inoltre l'uso di sequenze geniche e polipeptidiche del TEM8 quali strumenti di diagnosi e prognostici dell'angiogenesi infiammatoria patologica e del potenziale metastatico delle cellule tumorali. L'invenzione riguarda inoltre l'uso delle stesse sequenze geniche e polipeptidiche come diretti strumenti terapeutici (es. iRNA, o peptidi che funzionino come decoy), l'uso in composizioni

immunogene o in vaccini atti ad indurre una risposta immunitaria contro cellule sovra-esprimenti i prodotti del gene TEM8. La presente invenzione riguarda infine i metodi di screening per l'identificazione di agonisti ed antagonisti dell'attività del TEM8 in ogni sua variante polinucleotidica e/o polipeptidica da usare in trattamenti di prevenzione o di terapia.

STATO DELLA TECNICA ANTERIORE

Molti tumori, circa il 15%, generano dai siti d'infezione e di infiammazione croniche, situazioni queste ultime ritenute in grado di iniziare il processo della trasformazione neoplastica (Kuper, H et al.; Shacter, E. et al.).

Fondamentalmente, l'infiammazione può essere definita come il processo attivato in risposta a danno tissutale, come la cicatrizzazione di una ferita e l'infezione, sostenute e mantenute da una rete di segnali chimici, prodotti soprattutto da leucociti, che permettono la proliferazione e la migrazione sia di fibroblasti sia di cellule endoteliali per la ricostruzione del tessuto normale.

Mentre nella cicatrizzazione di una ferita la proliferazione delle cellule e l'infiammazione finiscono dopo il riparo, ci sono diverse

condizioni patologiche in cui l'infiammazione e l'angiogenesi sono stabilmente attive.
Una angiogenesi eccessiva si verifica in malattie quali cancro, cecità diabetica, degenerazione maculare correlata all'età, artrite reumatoide, e psoriasi, ed in più di 70 altre condizioni, alcune delle quali sono considerate causa di trasformazione maligna. L'angiogenesi contribuisce sia alla capacità invasiva delle cellule tumorali sia alla loro capacità di metastatizzare in siti distanti.
L'infiammazione cronica ed il cancro sembrano avere un rapporto causale, come sostenuto da alcuni esempi: malattia di Crohn e cancro del colon, epatite C e carcinoma epatico, infezione cronica di *Elicobacter pilory* e cancro dello stomaco (Ernst, P. B. & Gold, B. D), papilloma virus umano e carcinoma della cervice, Epstein-Barr virus e linfomi.
Come detto precedentemente, l'angiogenesi è parte del processo di infiammazione. Recentemente, Carson-Walter et al. (2001) hanno riportato la presenza di almeno 46 trascritti particolarmente elevati nell'endotelio associato al tumore e che per questo hanno chiamato marcatori dell'endotelio tumorale (TEMs).
Il TEM8 fu scoperto come un gene espresso prevalentemente nell'endotelio tumorale, e il prodotto proteico di una sua variante di splicing è

stato recentemente identificato come il recettore per la tossina dell'antrace (ATRX1/TEM8). (Carson-Walter EB et al. 2001; Bradley KA et al. 2001; Bradley KA and Young JAT, 2033; Whittaker CA et al. 2002). TEM8 codifica una proteina transmembrana di tipo I, lunga 564 aminoacidi. Il dominio intracellulare è lungo 220 aminoacidi e la regione extracellulare (aa 1-318) contiene un dominio vWFA (aa 44-205) che, nelle integrine anche, quando presente, è noto come dominio I (Dickeson SK et al. 1998).

Sono state descritte tre diverse versioni del gene TEM8, che hanno subito splicing alternativo. Le varianti del TEM8 condividono la stessa porzione extracellulare amino-terminale ma differiscono in lunghezza e nella sequenza delle loro regioni citosoliche. La variante di splicing 1 (SV1) è la più lunga ed è il cDNA originale del TEM8 che codifica una proteina di 564 aminoacidi con una lunga coda citoplasmatica ricca in prolina. La variante di splicing 2 (SV2) codifica una proteina di 368 aminoacidi con una corta coda citoplasmatica. La variante di splicing 3 (SV3) codifica una proteina identica alle altre due nella maggior parte del dominio extracellulare, ma che differisce prima della regione transmembrana così da non contenere una sequenza di ancoraggio di membrana.

L'espressione del TEM8 sembra assente nella normale angiogenesi dell'adulto.
Tuttavia, sebbene i trascritti ATRX1/TEM8 siano stati trovati sovra-regolati selettivamente nei capillari di nuova formazione dell'angiogenesi tumorale, il confronto dei modelli di espressione tessuto-specifici del TEM8 dalla bioinformatica , suggerisce che questo presunto marker endoteliale tumore-specifico, sia più generalmente espresso in altri tipi di cellule, coinvolte nel rimodellamento della matrice extracellulare e nei processi di migrazione, come per esempio i leucociti e cellule endoteliali.
A sostegno delle previsioni della bioinformatica, è stato riportato (K.A. Hotchkiss et al.) in sperimenti *in vitro*, che l'espressione del TEM8 in cellule endoteliali stimola l'adesione e la migrazione di queste sul collagene, mediante regolazione delle interazioni cellula-matrice.
La migrazione delle cellule è una proprietà specifica delle cellule metastatiche, delle cellule endoteliali coinvolte nei processi angiogenetici, ma anche di cellule emopoietiche come le cellule dendritiche (DC), le più importanti cellule professionali del processamento e della presentazione degli antigeni al sistema immunitario, e la cui migrazione agli organi linfoidi secondari è essenziale perché esse esercitino i loro effetti regolatori immuni.

Recentemente, la proteina 2 della morfogenesi capillare (CMG2), l'omologo più simile al TEM8, è stato identificato come un secondo recettore per la tossina dell'antrace (ATR2) (Scobie HM et al. 2003). CMG2 condivide un'identità del 51% in aminoacidi con ATR1/TEM8, nel dominio I, ed è stata originariamente identificata in un pannello per geni differentemente regolati durante l'induzione capillare in vitro, ed è stato visto che la proteina CMG2 si lega agli ultimi due componenti della matrice extracellulare (ECM), collagene IV e laminina.

Allo stato attuale delle conoscenze non esistono strumenti per l'individuazione di una molecola legata ai processi pro-angiogenetici e migratori tipici ad esempio delle cellule dendritiche e di quelle metastatiche e che per questo sia utile nella diagnosi dell'angiogenesi infiammatoria patologica in generale e del potenziale metastatico dei tumori, né esistono strumenti per la profilassi e terapie anti-infiammatorie e antimetastatiche.
Tampoco esistono strumenti per il rilevamento dell'angiogenesi infiammatoria patologica al fine di monitorare l'efficacia di trattamenti antinfiammatori in uso e in sviluppo clinico.

SOMMARIO DELL'INVENZIONE.

La presente invenzione si fonda sulla scoperta che i processi pro-angiogenici e migratori tipici delle le cellule metastatiche tumorali e delle cellule dendritiche sono accompagnati da espressione o sopra-espressione del gene TEM8 nelle sue varianti. L'invenzione risponde quindi alle sopra indicate esigenze, individuando nel gene TEM8 un marker specifico dell'angiogenesi infiammatoria patologica, dello stato e del destino delle cellule dendritiche (DC) in relazione all'angiogenesi infiammatoria patologica e delle proprietà migratorie e metastatiche delle cellule cancerose.

La presente invenzione fornisce acidi nucleici derivanti dal TEM8 compresi i suoi prodotti di splicing alternativi e prodotti dovuti a modificazione post-trascrizionale, nonché le relative sequenze dei trascritti di mRNA e sequenze amminoacidiche, le quali proteine e/o mRNA sono associate i) ad una attività proangiogenica al sito dell'infiammazione; ii) ad un'attività pro-angiogenetica e migratoria delle cellule dendritiche; iii) con le proprietà migratorie delle cellule tumorali.

Pertanto oggetto principale dell'invenzione è un metodo di diagnosi di forme tumorali o di stati

collegati all'insorgere di forme tumorali scelti tra angiogenesi infiammatoria patologica, dell'angiogenesi tumorale, elevata capacità metastatica e/o migratoria delle cellule tumorali e delle cellule dendritiche comprendente le fasi in cui si rileva in un campione biologico la attivazione e l'entità dell'espressione del gene TEM8 o sue regioni, in una qualsiasi delle sue varianti dovute a differente *splicing* o modificazione post-trascrizionale.

Un secondo oggetto dell'invenzione è un metodo di prognosi di stati tumorali o di stati infiammatori in cui durante o a seguito del trattamento terapeutico antitumorale o antinfiammatorio si determina in un campione biologico la presenza e l'entità dell'espressione del gene TEM8 o sue regioni, in una qualsiasi delle sue varianti.

Un terzo oggetto dell'invenzione sono sonde genetiche capaci di ibridizzare con regioni specifiche del gene TEM8 in tutte le sue varianti o con sequenze aventi almeno 95% di omologia con queste, e primer per PCR per la determinazioni di varianti del gene TEM8 legate a forme tumorali.

Un quarto oggetto dell'invenzione sono i prodotti di espressione del gene TEM8 dovuto ad ogni

differente variante di splicing o di processamento post-trascrizionale o loro sequenze omologhe aventi almeno 90% di omologia per uso come agenti diagnostici o terapeutici.

Ulteriori oggetti dell'invenzione sono composizioni immunogene comprendenti il gene TEM8 posto in un vettore plasmidico idoneo alla immunizzazione genetica, o uno o più prodotti di espressione del gene TEM8, capaci di indurre una risposta immunitaria contro cellule sovra-esprimenti il gene TEM8, anticorpi poli o monoclonali specifici per i prodotti di espressione del gene TEM8, specificamente nel trattamento terapeutico di inibizione della angiogenesi infiammatoria patologica, della neoangiogenesi tumorale, della capacità metastatica e/o migratoria delle cellule tumorali e delle cellule dendritiche e come reagenti diagnostici.

Altri oggetti dell'invenzione saranno evidenti alla luce della descrizione dettagliata che segue.

I vantaggi implicati dall'invenzione sono quelli d'offrire informazioni di valore diagnostico, prognostico e terapeutico, tramite il rilevamento dell'espressione del TEM8 nelle forme dei suoi trascritti e/o dei suoi polipeptidi da reperti

patologici di angiogenesi infiammatoria. Ulteriore vantaggio è quello di rilevare la presenza di cellule metastatiche in reperti tumorali da tessuti primari, e le micrometastasi da linfonodi.

BREVE DESCRIZIOONE DELLE FIGURE

Figura 1: La figura illustra i risultati del saggio ELISA per la determinazione del VEGF nelle isoforme 165 e 121 secreto da cellule dendritiche: immature, iDC; maturate con cocktail di citochine (IL-6, IL-1β, TNF-α) in presenza di PGE2, mDC; maturate in assenza di PGE2, mDC - PGE2; maturate in presenza di Poly I:C in sostituzione di PGE2, mDC+PolyIC.

