

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

DOMANDA NUMERO	**102007901545173**
Data Deposito	**27/07/2007**
Data Pubblicazione	**27/01/2009**

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

VACCINO IDIOTIPICO

C.C.I.A.A
BREVETTI
27 LUG 2007
MILANO

Dr.ssa Tiziana SANTORO (537BM)

MI2007 A00 1522

Descrizione dell'Invenzione avente per titolo:

"VACCINO IDIOTIPICO"

a nome: **ARETA INTERNATIONAL S.r.l.**, di nazionalità italiana,

con sede in: 20129 Milano MI

Inventori: DOLCETTI, Riccardo; GUIDOBONI, Massimo; DE RE Valli; GASPAROTTO, Daniela; CASTIGLIONI, Sonia; NOLLI, Maria Luisa.

****

La presente invenzione riguarda l'utilizzo di immunoglobuline (Ig) clonotipiche ricombinanti come vaccino nel trattamento delle linfoproliferazioni HCV-correlate e non HCV-correlate. Nello specifico la presente invenzione prevede l'utilizzo di proteine ricombinanti con proprietà immunogeniche derivate da segmenti proteici VK3-20 e VK3-15 delle catene leggere delle Ig derivate da pazienti con linfoproliferazioni .

L'epatite C è una forma di epatite causata da uno specifico virus (*Hepatitis C Virus*, HCV). In molti casi l'epatite acuta C non ha sintomi e diventa cronica causando danni al fegato nel lungo termine; ad esempio cirrosi e carcinoma epatocellulare. Altre sintomatologie associate possono manifestarsi in presenza di epatite C quali tiroidismo, crioglobulinemia e alcuni tipi di glomerulonefrite.

In particolare il termine "crioglobulinemia" si riferisce alla presenza nel siero di una o più immunoglobuline (Ig), che precipitano ad una temperatura inferiore a 37°C e si ridissolvono con l'aumento della temperatura. La crioglobulinemia è di solito classificata in tre sottogruppi: la crioglobulinemia semplice (tipo 1), caratterizzata dalla presenza di Ig monoclonali, è spesso associata a malattie ematologiche ed è spesso asintomatica; la crioglobulinemia mista o CM (tipo 2 e tipo 3) è caratterizzata dalla presenza di immunocomplessi circolanti composti da IgG

policlonali, come autoantigeni, e da IgM monoclonali (tipo 2) o policlonali (tipo 3), come autoanticorpi corrispondenti. La CM può essere secondaria a diverse infezioni o a disturbi immunologici; quando è isolata può essere una malattia a sé stante, cosiddetta CM "essenziale". Data la forte associazione (>90%) con l'infezione da HCV, il termine "essenziale" si riferisce ad una minoranza di pazienti con CM (<5%). HCV può infettare i tessuti linfoidi e portare alla proliferazione mono-policlonale dei linfociti B, con produzione di diversi autoanticorpi, comprese le crioglobuline. La sindrome da CM è una vasculite sistemica, secondaria alla precipitazione di immunocomplessi circolanti e complemento nei vasi di piccole dimensioni. Clinicamente è caratterizzata dal coinvolgimento di più organi: porpora, ulcere cutanee, epatite, glomerulonefrite, neuropatia periferica e/o vasculite molto estesa. Alcuni pazienti possono sviluppare un tumore, generalmente come complicazione tardiva, in particolare un linfoma non-Hodgkin a cellule B (10%), un carcinoma epatocellulare (<5%), o un cancro della tiroide (<1%).

Il trattamento iniziale della CM dovrebbe essere diretto all'eliminazione dell'HCV con interferone e ribavirina; tuttavia questo trattamento è spesso inefficace nell'eradicare il virus e può essere complicato da importanti effetti collaterali (neuropatia, tiroidite, ecc.). I trattamenti patogenetici (plasmaferesi, immunosoppressori e/o corticosteroidi) presentano la necessità di essere adattati ad ogni paziente, in accordo con l'attività e la gravità della sintomatologia clinica.. L'impiego della terapia interferonica nella sindrome crioglobulinemica HCV-correlata si basa sul presupposto che la proliferazione B-linfocitaria sia virus-dipendente e quindi potenzialmente responsiva alla riduzione della carica virale; non si tratta quindi di una terapia mirata al trattamento delle linfoproliferazioni. Tale terapia con interferone o interferone-peghilato, utile ad aumentare l'emivita

plasmatica del farmaco, è inoltre associata a tossicità ed effetti collaterali quali: irritabilità instabilità emotiva, stati depressivi, disturbi del sonno, stati di paura, stati maniacali, disturbi cognitivi (memoria, concentrazione), stati confusionali.