Il rilevamento è stato effettuato mediante kit della Pierce Biotechnology, seguendo le istruzioni della azienda fornitrice.

Figura 2: La messaggero illustra i risultati dell'analisi RT-PCR di trascritti di CMG2 (pannello A) e di TEM8 (pannello B) su cellule dendritiche immature (iDC) e maturate con cocktail contenente PGE2 (mDC). Mw rappresenta i pesi molecolari di riferimento.

I numeri indicano i diversi pazienti da cui provengono le cellule dendritiche. La lettera C indica il controllo in assenza di templato.

Nella parte inferiore di ciascun pannello sono evidenziati i prodotti di PCR di un gene di riferimento GADPH.

Le frecce indicano le posizioni di corsa elettroforetica dei frammenti GMC2 per il pannello A e del TEM8 per il pannello B.

Figura 3; La figura illustra i risultati del Real time RT-PCR per la determinazione dei livelli di espressione del TEM8 e del CMG_2 in relazione alla maturazione da monociti precursori (Mo) a cellule DC mature (mDC) e in relazione al cocktail di maturazione (CTK) usato (citochine+ PGE_2 o citochine + Poly IC).

1) trascritti TEM8 delle iDC vs Mo; 2) trascritti TEM8 delle mDC (citochine +PGE_2) vs cellule dentritiche immature (iDC); 3) trascritti CMG2 delle mDC (citochine +PGE_2) vs iDC; 4) trascritti TEM8 delle mDC (citochine+PolyI:C) vs iDCs.

Calibratori; Mo(1) e iDC (2,3 e 4).Le barre indicano i valori medi di 5 determinazioni e le linee indicano il valore minimo e massimo delle determinazioni per ciascun gruppo.

Figura 4: la figura illustra i risultati di espressione in Real-Time RT-PCR del TEM8 e del CMG2 in cellule MDA-MB231 relative a quella in cellule

ZR75-1 presa come calibratore dopo normalizzazione rispetto al GADPH.

Le barre in grigio scuro e in grigio chiaro non bordate si riferiscono all'espressione del TEM8 nelle cellule MDA-MD231 e ZR75-1 tenute per 48h in condizioni di crescita in terreno completo o in assenza di siero, rispettivamente; le barre bordate si riferiscono all'espressione del CMG2 per le stesse cellule e nelle stesse condizioni di coltura.

Figura 5: La figura illustra la reattività degli anticorpi anti-TEM8 prodotti via vaccinazione a DNA con differenti plasmidi integranti le sequenze nucleotidiche SEQ ID NO: 4 SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO: 6. La produzione di anticorpi specifici per le proteine ricombinanti del TEM8 sono state evidenziate con analisi western blotting contro la proteina ricombinnte del TEM8 seq ID...

DESCRIZIONE DETTAGLIATA

Il gene "Tumor endotelial marker 8 (TEM8) umano è descritto in letteratura e di esso si conoscono tre diverse varianti dovute ad alternativo modo di *splicing*.

Le varianti del TEM8 umano condividono la stessa porzione extracellulare amino-terminale ma

differiscono in lunghezza e nella sequenza delle loro regioni citosoliche.

La variante di splicing 1 (SV1) è la più lunga ed è il cDNA originale del TEM8 che codifica una proteina di 564 aminoacidi, con una lunga coda citoplasmatica ricca in prolina. La sequenza nucleotidica tra le posizioni 144 e 1950 di SV1 è riportata di seguito come SEQ ID NO: 1 (Gene Bank accession number AF_279145), mentre la corrispondente sequenza di 564 amino acidi è riportata come SEQ ID NO: 1bis.

La variante di splicing 2 (SV2) codifica una proteina di 368 aminoacidi con una corta coda citoplasmatica. La sequenza nucleotidica tra le posizioni 144 e 1454 del cDNA è riportata di seguito come SEQ ID NO: 2 (Gene Bank accession number NM_053'34), mentre la corrispondente sequenza di 368 amino acidi codificati è riportata come SEQ ID NO: 2bis.

La variante di splicing 3 (SV3) codifica una proteina identica alle altre due nella maggior parte del dominio extracellulare, e che non contiene una sequenza di ancoraggio alla membrana. La sequenza di cDNA della variante SV3 tra le posizioni 144 e 2143 è riportata di seguito come

SEQ ID NO: 3 (Gene Bank accession number NM_018153), mentre la corrispondente sequenza di 317 amino acidi codificati è riportata come SEQ ID NO: 3bis.

In accordo con la presente invenzione sono state inoltre evidenziate nel gene TEM8 zone di alta variabilità che comprendono le porzioni del gene SV1 limitate tra le posizioni 901-1040 e 1387-1950, e la porzione della variante SV3 limitata dalle posizioni 901 e 1145.

Queste zone sono state amplificate operando su differenti cellule tumorali attraverso RT-PCT utilizzando le copie di primer di sequenza SEQ ID NO: 7 (FW) e SEQ ID NO:8 (RV) ovvero SEQ ID NO:9 e SEQ ID NO:10 ovvero SEQ ID NO:11 (FW) e SEQ ID NO:12 (RV).

Sono state così individuate nuove forme varianti del gene TEM8 che presentano nella zone 1387 a 1950 della SV1 e 901 1145 della SV3 importanti delezioni e/o mutazioni di sequenza precedentemente mai osservate. Tra queste sono state isolate nuove varianti che presentano nella regione che inizia dalla posizione 1387 della SEQ ID NO:1 tre nuove sequenze indicate come SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 e SEQ ID NO:6. I prodotti di amplificazione così

ottenuti codificano prodotti di espressione aventi sequenza polipeptidica comprendenti le sequenze indicate come SEQ ID NO: 4bis, SEQ ID NO:5bis e SEQ ID NO:6bis.

Senza voler legare l'invenzioni a teorie scientifiche non ancora del tutto comprovate, si sottolinea che le nuove varianti del gene TEM8 sono state osservate ed isolate in cellule tumorali. È probabile quindi che queste varianti possano essere legate a situazioni tumorali specifiche di una certa tipologia cellulare o di una certa fase di sviluppo del processo di insorgenza tumorale. Per questo le sequenze nucleiche della presente invenzione non solo sono genericamente utilizzabili come marker tumorali, ma possono essere utilizzate nella diagnosi puntuale di specifiche forme tumorali o di situazioni pre-tumorali collegate all'insorgere di tumori quali sono l'angiogenesi infiammatoria patologica, l'angiogenesi tumorale, la capacità metastatica e/o migratoria delle cellule tumorali e la capacità migratoria delle cellule dendritiche.

Il metodo diagnostico secondo l'invenzione si basa quindi sulla rilevazione della presenza e/o dell' espressione o della sovra-espressione del gene TEM8

in tutte le sue varianti dovute a differente tipo di splicing o dovute a differente processamento post-trascrizionale. Forme di realizzazione specifiche dell'invenzione sono metodi diagnostici capaci di riconoscere in campioni biologici la presenza di cDNA comprendenti le specifiche sequenze indicate come SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:3.

Tuttavia qualsiasi sequenza alternativa di cDNA differente dalla quelle sopra viste, ma ottenuta come prodotto di amplificazione del dominio (o porzione) extracellulare oppure del dominio intracellulare del gene TEM8, in particolare delle porzioni di cDNA delimitate dalle posizione 901 e 1040 oppure 1387 e 1950 della sequenza SEQ ID NO:1, o 901 e 1145 della sequenza SEQ ID NO:3 sono ugualmente utilizzabili in un metodo diagnostico secondo l'invenzione. Esempio di tali sequenze alternative sono le sequenze SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:6, così come qualsiasi altro prodotto di amplificazione ottenuto per RT-PCR utilizzando le copie di primer aventi sequenze SEQ ID NO:7 (FW) e SEQ ID NO:8 (RV) oppure SEQ ID NO:9 (FW) e SEQ ID NO:10 (RV) oppure SEQ ID NO:11 (FW) e SEQ ID NO:12 (RV).

Infine sono utilizzabili nei metodi dell'invenzione tutte quelle sequenze di acidi nucleici aventi almeno il 95% di omologia e/o la capacità di ibridizzare sotto condizioni di alta stringenza, con il TEM8 e con ogni sua variante o frammento sopra indicato, per esempio un DNA a singolo filamento, un mRNA o un RNAi interferente.

La valutazione della presenza e del livello di espressione del gene TEM8 nelle sue varianti è effettuata attraverso sonde genetiche o attraverso agenti in grado di rilevare i corrispondenti prodotti di espressione.

RILEVAZIONE CON SONDE GENETICHE

Sonde genetiche sono sequenze di DNA o RNA, normalmente in singolo filamento, in grado di ibridizzare in determinate condizioni di stringenza con il cDNA del gene TEM8, in particolare con le porzioni che identificano gli esoni del gene. Sonde preferite sono quelle in grado di ibridizzare in condizioni di alta stringenza, come definite negli esempi, con le sequenze nucleotidiche SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:6, oppure con qualsiasi sequenza del gene TEM8 amplificate per PCR utilizzando le copie di primer aventi sequenze SEQ ID NO:7 (FW) e SEQ ID

NO:8 (RV) oppure SEQ ID NO:9 (FW) e SEQ ID NO:10 (RV) oppure SEQ ID NO:11 (FW) e SEQ ID NO:12 (RV) oppure con i corrispondenti trascritti di RNA. Tali sonde sono normalmente marcate con molecole o elementi reporter in grado di evidenziare il complesso di ibridazione ed introdotte nella sonda mediante tecniche note quali PCR, ricombinazione o tecniche enzimatiche. Idonee sostanze marcanti sono nucleotidi contenenti elementi radioattivi quali P^{32}-dNTP o S^{35}-dNDP oppure sostanze fluorescenti o chemioluminescenti.

Alternativamente le sonde possono essere evidenziate dopo formazione del complesso di ibridazione mediante opportuni anticorpi specifici per la sonda.

RILEVAZIONE DEI PRODOTTI DI ESPRESSIONE

In una ulteriore forma di realizzazione dell'invenzione l'espressione del gene TEM8 nelle sue varianti è determinata attraverso rilevazione sul campione biologico della presenza dei prodotti di espressione dei cDNA sopra visti. Tali prodotti di espressione sono polipeptidi aventi sequenze scelte tra: SEQ ID NO:1bis; SEQ ID NO:2bis; SEQ ID NO:3bis; SEQ ID NO:4bis; SEQ ID NO:5bis; SEQ ID NO:6bis oppure scelte tra tutte le sequenze

polipeptidiche corrispondenti ai prodotti di amplificazione per PCR del gene TEM8 utilizzando le copie di primer aventi sequenze SEQ ID NO:7 (FW) e SEQ ID NO:8 (RV) oppure SEQ ID NO:9 (FW) e SEQ ID NO:10 (RV) oppure SEQ ID NO:11 (FW) e SEQ ID NO:12 (RV).

Va da sé che i metodi fin qui visti non sono utilizzabili per la sola finalità diagnostica, ma anche con finalità prognostica e di valutazione dell'efficacia di trattamenti terapeutici finalizzati alla cura di stati tumorali e/o antinfiammatori e quindi alla prognosi di tali stati. In accordo con questo aspetto dell'invenzione, si determina, una o più volte durante il trattamento terapeutico o a termine, su un campione biologico del paziente, la presenza e l'entità dell'espressione del gene TEM8 o sue regioni, in una qualsiasi delle varianti dovute a differente *splicing* o a modificazione post-trascrizionale, controllando nel tempo le variazioni dei risultati osservati.

I campioni biologici sui quali si conducono i metodi diagnostici dell'invenzione sono prelievi umani ematici, sinoviali, pleurici, bioptici o prelievi di tessuto tumorale o campioni di cellule

dendritiche in vivo ed ex vivo.

Le proteine espresse dalle varianti del gene TEM8, nonché i loro frammenti e loro derivati sono utili come immunogeni per la produzione di anticorpi poli o monoclonali o frammenti funzionali di anticorpo.

ANTICORPI

Gli anticorpi secondo l'invenzione sono utilizzati tanto in metodi diagnostici per il riconoscimento in campioni biologici dei prodotti di espressione del gene TEM8 nelle sue varianti che in metodi di trattamento terapeutico.

Gli anticorpi utilizzabili nei metodi dell'invenzione legano direttamente le sequenze polipeptidiche del TEM8, eliminandone o alterandone le funzioni sia per azione biochimica diretta sia per azione immunologica effettrice via complemento o via cellule citotossiche. Tali funzioni sono la funzione nei processi di neo-angiogenesi, la funzione immunologica delle cellule dendritiche o la funzione migratoria e metastatica delle cellule tumorali. Tra gli anticorpi anti-TEM8 forniti dalla presente invenzione sono compresi quelli che legando il TEM8 agiscono come strumento analitico o diagnostico per la rilevazione del TEM8 in vitro e in vivo.

Anticorpi specifici per i vari prodotti di espressione sono ottenibili con le tecniche convenzionali ben note all'esperto attraverso immunizzazione di animali con la proteina intera, porzioni della proteina o peptidi, preferibilmente legati a proteine carrier che ne potenzino l'attività immunogenica. L'ottenimento di anticorpi monoclonali attraverso produzione di linee di ibridoma è effettuato in accordo a metodi dettagliatamente descritti in letteratura. Alternativamente animali da laboratorio possono essere immunizzati con vaccini a DNA comprendenti un plasmide o un vettore virale di espressione che contenga una delle sequenze nucleotidiche TEM8 dell'invenzione, opzionalmente legata ad una seconda sequenza che codifica una proteina carrier. Il plasmide o vettore una volta introdotto nella cellula ospite esprimerà la proteina o proteina ibrida capace di stimolare la formazione di anticorpi, come descritto negli esempi.

PRIMER

Ulteriori aspetti dell'invenzione sono gli specifici Primer per PCR e RT-PCR che permettono di amplificare domini delle variabili di splicing SV1, SV2 e SV3 del gene TEM8 caratterizzate da elevata

variabilità. Esempi di tali primer sono rappresentati dalle sequenze SEQ ID NO:7 (FW) e SEQ ID NO:8 (RV) che amplificano la sequenza 901-1040 di SV1 oppure dalle sequenze SEQ ID NO:9 (FW) e SEQ ID NO:10 (RV) che amplificano la sequenza 1387-1950 di SV1, oppure dalle sequenze SEQ ID NO 11 (FW) e SEQ ID NO: 12 (RV) che amplifica la sequenza 901 a 1145 di SV3.

VETTORI DI CLONAGGI O ESPRESSIONE

In accordo a metodi esaurientemente descritti in letteratura, tutte le sequenze nucleotidiche dell'invenzione possono essere introdotte in opportuni vettori di clonaggio e di espressione per la produzione dei corrispondente prodotti ricombinanti in cellule ospiti, come descritto negli esempi. Le sequenze nucleotidiche del TEM8 sono fiancheggiate da idonee sequenze di controllo che ne dirigono e regolano la trascrizione e la traduzione. Opportune cellule ospiti sono cellula procariotica o eucariotica, in particolare cellule animali o umane trasformate attraverso il vettore contenete le sequenze di interesse.

TRATTAMENTI TERAPEUTICI

Infine i materiali nucleotidici e polipeptidici dell'invenzione derivati dalle differenti varianti

del gene TEM8, nonché i corrispondenti anticorpi trovano applicazione come medicamenti nel trattamento di forme tumorali o di stati collegati all'insorgere di forme tumorali quali l'angiogenesi infiammatoria patologica, l'angiogenesi tumorale, la capacità metastatica e/o migratoria delle cellule tumorali e la capacità migratoria delle cellule dendritiche.

Vengono utilizzati come principi attivi nucleotidici RNA interferenti, RNA antisenso, o altro materiale nucleico capace di inibire o modulare l'espressione del gene TEM8 così come peptidi che funzionino come decoy.
Alternativamente sono usati come principi attivi assieme ad eccipienti farmacologicamente accettabili prodotti polipeptidici di espressione in composizioni immunogene capaci di indurre una risposta immunitaria contro cellule sovra-esprimenti i prodotti del gene TEM8.

In conclusione la presente invenzione trova applicazione nella caratterizzazione di cellule tumorali mammarie umane, al fine di valutarne il potenziale metastatico. e la loro capacità di

espressione del gene TEM8 sia in vivo sia in reperti ex vivo.

Inoltre, l'invenzione trova applicazione nella caratterizzazione di cellule dendritiche umane particolarmente ma non esclusivamente destinate alla produzione di vaccini cellulari.

A questo scopo l'invenzione fornisce gli strumenti necessari per il rilevamento dell'espressione differenziale di sequenze polinucleotidiche e polipeptidiche del gene TEM8 e suoi prodotti di splicing, nelle cellule dendritiche umane, in relazione al loro stato di sviluppo e funzionale.

L'invenzione trova inoltre applicazione nella caratterizzazione dello stato di propagazione del processo dell'infiammazione cronica e del potenziale evolutivo della stessa. In questo ambito essa trova applicazione anche come indicatore della efficacia terapeutica dei farmaci antinfiammatori attualmente in uso e sviluppo in terapia.

In una ulteriore applicazione la presente invenzione fornisce la formulazione e i metodi per l'uso di polipeptidi e/o polinucleotidi del TEM8 in composizioni immunogeniche per l'induzione di immunità contro le cellule bersaglio quali le

cellule tumorali, le cellule endoteliali ed ogni altra cellula che sovraesprime i prodotti del TEM8 Sono anche forniti metodi diagnostici per il rilevamento di malattie associate alla sovraespressione del gene TEM8 in tutte le sue varianti o dei polipeptidi correlati, compreso l'uso di tale rilevamento come metodo di marcatura prognostica nei tumori, ed in ogni altra malattia caratterizzata da infiammazione cronica, e sono altresì forniti metodi per il trattamento di tali patologie.

L'invenzione permette infine lo sviluppo di metodi di screening per l'identificazione di nuove molecole ligandi del TEM8, principalmente ma non esclusivamente per uso farmacologico.

L'invenzione è di seguito illustrata con tutti i dettagli sperimentali nei seguenti esempi.

Esempio 1: Assegnazione del fenotipo pro-angiogenetico delle cellule dendritiche.

Il potenziale pro-angiogenetico delle cellule dendritiche maturate, in condizioni "clinical grade", con i più comuni cocktail usati nelle trials cliniche, cioè IL1β, IL6, TNFα e PGE2 o con lo stesso cocktail sostituendo il PGE2 con il Poli I:C, è stato valutato mediante analisi ELISA

misurando i livelli di VEGF secreto nel mezzo di coltura.

Il VEGF è prodotto per splicing alternativo di un singolo gene in isoforme multiple, tra le quali le più comuni sono la VEGF 121 e la VEGF 165. La Fig.1 illustra la produzione del VEGF (le forme 165 e 121 sono entrambe riconosciute dagli anticorpi forniti con il kit della Pierce Biotechnology Inc., Endogen human VEGF ELISA Kit) nei supernatanti delle DC in coltura. L'analisi è stata eseguita come segue: i supernatanti delle DC immature, delle DC maturate con il cocktail di citochine completo e delle cellule tumorali non trattate e trattate con il cocktail completo, vengono raccolti e utilizzati per la quantizzazione del VEGF, secondo il protocollo fornito dal kit.

A questo scopo, alla piastra da 96 pozzetti viene fatto aderire l'anticorpo anti-human VEGF 165, il quale cattura il VEGF presente nei campioni aggiunti alla piastra. L'aggiunta nei pozzetti di 50 µl di campione è seguita da 2 ore di incubazione a temperatura ambiente. Dopo 3 lavaggi con Wash Buffer vengono aggiunti 100 µl di anticorpo biotinilato ad ogni pozzetto; tale incubazione di 1 ora è seguita da 3 lavaggi e da 30 minuti di

incubazione con Streptavidin-HRP Reagent. L'aggiunta successiva di 100 µl di substrato permette di effettuare la misura dell'assorbanza a 450 nm.

La Fig.1 mostra la produzione del VEGF da parte delle cellule dendritiche maturate in cocktail completo (citochine + PGE2). Una trascurabile produzione di VEGF è osservata nelle cellule dendritiche immature o nelle cellule dendritiche maturate con Poli I:C.

Esempio 2: Inibizione della produzione del fattore anti-angiogenetico IL-12 in DC maturate con Poli I:C

Poiché è stato riportato che il VEGF inibisce la produzione di IL-12 e la differenziazione della risposta immunitaria Th1, è stata valutata la capacità delle DC maturate con il cocktail contenente PGE2 , di produrre IL-12 biologicamente attiva.

L'interleuchina 12 p70 (IL-12p70), un etrodimero composto dalle subunità p35 e p40, è la principale citochina della induzione di una risposta TH-1 e di una potente attività anti-angiogenetica. Di contro, in assenza di espressione di p35, il monomero e

l'omodimero di IL-12p40, secreti dalle DC, agiscono da antagonisti della IL-12.

La determinazione di IL-12p40 e IL-12p35 viene effettuata tramite real-time RT-PCR, secondo le seguenti procedure: dopo 48 ore, i supernatanti vengono raccolti e conservati a -20°C fino a che non vengono eseguiti saggi per le misurazioni delle citochine. Dopo eliminazione del mezzo di coltura, viene effettuata l'estrazione dell'RNA.