Esiste pertanto la necessità di trovare un terapia alternativa, profilattica e/o terapeutica, nel trattamento delle linfoproliferazioni fin qui brevemente descritte.

La vaccinazione con Ig idiotipiche è stata utilizzata per il trattamento dei linfomi non-Hodgkin (NHL) a cellule B, ma la notevole complessità e i costi elevati della produzione di Ig idiotipiche per ogni paziente pongono dei significativi limiti all'applicazione di tale strategia di vaccinazione per un'ampia popolazione di soggetti.

Scopo della presente invenzione è di fornire un nuovo vaccino per le patologie linfoproliferative, che superi i limiti e gli inconvenienti delle tecniche finora utilizzate e che sia applicabile a gruppi di pazienti numericamente significativi.

Un altro scopo della presente invenzione è fornire un procedimento per l'identificazione, l'isolamento e la valutazione dell'immunogenicità dei segmenti proteici adatti alla preparazione del detto vaccino.

Un ulteriore scopo è di fornire un procedimento per la preparazione dei segmenti proteici che costituiscono detto vaccino.

Descrizione

Questi ed altri scopi sono raggiunti attraverso l'impiego di segmenti immunogenici ricombinanti clonotipici nel trattamento delle linfoproliferazioni HCV- e non HCV-correlate.

Così, secondo uno dei suoi aspetti, l'invenzione ha per oggetto un vaccino comprendente almeno un segmento proteico immunogenico ricombinante scelto tra

VK3-20 e VK3-15, destinato al trattamento e/o alla profilassi delle patologie linfoproliferative.

Secondo un altro dei suoi aspetti, l'invenzione ha per oggetto l'uso di un segmento proteico immunogenico ricombinante scelto tra VK3-20, VK3-15 e le loro miscele.

Per l'uso secondo l'invenzione, il o i segmenti proteici immunogenici ricombinanti scelto tra VK3-20, VK3-15 e le loro miscele, è eventualmente abbinato ad un'altra porzione proteica o reagente per la preparazione di un vaccino per il trattamento e/o profilassi delle patologie linfoproliferative.

Secondo un altro dei suoi aspetti, l'invenzione ha per oggetto l'uso di un vaccino comprendente entrambi i segmenti proteici immunogenici ricombinanti VK3-20 e VK3-15 per la preparazione di un medicamento per le patologie linfoproliferative.

In particolare con l'espressione "segmenti proteici immunogenici ricombinanti" si intende riferirsi a parti di proteine ottenute attraverso la tecnica del DNA ricombinante e dotate di attività immunogena, cioè in grado di indurre una risposta immune.

I termini VK3-20 e VK3-15 si riferiscono alle regioni variabili della catena leggera Ig di tipo *κ*.

Le sequenze nucleotidiche dei geni codificanti per VK3-20 e VK3-15 sono presenti in data base NCBI con il numero: AF303897/AAG33824 per VK3-20 e AAU14891/AY704914 per VK3-15.

Secondo un altro dei suoi aspetti, la presente invenzione ha per oggetto l'isolamento, la caratterizzazione, la produzione e la purificazione dei segmenti clonotipici ricombinanti VK3-20 e VK3-15.

Secondo una forma di realizzazione dell'invenzione, il procedimento di produzione, implementazione e purificazione delle proteine clonotipiche ricombinanti VK3-20 e VK3-15 comprende i seguenti passaggi:

1)inserimento delle sequenze nucleotidiche che codificano per le dette proteine in un vettore di espressione adatto;

2)inoculo in terreno di coltura appropriato;

3)fermentazione, secondo tecniche note; e

4)purificazione dei frammenti.

Secondo una forma di realizzazione preferita della presente invenzione, il procedimento di produzione è caratterizzato dal fatto che almeno due dei passaggi da (1) a (4) sono effettuati secondo i passaggi da (1') a (4'):

1') inserimento di dette sequenze nel vettore di espressione pET26b, a formare il ceppo batterico ricombinante pET26b/VK3-20/VK3-15;

2') inoculo di un aliquota batterica pari all'1% in volume;

3') fermentazione utilizzando come terreno di coltura SB tamponato con tampone fosfato e aggiungendo glucosio o Isopropyl Thiogalactoside (IPTG)

4') purificazione attraverso cromatografia a scambio ionico.

Secondo la presente invenzione con "pET26b/VK3-20/VK3-15" si intende riferirsi al vettore d'espressione pET26b ingegnerizzato contenente alternativamente la sequenza nucleotidica che codifica per una delle due catene proteiche idiotipiche ricombinanti VK3-20 e VK3-15.

Secondo la presente invenzione l'identificazione e la quantizzazione alternativamente dei segmenti delle catene proteiche idiotipiche ricombinanti VK3-20 e VK3-15 è effettuato con anticorpi monoclonali (mAb) diretti contro le regioni VK.