Le cellule vengono lisate mediante incubazione con un buffer di lisi che inattiva immediatamente l'RNAsi e crea appropriate condizioni di legame che favoriscono l'assorbimento dell'RNA alla membrana di silice. Il DNA contaminante viene rimosso mediante una soluzione di DNasi I che viene direttamente applicata sopra la membrana di silice durante la preparazione. Passaggi di semplice lavaggio con due diversi buffer rimuovono sali, metaboliti e componenti cellulari macromolecolari. L'RNA puro è eluito in condizioni di bassa forza ionica con acqua RNasi-free.

La concentrazione di RNA viene determinata spettrofotometricamente misurando l'assorbanza a 260nm e l'integrità dell'RNA viene confermata

mediante elettroforesi su un gel d'agarosio all'1,2%.

1µg di RNA totale viene successivamente utilizzato per sintetizzare un singolo filamento di DNA complementare (cDNA) mediante RevertAid H Minus First Strand cDNA Syntesys Kit (Fermentas, Life Sciences).

L'RNA (1 µg) viene incubato con H_2O e 1µl di Oligo dT Primer (0,5µg/µl) per 5 minuti a 70°C. Alla reazione vengono aggiunti 2µl di 10x Reaction Buffer, 2µl di inibitore delle RNAsi e 2µl di dNTPs mix (10nM). La mix di reazione viene scaldata a 37°C per 5 minuti.

Alla reazione viene poi aggiunto 1µl di RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (200u/µl) (volume finale di 20 µl) e incubata per 60 minuti a 42°C. La reazione viene scaldata a 70°C per 10 minuti per inattivare la Trascrittasi Inversa.

Il cDNA risultante viene utilizzato per determinare l'espressione del TEM8 e del CMG2 mediante Real-time.

La RT-PCR real-time viene eseguita utilizzando MX3000P Real-time PCR system (Stratagene) e BRILLIANT SYB Green QPCR Master mix secondo il protocollo fornito dalla ditta. Dopo denaturazione

iniziale per 10 minuti a 95°C, vengono eseguiti 40 cicli con passaggi di 94°C per 48 secondi, 60°C per 48 secondi, e 72°C per 48 secondi, con lettura della fluorescenza al termine di ciascun ciclo.

I seguenti ologonucleotidi vengono usati come primers per la PCR: per TEM8, FW: ACAgggTCCTCTgCAgCTTCAA e Rev: gTCAgAACAgTgTgTggTggTgAT; per CMG2, FW: gTgTTTATTgTgTTggTgTCCTTg e Rev: gACAATCTgAAATTCCTCCCC. I primers amplificano una porzione di 200 bp nel dominio eztracellulare del TEM8 e del CMG2. Le analisi vengono eseguite con MxPro QPCR Software versione 3.00 per MX3000P. I valori ottenuti sono all'interno del range lineare di una curva standard e vengono normalizzati per produrre la stessa quantità di RNA messaggero (mRNA) della gliceraldeide fosfato deidrogenasi (GAPDH) (Fw GADPH: CAACAgCgACACCCACTCCT e Rev GADPH: AggCCATgTgggCCATgA). Tutti i prodotti di PCR vengono analizzati mediante determinazione delle curve di melting come pure mediante elettroforesi su gel d'agarosio. I risultati riportati nella (**Tabella A**) indicano che le DC maturate in cocktail con PGE2 producono alti livelli di mRNA di IL-12p40 ma non p35, inibendo quindi la produzione di IL12-

p70, e spostando così il bilancio tra i fattori pro e anti-angiogenetici a favore dell'angiogenesi.
La stessa indicazione viene dalla misurazione della proteina p40 mediante saggio Elisa.

Tabella A: Analisi ELISA dei sopranatanti delle colture di DC immature e maturate in cocktail completo.

TEST [x]		iDC	mDC
ELISA	IL-12 p40 *	44	>1350
	IL-12 p70**	nd	nd
	IL-10 ***	6,7	70
	INFγ ***	5,16	14

[x] pgx10^6 cellulle/ml; *, **, *** si riferiscono a tre diversi kit

I supernatanti delle DC immature e delle DC maturate con il cocktail di citochine vengono raccolti e utilizzati per la quantizzazione dell'IL-12 p40 mediante saggio ELISA (Biosource, Nivelles, Belgium) secondo il protocollo fornito dal kit.

100 µl dei supernatanti vengono aggiunti nei pozzetti della piastra pre-cotata e incubati per 2 ore a temperatura ambiente e in agitazione. Ai 3 lavaggi con Working Wash Buffer segue un'incubazione di 2 ore a temperatura ambiente e in agitazione con l'anticorpo anti-IL-12p40 HRP-coniugato. Dopo 3 lavaggi con Working Wash Buffer vengono aggiunti 200 µl della soluzione cromogenica; la piastra viene incubata per 30

minuti a temperatura ambiente, al buio. Successivamente vengono aggiunti 50 µl di Stop Solution ed effettuata la lettura a 450 nm. I risultati del saggio sono riportati nella tabella A.

Esempio 3: Espressione del gene TEM8 in relazione al differenziamento monociti/DC mature.

Analisi convenzionali di RT-PCR mostrano (Fig2) che, mentre il gene CMG2 è abbondantemente ed uniformemente espresso nei monociti (Mo), nelle DC immature e in quelle maturate con coktail contenente PGE2, l'espressione del TEM8 è ristretta : alle DC matura con PGE2.

La quantificazione relativa dell'espressione dei geni operata mediante Real-Time PCR quantitativa (Q-RT-PCR), conferma che tanto le DC immature quanto i Mo precursori, accumulano quantità più grandi di trascritti CMG2 rispetto a quelle dei trascritti del TEM8 (Tabella B, linea 1 e 2), mentre non si hanno variazioni significative delle attività trascrizionali dei due geni nel passaggio dai Mo precursori a DC immature (Tabella B, linea 3 e 4).

Al contrario, le DC trattate con cocktail contenente PGE2, aumentano in modo selettivo

l'espressione del TEM8 di oltre 15 volte rispetto alle cellule immature o ai Mo precursori o alle DC maturate con Poli I:C (Fig 3 e Tabella B linea 5), indicando con ciò che l'aumento di trascrizione del TEM8 è strettamente PGE2-dipendente.

Tabella B: Dati real-time RT-PCR dell'espressione relativa di trascritti di CMG2 rispetto al TEM8 nella maturazione da monociti a cellule dendritiche mature.

CELLS	mRNA ratio	medium value (range)
Mos	CMG2 vs TEM8	143 (70-250)
iDCs	CMG2 vs TEM8	230 (50-461)
mDCs	CMG2 vs TEM8	150 (60-278)

Esempio 4: Analisi della espressione del TEM8 e del CMG2 in cellule tumorali.

Linee cellulari di carcinoma mammario metastatico umano ZR75-1 e MDA-MB231, vengono mantenute in coltura in ambiente umidificato al 5% di CO_2 in terreno Dulbecco's modified Eagles medium (D-MEM) (Cambrex) integrato con 10% di siero fetale bovino

(FBS) (Cambrex), 1% di L-glutamina, 1% di penicillina/streptomicina.

Le procedure per la determinazione della espressione del TEM8 e del CMG2 in real-time RT-PCR sono le stesse riportate nell'esempio 2.

Utilizzando le ZR75-1 come calibratore si rileva un livello di espressione del TEM8 di almeno 150 volte più alto nelle MDA-MB231 in assenza o in presenza di siero. L'espressione del CMG2 nelle MDA-MB231 aumenta di sole 30 volte (Fig. 4).

Esempio 5: Varianti del TEM8 nelle cellule tumorali mammarie

Utilizzando i primers delle ID seq 9 e 10 è stata amplificata per PCR la regione corrispondente sulla Seq ID n 1 e in seguito a clonaggio in pGEM T easy vector e successivo sequenziamento die cloni, sono state trovate 3 varianti trascrizionali portanti variazioni di delezione e frameship le cui sequenze sono indicate come SEQ ID n 4, 5 e 6 rispettivamente.

Esempio 6: Costruzione del vettore di espressione eucariota per il TEM8

Il vettore d'espressione pcDNA3.1 (Invitrogen) è stato scelto per clonare la porzione extracellulare e il dominio transmembrana del gene TEM8 fusa con

il dominio extracellulare del gene Flt-3 per la porzione di sequenza del TEM8 (Gene Bank accession number: 010229).

La porzione del gene TEM8 è stata ottenuta tramite PCR utilizzando come DNA stampo un cDNA ottenuto da un RNA totale estratto da tumori di topi FVB/233 transgenici per l'oncogene neu di ratto (Charles River).

Per l'amplificazione sono stati utilizzati i primers:

FWm8F13 – ggggTACCggCCgCCgCgAggATgggggA

RVEcoRIm8 – ggTggAATTCCTAgCACAgCAAATAAgTgTCTTC

con le seguenti condizioni di PCR:

95°C 5'		
95°C 1'	}	35 cicli
64°C 1'		
72°C 2'		
72°C 10'		

La porzione del gene Flt-3 è stata ottenuta mediante PCR utilizzando come templato il plasmide pNGVL-mFL (Michigan, University) esattamente come descritto in Hung et al 2001.

Successivamente i due prodotti di PCR ed il vettore sono stati doppio digeriti con gli enzimi di

restrizione (Fermentas) HindIII/KpnI (per il Flt-3), KpnI/EcoRI (per il TEM8), HindIII/EcoRI (per il vettore) e dopo purificazione, effettuata con il Kit NucleoSpin Extract (Macherey-Nagel), sono stati clonati utilizzando una T4ligasi (Fermentas). Il prodotto di *ligation* è stato quindi trasformato tramite elettroporazione (1 pulse a 2,5kV per 2,5msec) (Micropulser Electroporetion Apparatus Bio-Rad) delle cellule procariotiche DH5α (Takara). Il plasmide, dopo verifica tramite sequenziamento, è stato prodotto in larga scala usando il kit Qiagen Plasmid Giga kit (Qiagen).

Il plasmide così ottenuto è stato utilizzato per l'immunizzazione di animali ed produzione di anticorpi anti TEM8.

Esempio 7: Immunizzazione dei topi e prelievo sieri

Topi Balb/c mantenuti in condizioni "pathogen free" e in accordo alle linee guida del Ministero della Salute, presso lo stabulario del Dipartimento di Ricerca INRCA di Ancona.

La scheda di immunizzazione consiste di tre somministrazioni nel muscolo femorale di 100µg in 100µl di DNA plasmidico descritto all'esempio 6 in soluzione fisiologica a distanza di 15 gg. l'una dall'altra.

Un prelievo di sangue viene effettuato dal plesso retrooculare in tutti i topi prima (sieropreimmune) e dopo 15 giorni dall'ultimo richiamo (siero immune).

Esempio 8: Produzione e purificazione proteina TEM8 ricombinata

Parte del gene per il TEM8 (13-375 Gene Bank accession number NM_010229) è stato inserito nel plasmide pGEM-T Easy Vector (Promega) attraverso ligation; quindi, il prodotto di ligation è stato usato per trasformare cellule elettrocompetenti (ceppo DH5α di *E.coli*, TAKARA) con Biorad Micropulser.

Le cellule sono state seminate su terreno Luria Broth Agar (LB) contenente l'antibiotico ampicillina. Dalle colonie formatesi, il DNA è stato estratto secondo la metodica del Kit Miniprep Qiagen e quindi sequenziato.

L'amplificazione e il trasferimento del DNA del TEM8 sono stati effettuati mediante Gateway Cloning Techonology. Il DNA estratto dalle cellule (plasmide pGEM-TEM8) è stato linearizzato con l'enzima di restrizione SalI. Il pGEM-TEM8 linearizzato è stato amplificato tramite PCR usando specifici primers: AttB1bis e AttB2bis fondamentali

per ottenere un prodotto di PCR con siti attB1 e attB2 alle estremità.

Programma PCR mTEM8:

95°C 5′

95°C 1′

64°C 1′ } 35 cicli

72°C 2′

72°C 10′

Primers:

attB1bis-

ggggACAAgTTTgTACAAAAAAgCAggCTTgATgggCCgCCgCgAggATgg

gggA

attB2bis-

ggggACCACTTTgTACAAgAAAgCTgggTCgCACAgCAAATAAgTgTCTTC

Dopo purificazione del prodotto mediante eluizione da gel sono state effettuate le due reazioni BP ed LR della Gateway. in accordo alle istruzioni della ditta fornitrice (GIBCO). Pertanto, è stata fatta una trasformazione mediante elettroporazione (Micropulser, BioRad) di cellule TAKARA DH5α elettrocompetenti con il prodotto della BP Reaction; l'Entry Clone, è risultato corretto al sequenziamento.

I primers utilizzati sono stati:

- ATTL1- TCgCgTTAACgCTAgCATggATCTC
- ATTL2- gTAACATCAgAgATTTTgAgACAC

Le condizioni per il sequenziamento sono state:

95°C 5'
96°C 10'' } 30 cicli
50°C 5''
60°C 4'

L'Expression Vector ottenuto come risultato della Gateway è stato usato per trasfettare il ceppo BL21 Star di E.coli. Le cellule trasfettate sono state messe a crescere in coltura O.N. a 37°C e indotte con IPTG 0,5M .

Dopo induzione, le colture sono state lisate; il campione ottenuto è stato caricato su colonnina HiTrap Chelating HP (Pharmacia) in tampone sodiofosfato 20mM + NaCl 0,5M a pH 7.8.

L'eluizione è stata condotta per steps decrescenti di un'unità di pH, fino a pH4.0. La proteina ricombinante è stata eluita a pH ≈6.0.

Un ulteriore passaggio di purificazione è stato effettuato su FPLC, con colonna Mono Q in SodioFosfato 20 mM pH 8.00 con gradiente continuo di NaCl da 0 a 0.3M. La proteina ricombinante

eluisce alla concentrazione di circa 0,1M NaCl con un picco simmetrico che ne denota l'alto grado di omogeneità, confermata in SDS-PAGE al 12,5% in cui la proteina sovraccaricata nel gel era evidenziata da un'unica banda elettroforetica.

Esempio 9: Specificità degli anticorpi anti-TEM8

Per valutare la specificità degli anticorpi ottenuti in seguito a immunizzazione genetica anti.TEM8,la proteina ricombinante TEM8è stata corsa in un gel di poliacrilamide al 12,5% e successivamente trasferita su membrana di nitrocellulosa. Dopo incubazione con i sieri diluiti 1:30 per 1h temperatura ambiente la membrana è stata lavata con PBST per 5min 3x, quindi incubata con un anticorpo anti-mouse perossidasi-coniugato (Calbiochem) diluizione1:3000 per 1h a temperatura ambiente. La reazione èstata evidenziata su lastra fotografica Kodac, impressionata dalla chemiluminescenza e sviluppata al buio per 1-3 min con il kit "enhanced chemiluminescence, Amersham Life Scienze". I risultati mostrati in Fig 5 mostrano la specificità verso il TEM8 degli anticorpiprodotti.

LISTATO DI SEQUENZE

SEQ. ID no: 1 hTEM8 SV1 cDNA -Gene Bank-accession number AF279145 (nts 144- 1950)

```
                                    atggcca cggcggagcg gagagccctc ggcatcggct
     181 tccagtggct ctctttggcc actctggtgc tcatctgcgc cgggcaaggg ggacgcaggg
     241 aggatggggg tccagcctgc tacggcggat ttgacctgta cttcattttg gacaaatcag
     301 gaagtgtgct gcaccactgg aatgaaatct attactttgt ggaacagttg gctcacaaat
     361 tcatcagccc acagttgaga atgtccttta ttgttttctc cacccgagga acaaccttaa
ECD  421 tgaaactgac agaagacaga gaacaaatcc gtcaaggcct agaagaactc cagaaagttc
     481 tgccaggagg agacacttac atgcatgaag gatttgaaag ggccagtgag cagatttatt
     541 atgaaaacag acaagggtac aggacagcca gcgtcatcat tgctttgact gatggagaac
     601 tccatgaaga tctctttttc tattcagaga gggaggctaa taggtctcga gatcttggtg
     661 caattgttta ctgtgttggt gtgaaagatt tcaatgagac acagctggcc cggattgcgg
     721 acagtaagga tcatgtgttt cccgtgaatg acggctttca ggctctgcaa ggcatcatcc
     781 actcaatttt gaagaagtcc tgcatcgaaa ttctagcagc tgaaccatcc accatatgtg
     841 caggagagtc atttcaagtt gtcgtgagag gaaacggctt ccgacatgcc cgcaacgtgg
     901 acagggtcct ctgcagcttc aagatcaatg actcggtcac actcaatgag aagccctttt
     961 ctgtggaaga tacttattta ctgtgtccag cgcctatctt aaaagaagtt ggcatgaaag
    1021 ctgcactcca ggtcagcatg aacgatggcc tctcttttat ctccagttct gtcatcatca
TM  1081 ccaccacaca ctgttctgac ggttccatcc tggccatcgc cctgctgatc ctgttcctgc
    1141 tcctagccct ggctctcctc tggtggttct ggcccctctg ctgcactgtg attatcaagg
    1201 aggtccctcc accccctgcc gaggagagtg aggaagaaga tgatgatggt ctgcctaaga
    1261 aaaagtggcc aacggtagac gcctcttatt atggtgggag aggcgttgga ggcattaaaa
    1321 gaatggaggt tcgttgggga gaaaagggct ccacagaaga aggtgctaag ttggaaaagg
    1381 caaagaatgc aagagtcaag atgccggagc aggaatatga attccctgag ccgcgaaatc
    1441 tcaacaacaa tatgcgtcgg ccttcttccc cccggaagtg gtactctcca atcaagggaa
    1501 aactcgatgc cttgtgggtc ctactgagga aaggatatga tcgtgtgtct gtgatgcgtc
ICD 1561 cacagccagg agacacgggg cgctgcatca acttcaccag ggtcaagaac aaccagccag
    1621 ccaagtaccc actcaacaac gcctaccaca cctcctcgcc gcctcctgcc cccatctaca
    1681 ctcccccacc tcctgcgccc cactgccctc ccccgccccc cagcgcccct acccctccca
    1741 tcccgtcccc accttccacc cttccccctc ctccccaggc tccacctccc aacagggcac
    1801 ctcctccctc ccgccctcct ccaaggcctt ctgtctagag cccaaagttc ctgctctggg
    1861 ctctctcaga aacttcagga gatgttagaa caagtctttc cagttagaga agaggagtgg
    1921 tgataaagcc cactgacctt cacacattct
```

SEQ. ID NO: 1 bis
hTEM8 SV1 polypeptide (564 aa -accession Gene Bank-accession number AF279145)

mataerralgigfqwlslatlvlicagqggrredggpacyggfdlyfildksgsvlhhwneiyyfveqlahkfispqlr
msfivfstrgitlmkltedreqirqgleeiqkvipggdtymhegferaseqiyyenrqgyrtasvilaltdgeihediff
ysereanrsrdlgaivycvgvkdfnetqlariadskdhvfpvndgfqalqglihsilkkscleilaaepsticagesfq
wvrgngfrhamvdrvlcsfkindavtlnekpfsvedtyflcpapilkevgmkaalqvsmndgisfisssvlittthc
sdgsilaiallifllalallwwfwplcctvilkevpppcaeeseeedddglpkkkwptvdasyyggrgvggikme
vrwgekgsteegakleakaknarvkmpeqeyefpeprmlnnnmrpssprkwyspikgkldalwvllrkgydrv
svmrpqpgdfgrcinftrvknnqpakypinnayhtssppapiytppppaphcpppppsaptppipsppstlp
pppqapppn rapppsrpppprpsv

SEQ. ID no: 2
hTEM8 SV2 cDNA -Gene Bank-accession number NM_053034 (nts 144-1464)

```
                atggcca cggcggagcg gagagccctc ggcatcggct
tccagtggct ctctttggcc actctggtgc tcatctgcgc cgggcaaggg
ggacgcaggg aggatggggg tccagcctgc tacggcggat ttgacctgta
cttcattttg gacaaatcag gaagtgtgct gcaccactgg aatgaaatct
attactttgt ggaacagttg gctcacaaat tcatcagccc acagttgaga
atgtcctttta ttgttttctc cacccgagga acaaccttaa tgaaactgac
agaagacaga gaacaaatcc gtcaaggcct agaagaactc cagaaagttc
tgccaggagg agacacttac atgcatgaag gatttgaaag ggccagtgag
cagatttatt atgaaaacag acaagggtac aggacagcca gcgtcatcat
tgctttgact gatggagaac tccatgaaga tctcttttc tattcagaga
gggaggctaa taggtctcga gatcttggtg caattgttta ctgtgttggt
gtgaaagatt tcaatgagac acagctggcc cggattgcgg acagtaagga
tcatgtgttt cccgtgaatg acggctttca ggctctgcaa ggcatcatcc
actcaatttt gaagaagtcc tgcatcgaaa ttctagcagc tgaaccatcc
accatatgtg caggagagtc atttcaagtt gtcgtgagag gaaacggctt
ccgacatgcc cgcaacgtgg acagggtcct ctgcagcttc aagatcaatg
actcggtcac actcaatgag aagccctttt ctgtggaaga cacttattta
ctgtgtccag cgcctatctt aaaagaagtt ggcatgaaag ctgcactcca
ggtcagcatg aacgatggcc tctcttttat ctccagttct gtcatcatca
```

ccaccacaca ctgttctgac ggttccatcc tggccatcgc cctgctgatc
ctgttcctgc tcctagccct ggctctcctc tggtggttct ggcccctctg
ctgcactgtg attatcaagg aggtccctcc accccctgcc gaggagagtg
aggaaaataa aataaaataa caagaagaag aaagaaagaa atcccacaga
aacagataac ctaacacagc ccgtgcaacg tattttatac aatgctctga
aaatcatagt ctcaatctag acagtctttt cctctagttc cctgtattca
aatcccagtg tctaacattc aataaatagc tatatgaaat caaaaaaaaa
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa

SEQ. ID NO: 2 BIS

hTEM8 SV2 polypeptide (368aa -Gene Bank-accession number NM_053034)

mataerralgigfqwlslatlvlicagqggrredggpacyggfdlyfildksgsvlhhwneiyyfveqlahkfispqlr
msfivfstrgttlmkltedreqlrqgleelqkvlpggdtymhegferaseqiyyenrqgyrtasvilaltdgelhedlff
ysereanrsrdlgaivycvgvkdfnetqlariadskdhvfpvndgfqalqgilhsilkkscleilaaepsticagesfq
vvvrgngfrharnvdrvlcsfkindsvtlnekpfsvedtyllcpapilkevgmkaalqvsmndglsfisssvilttthc
sdgsilaialliifllialallwwfwplcctvilkevppppaeeseenkik

SEQ. ID NO: 3

hTEM8 SV3 cDNA -Gene Bank-accession number NM_018153 Nts 144- 2143

atggcca cggcggagcg gagagccctc ggcatcggct tccagtggct
ctctttggcc actctggtgc tcatctgcgc cgggcaaggg ggacgcaggg
aggatggggg tccagcctgc tacggcggat ttgacctgta cttcattttg
gacaaatcag gaagtgtgct gcaccactgg aatgaaatct attactttgt
ggaacagttg gctcacaaat tcatcagccc acagttgaga atgtccttta
ttgttttctc cacccgagga acaaccttaa tgaaactgac agaagacaga
gaacaaatcc gtcaaggcct agaagaactc cagaaagttc tgccaggagg
agacacttac atgcatgaag gatttgaaag ggccagtgag cagatttatt
atgaaaacag acaagggtac aggacagcca gcgtcatcat tgctttgact
gatggagaac tccatgaaga tctctttttc tattcagaga gggaggctaa
taggtctcga gatcttggtg caattgttta ctgtgttggt gtgaaagatt
tcaatgagac acagctggcc cggattgcgg acagtaagga tcatgtgttt
cccgtgaatg acggctttca ggctctgcaa ggcatcatcc actcaatttt
gaagaagtcc tgcatcgaaa ttctagcagc tgaaccatcc accatatgtg
caggagagtc atttcaagtt gtcgtgagag gaaacggctt ccgacatgcc

cgcaacgtgg acagggtcct ctgcagcttc aagatcaatg actcggtcac
actcaatgag aagccctttt ctgtggaaga tacttattta ctgtgtccag
cgcctatctt aaaagaagtt ggcatgaaag ctgcactcca ggtcagcatg
aacgatggcc tctcttttat ctccagttct gtcatcatca ccaccacaca
ctgtagcctc cacaaaattg catcaggccc cacaacagct gcttgcatgg
aatagcagag aataccgcct gctccctccg gacagcacac tcctgaaaac
ggggagagag gagccaaaca tgctcggttt acactttcct tatttactga
atgagtggag ggcagagaca ggcctggagt tacgcacact gagtgcccca
acatggaaag aaacatcagg agggacagga aacgttccct ccttaaccaa
cagttttcaa gaccttactg gaggcacttt attggctaca taatcactcc
atgcggtggg catcaggcag aatcctggtg cagacccaac tttgaggtgg
aggatttcac agtttcttta ttttgaactt cccccaggct cccactaatt
cctctccatt ctatcctcct ccctttccca caaaagaaaa cagaaaggag
cagcagtgtt tgataccgta tcatccagag gcctggttct ctcccattat
agggcaaaca agccctggca agatatttca ctcccgcccc atgccatgca
ttaaaaatcc aaaattgcct atattccacc tgccaagcaa gagatgcttt
cattattgaa gttccaaatg tatacctttg agaacagtgc cttctcgtct
taaaagagag gtcctcattt tgtgagttgg gagcagaggg aattaaagaa
agccatgatg cagggatttg gccattcaag ccgggcagcc ttcagagaat
gtcatcccta atgacacatg cccgaatgaa ggagcggggc tgagcttgtc
ctgccttcgt attgaatgtt gcctgtctgc ctccttaata gcgggcctct
gtgtgagcat ttgacaagac ttaaaactat tcattgaaga aaatggatga
tcccccaaca ggaagatgca accccatggg ctgcctgctt gaccacagaa
gtgcttccag ctccagttgc tcatctgaga actccccccca ccacttgctg
ttaaaattgt taaaattaaa ggccatgttg attgaaaaaa aaaaaaaaaa
aaa

SEQ. ID NO: 3 BIS

TEM8 SV3 polypeptide (317 aa , Gene Bank-accession number NM_018153)

mataerralgigfqwlslatlvlicagqggrredggpacyggfdlyfildksgsvlhhwneiyyfveqlahkfispqlr
msfivfstrgttlmkltedreqirqgleelqkvlpggdtymhegferaseqiyyenrqgyrtasvilaltdgelhedlff
ysereanrsrdlgaivycvgvkdfnetqlarladskdhvfpvndgfqalqgilhsilkkscieilaaepsticagesfq
vvvrgngfrharnvdrvlcsfkindsvtlnekpfsvedtyllcpapilkevgmkaalqvsmndglsfisssvilttthc
slhklasgpttaacme

SEQ. ID NO: 4

TEM8 HBC-1 (cDNA -reference SEQ ID NO: 1)

atgcaagagtcaagatgcccggagcaggaatatgaattccctgagccgcgaaatctcaacaacaatatgcgtc
ggtctgtctagagcccaaagttcctgctctgggctctctcagaaacttcaggagatgttagaacaagtctttccagtt
agagaagaggagtggtgataaagcccactgaccttcacacattct

SEQ. ID NO: 4 BIS

TEM8 HBC-1 polypeptide

arvkmpeqeyefpepmlnnnmmrsv

SEQ. ID NO: 5

TEM8 HBC-2 (cDNA- reference sequence SEQ ID NO 1)

atgcaagagtcaagatgcccggagcaggaatatgaattccctgagccgcgaaatctcaacaacaatatgcgtc
ggccttcttccccccggaagtggtactctccaatcccaacagggcacctcctccctcccgccctcctccaaggcc
ttctgtctagagcccaaagttcctgctctgggctctctcagaaacttcaggagatgttagaacaagtctttccagtta
gagaagaggagtggtgataaagcccactgaccttcacacattct

SEQ. ID NO: 5 BIS

TEM8 HBC-1 polypeptide

arvkmpeqeyefpepmlnnnmmrtgggtsslppsskafclepkvpalgslmfrrc

SEQ. ID NO: 6

TEM8 HBC-3 (cDNA-reference SEQ ID NO:1)

atgcaagagtcaagatgcccggagcaggaatatgaattccctgagccgcgaaatctcaacaacaatatgcgtc
ggccttcttccccccggaagtggtactctccaatcaagggaaaactcgatgccttgtgggtcctactgaggaaag
gatatgatcgtgtgtctgtgatgcgtccacagccaggagacacggggcgctgcatcaacttaggccttctgtctag
agcccaaagttcctgctctgggctctctcagaaacttcaggagatgttagaacaagtctttccagttagagaaga
ggagtggtgataaagcccactgaccttcacacattct

SEQ. ID NO: 6 BIS

TEM8 HBC-1 polipeptide

arvkmpeqeyefpeprnlnnnmrrpssprkwyspikgkldalwvllrkgydrvsvmrpqpgdtgrcinlqllsr
aqsscsglsqklqemllegvfpvreew

Primers di amplificazione PCR:

Dominio Extracellulare (ECD) (SV of TEM8)

Questa coppia di primers amplifica la regione 901-1040 SEQ ID NO:1

SEQ. ID NO: 7

hT8-ECD FW : ACAgggTCCTCTgCAgCTTC

SEQ. ID NO: 8

hT8-ECD RV : CATgCTgACCTggAgTgCAg

Dominio Intracellulare (ICD). (Detect SV1 and SV2, no SV3)

Questa coppia di primers amplifica la regione 1387-1950 SEQ ID NO:1

SEQ. ID NO: 9

hT8-ICD FW : ATgCAAgAgTCAAgATgCCCg

SEQ. ID NO: 10

hT8-ICD RV: AgAATgTgTgAAggTCAgTg

Dominio extracellulare (ECD) SV3

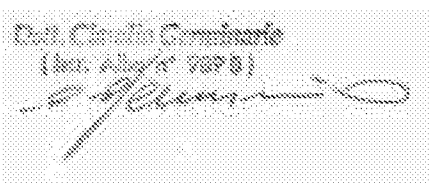
Questa coppia di primer amplifica la regione 901-1145 della sequenza SEQ ID NO:3

SEQ ID NO: 11

(Fw): ACAGGGTCCTCTGCAGCTTCA

SEQ ID NO: 12

(RV): CTATTCCATGCAAGCAGCTGT



Dott. Claudio Cominarie
(Iscr. Albo n° 7878)

RIVENDICAZIONI

1. Metodo di diagnosi di forme tumorali o di stati collegati all'insorgere di forme tumorali scelti tra angiogenesi infiammatoria patologica, dell'angiogenesi tumorale, capacità metastatica e/o migratoria delle cellule tumorali e delle cellule dendritiche comprendente le fasi in cui:
si rileva in un campione biologico la attivazione e l'entità dell'espressione del gene TEM8 o sue regioni, in una qualsiasi delle sue varianti dovute a differente *splicing* e a modificazione post-trascrizionale.

2. Metodo secondo la rivendicazione 1 in cui l'espressione del gene TEM8 è rilevata attraverso determinazione sul campione biologico della presenza delle sequenze di cDNA scelte tra: SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:6, oppure di qualsiasi sequenza del gene TEM8 amplificate per PCR utilizzando le copie di primer aventi sequenze: SEQ ID NO:7 (FW) e SEQ ID NO:8 (RV) oppure SEQ ID NO:9 (FW) e SEQ ID NO:10 (RV) oppure SEQ ID NO: 11 (FW) e SEQ ID NO:12 (RV) oppure della presenza dei corrispondenti trascritti di RNA, o dei corrispondenti prodotti di

espressione polipeptidica.

3. Metodo secondo la rivendicazione 2 in cui l'espressione del gene TEM8 è determinata attraverso rilevazione sul campione biologico della presenza prodotti di espressione aventi sequenze peptidiche scelte tra: SEQ ID NO:1bis; SEQ ID NO:2bis; SEQ ID NO:3bis; SEQ ID NO:4bis; SEQ ID NO:5bis; SEQ ID NO:6bis oppure scelte tra le sequenze pepetidiche corrispondenti ai prodotti di amplificazione per PCR del gene TEM8 utilizzando le copie di primer aventi sequenze SEQ ID NO:7 (FW) e SEQ ID NO:8 (RV) oppure SEQ ID NO:9 (FW) e SEQ ID NO:10 (RV) oppure SEQ ID NO:11 (FW) e SEQ ID NO:12 (RV).

4. Metodo secondo la rivendicazione 2 in cui l'espressione del gene TEM8 è rilevata attraverso una o più sonde genetiche capaci di ibridizzare (in condizioni di alta stringenza) con una sequenza nucleotidica scelta tra: SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:6, oppure con sequenze del gene TEM8 amplificate per PCR utilizzando le copie di primer aventi sequenze SEQ ID NO:7 (FW) e SEQ ID NO:8 (RV) oppure SEQ ID NO:9 (FW) e SEQ ID NO:10 (RV) oppure SEQ ID NO:11 (FW) e SEQ ID NO:12 (RV) o con sequenze aventi

almeno 95% di omologia con queste.

5. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 4 in cui il campione biologico è un prelievo ematico, sinoviale, pleurico, bioptico o un prelievo di tessuto tumorale o un campione di cellula dendritica.

6. Metodo di prognosi di stati tumorali o di stati infiammatori in cui durante o a seguito del trattamento terapeutico antitumorale o antinfiammatorio si determina in un campione biologico la presenza e l'entità dell'espressione del gene TEM8 o sue regioni, in una qualsiasi delle sue varianti dovute a differente *splicing* o a modificazione post-trascrizionale.

7. Sonda genetica per la determinazione della presenza e dell'entità di espressione del gene TEM8 capace di ibridizzare (in condizioni di alta stringenza) con regioni del gene TEM8 aventi sequenza nucleotidica scelta tra: SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:6, oppure con sequenze del gene TEM8 amplificate per PCR utilizzando le copie di primer aventi sequenze SEQ ID NO:7 (FW) e SEQ ID NO:8 (RV) oppure SEQ ID NO:9 (FW) e SEQ ID NO:10 (RV) oppure SEQ ID NO:11 (FW) e SEQ ID NO:12 (RV) o con

sequenze aventi almeno 95% di omologia con queste.

8. Primer per PCR per la determinazioni di varianti del gene TEM8 legate a forme tumorali aventi le seguenti sequenze: SEQ ID NO:7 (FW) e SEQ ID NO:8 (RV) oppure SEQ ID NO:9 (FW) e SEQ ID NO:10 (RV) oppure SEQ ID NO:11 (FW) e SEQ ID NO:12 (RV).

9. Vettore di clonaggio o espressione contenete una sequenza nucleotidica scelta tra: SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:6 oppure una qualsiasi dalle sequenze del gene TEM8 amplificate per PCR utilizzando le copie di primer aventi sequenze SEQ ID NO:7 (FW) e SEQ ID NO:8 (RV) oppure SEQ ID NO:9 (FW) e SEQ ID NO:10 (RV) oppure SEQ ID NO:11 (FW) e SEQ ID NO:12 (RV), fiancheggiate da idonee sequenze che ne regolino la trascrizione e la traduzione.

10. cellula ospite procariotica o eucariotica modificata attraverso il vettore secondo la rivendicazione 9.

11. Polipeptide di espressione del gene TEM8 ottenuto in cellula ospite secondo la rivendicazione 10.

12. Polipeptide di espressione del gene TEM8 comprendente sequenze polipetidiche scelte tra SEQ ID NO:1bis; SEQ ID NO:2bis; SEQ ID NO:3bis; SEQ ID

NO:4bis; SEQ ID NO:5bis; SEQ ID NO:6bis oppure polipeptidi corrispondenti alle sequenze del gene TEM8 amplificate per PCR utilizzando le copie di primer aventi sequenze SEQ ID NO:7 (FW) e SEQ ID NO:8 (RV) oppure SEQ ID NO:9 (FW) e SEQ ID NO:10 (RV) oppure SEQ ID NO:11 (FW) e SEQ ID NO:12 (RV) o loro sequenze omologhe aventi almeno 90% di omologia.

13. Prodotto di espressione secondo le rivendicazioni 11 o 12 per uso come agente diagnostico o terapeutico.

14. Prodotto secondo la rivendicazione 13 nella diagnosi o nel trattamento terapeutico di forme tumorali o di stati collegati all'insorgere di forme tumorali scelti tra angiogenesi infiammatoria patologica, dell'angiogenesi tumorale, capacità metastatica e/o migratoria delle cellule tumorali e delle cellule dendritiche.

15. Composizione immunogena comprendente uno o più prodotti di espressione secondo le rivendicazioni 11 o 12 capaci di indurre una risposta immunitaria contro cellule sovra-esprimenti i prodotti del gene TEM8 e un eccipiente farmacologicamente accettabile.

16. Composizione immunogena comprendente un vettore

secondo la rivendicazioni 9 capace di indurre una risposta immunitaria contro cellule sovra-esprimenti i prodotti del gene TEM8 e un eccipiente farmacologicamente accettabile.

17. Anticorpo poli o monoclonale specifico per i prodotti di espressione secondo le rivendicazioni 11 o 12.

18. Anticorpo secondo la rivendicazione 16 per uso nel trattamento terapeutico di inibizione di forme tumorali o di stati collegati all'insorgere di forme tumorali scelte tra: la angiogenesi infiammatoria patologica, la neo-angiogenesi tumorale, la capacità metastatica e/o migratoria delle cellule tumorali e delle cellule dendritiche.

19. Anticorpo secondo la rivendicazione 16 per uso come reagente diagnostico per la diagnosi della angiogenesi infiammatoria patologica, dell'(neo?)angiogenesi tumorale, della capacità metastatica e/o migratoria delle cellule tumorali e delle cellule dendritiche.

20. Metodo di screening di agonisti o antagonisti dell'attività del gene TEM8 in cui: si trattano le cellule che esprimono il gene TEM8 con il candidato agonista o antagonista e si valutano i livelli dei trascritti di RNA o dei prodotti di espressione

corrispondenti alle sequenze SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:6.

21. Sequenza di cDNA scelta tra: SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:6, oppure di qualsiasi sequenza del gene TEM8 amplificate per PCR utilizzando le copie di primer aventi sequenze: SEQ ID NO:7 (FW) e SEQ ID NO:8 (RV) oppure SEQ ID NO:9 (FW) e SEQ ID NO:10 (RV) oppure SEQ ID NO: 11 (FW) e SEQ ID NO:12 (RV) oppure corrispondenti trascritti di mRNA o iRNA, presa singolarmente o in miscela per uso in un trattamento terapeutico.

22. Sequenze secondo la rivendicazione 21 nel trattamento terapeutico di forme tumorali o di stati collegati all'insorgere di forme tumorali scelti tra angiogenesi infiammatoria patologica, dell'angiogenesi tumorale, capacità metastatica e/o migratoria delle cellule tumorali e delle cellule dendritiche.

23. Sequenza di cDNA scelta tra SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 oppure sequenza del gene TEM8 comprendente una di queste sequenze, loro trascritti di RNA e loro prodotti di espressione.

P.P. BIOSOOFT S.r.l.

RM 2006 A 000337

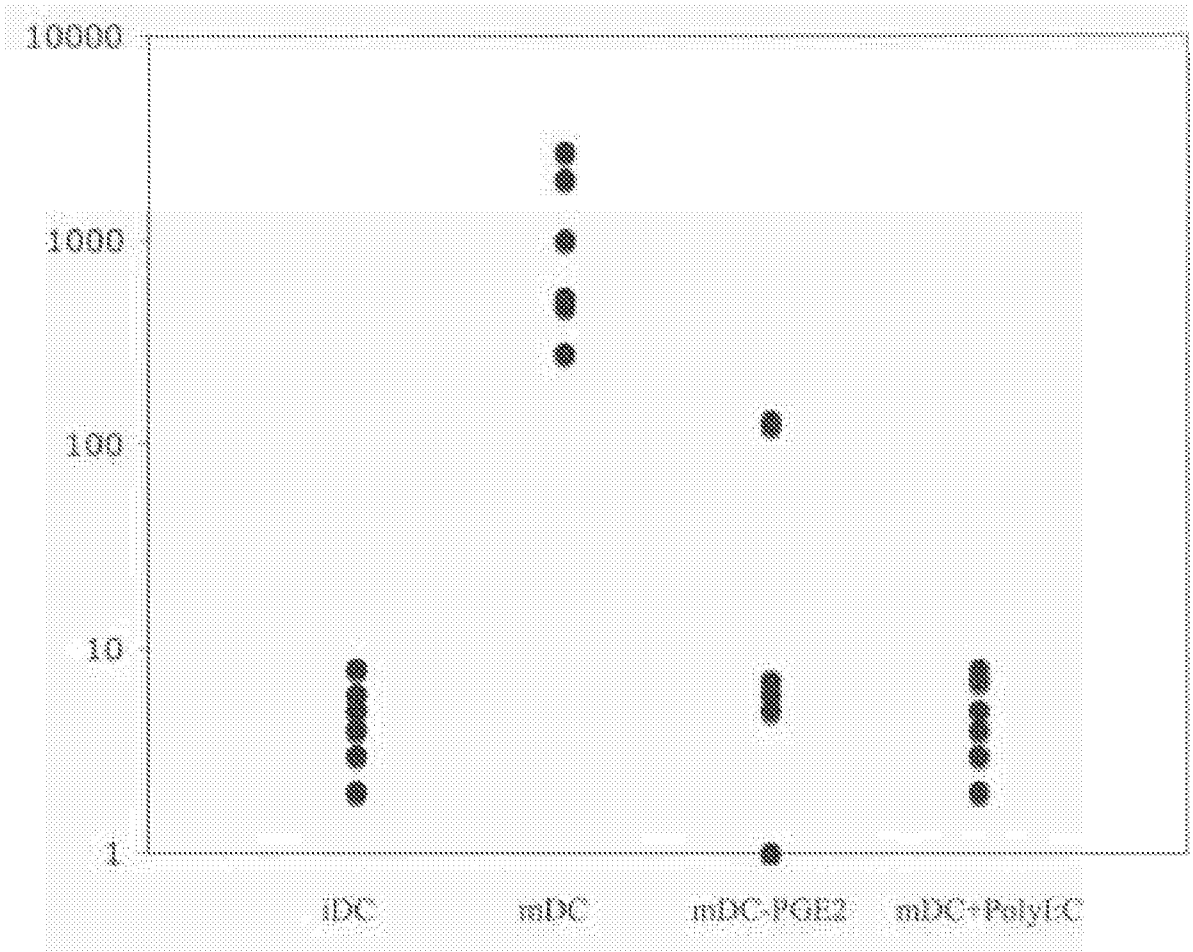
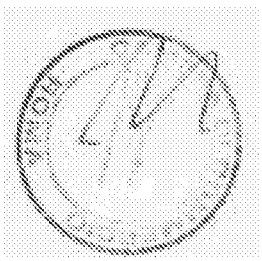


Figura 1



p.p. Biosoft S.r.l.

Claudio Germinario
(Iscr. Albo n. 989 B)
SOCIETÀ ITALIANA BREVETTI

RM 2006 A 000337

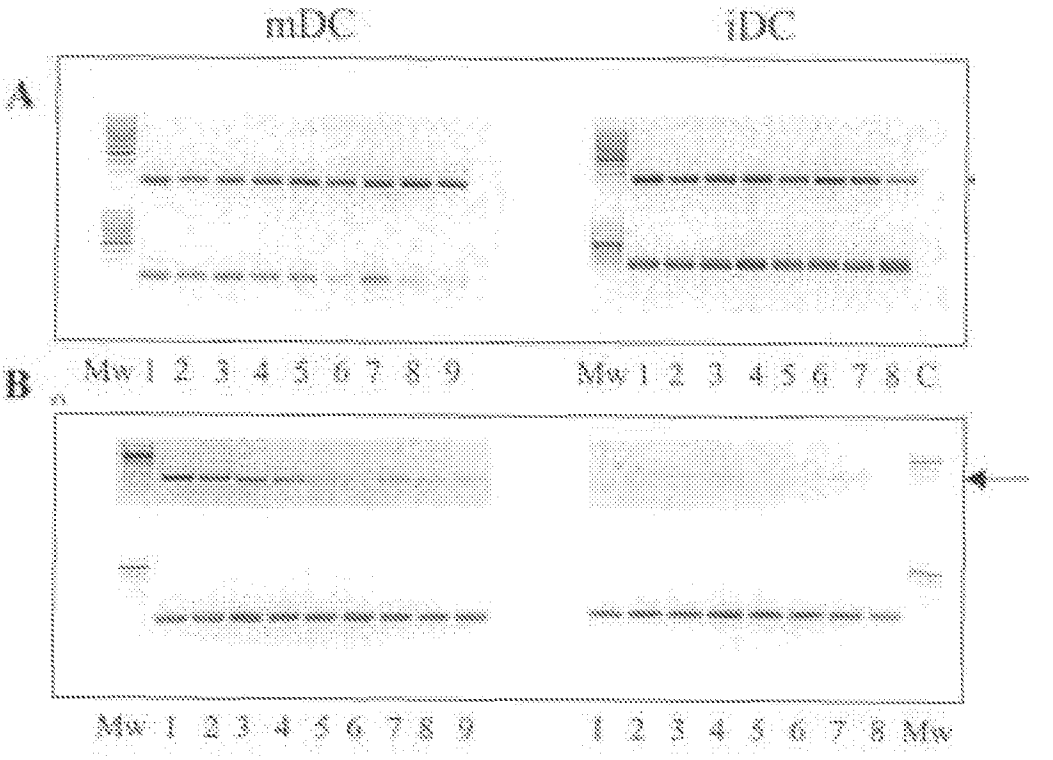


Figura 2

p.p. Biosoft S.r.l.

Claudio Germinario
(Iscr. Albo n. 989 B)
SOCIETÀ ITALIANA BREVETTI

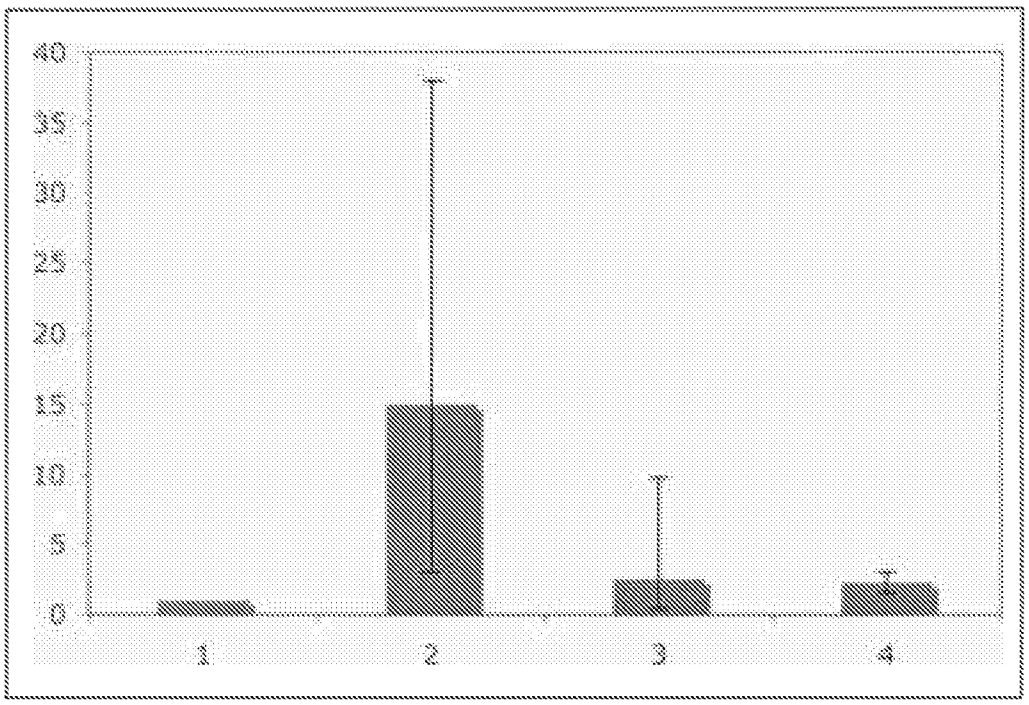


Figura 3

p.p. Biosoft S.r.l.

Claudio Germinario
(Iscr. Albo n. 989 B)
SOCIETÀ ITALIANA BREVETTI

RM 2006 A 000337

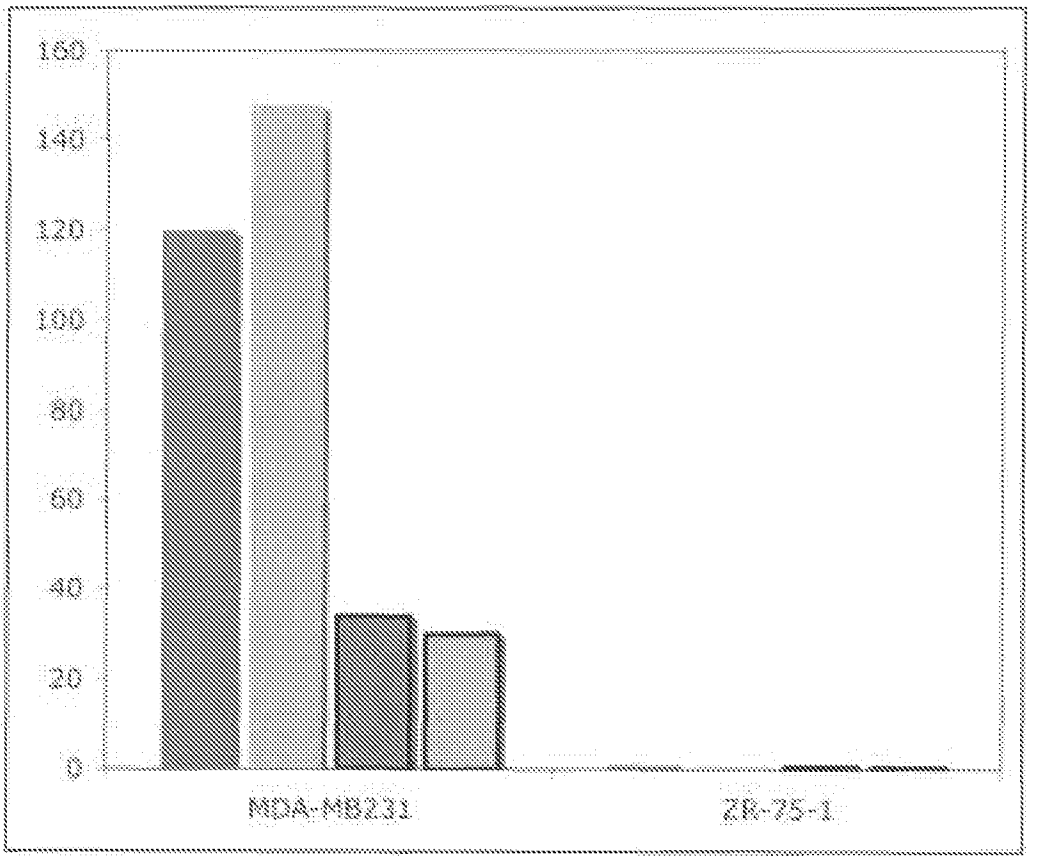


Figura 4

CAMERA DI COMMERCIO

p.p. Biosoft S.r.l.

Claudio Germinario
(Iscr. Albo n. 989 B)
SOCIETÀ ITALIANA BREVETTI

RM 2006 A 000332

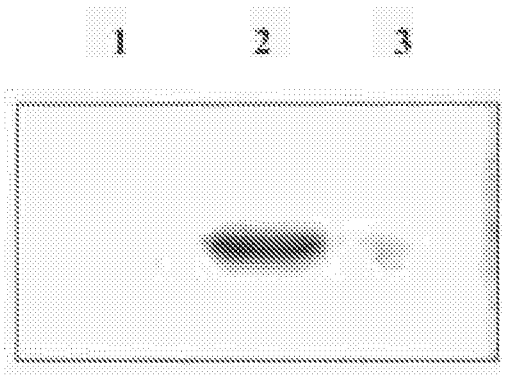
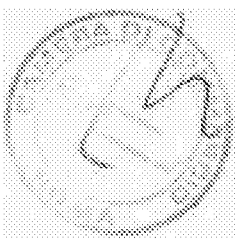
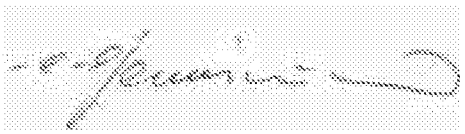


Figura 5



p.p. Biosoft S.r.l.



Claudio Germinario
(Iscr. Albo n. 989 B)
SOCIETÀ ITALIANA BREVETTI