Secondo la presente invenzione con il termine mAb si intende una popolazione omogenea di anticorpi prodotti da un clone cellulare (ibridoma) ottenuto per fusione di cellule immunoproduttrici con cellule tumorali di solito cellule di mieloma maligno, dotate di specificità verso un solo epitopo dell'antigene immunizzante.

Secondo una forma di realizzazione particolarmente preferita, il procedimento dell'invenzione comprende tutti i passaggi da (1') a (4').

Il processo così implementato ed ottimizzato produce numerosi vantaggi rispetto ai processi noti; consente infatti di:

- accelerare la crescita delle colture batteriche ricombinanti e di aumentarne la biomassa in una percentuale pari al 50%;
- incrementare la resa del processo;
- diminuire tempi e costi legati alla produzione; e
- semplificare, riprodurre e applicare su scala industriale secondo le norme di buona fabbricazione (Good Manufacturing Practice GMP).

Secondo un'altra forma di realizzazione preferita dell'invenzione, la fermentazione del ceppo batterico prevede il mantenimento in coltura a 37°C per 8-12 ore, ad esempio per tutta la notte.

Sempre secondo una forma di realizzazione preferita dell'invenzione la purificazione delle catene proteiche idiotipiche ricombinanti, dal mezzo di coltura o dallo spazio periplasmico batterico, prevede il passaggio su colonna a scambio ionico, ad esempio Q Sepharose FF (Amersham-GE) e S Sepharose FF (Amersham-GE).

Dei dettagli relativi al procedimento dell'invenzione sono forniti nella parte sperimentale della presente descrizione.

Si è osservato che il segmento immunogenico ricombinante VK3-20 è in grado di riconoscere 22 epitopi immunogenici, come indicato nell'Esempio 5 della parte sperimentale della presente descrizione.

Secondo un altro dei suoi aspetti, la presente invenzione ha per oggetto un qualsiasi segmento proteico capace di riconoscere almeno uno dei 22 epitopi immunogenici identificati del segmento proteico VK3-20, preferibilmente più di un epitopo, vantaggiosamente tutti i 22 epitopi.

Il vaccino della presente invenzione trova impiego nelle linfoproliferazioni HCV e non HCV correlate. È stato infatti osservato che le risposte citotossiche stimolate da una catena leggera VK3-20 prototipica, derivata da un linfoma HCV-correlato, presentano una significativa cross-reattività anche nei confronti di una proteina VK idiotipica codificata dallo stesso gene ma derivata da un paziente diverso e per questo motivo il vaccino preparato secondo l'invenzione risulta efficace e somministrabile su popolazioni di pazienti numericamente rappresentative come trattamento e/o profilassi nelle patologie linfoproliferative. Possono così essere trattate anche le linfoproliferazioni non HCV-correlate, quali ad esempio il linfoma follicolare (FL), la leucemia linfocitica cronica (CCL), i linfomi del tessuto linfoide associato alla mucosa (MALT) ed i linfomi associati ad autoimmunità quali artrite reumatoide, sindrome di Sjögren.

Per il suo uso terapeutico e/o profilattico, il vaccino dell'invenzione è preferibilmente somministrato in opportune composizioni farmaceutiche.

L'invenzione concerne altresì l'uso di un qualsiasi segmento proteico capace di riconoscere almeno uno dei 22 epitopi immunogenici identificati del segmento proteico VK3-20, preferibilmente più di un epitopo, vantaggiosamente tutti i 22 epitopi, per la preparazione di un vaccino per il trattamento delle linfoproliferazioni

HCV e non HCV correlate.

Le composizioni farmaceutiche contenenti il detto vaccino costituiscono un ulteriore aspetto dell'invenzione.

Nelle composizioni farmaceutiche della presente invenzione per la somministrazione orale, sottocutanea, endovenosa, transdermica o topica, i segmenti proteici sono preferibilmente somministrati in un'unica dose, come miscela con i classici eccipienti o veicoli farmaceuticamente accettabili. La dose utilizzata può variare in base all'età, al peso e alle condizioni di salute del paziente, oppure in base allo stato di severità patologico e alla via di somministrazione.

Tale dose comprende la somministrazione di una quantità di 0,5 mg di principio attivo per unità di dosaggio (è preferibile mettere un range. Per esempio da 0,1 a 1 mg, preferibilmente da 0,3 a 0,7 mg ad esempio 0,5 mg per unità di dosaggio).

Il vaccino e/o la composizione farmaceutica dell'invenzione possono essere eventualmente somministrate in combinazione con altri farmaci in uso nella terapia , ad esempio con sargramostim (GM-CSF, 50 $\mu g/m^2$/dose) e/o IFN-α2a ricombinante (1.000.000 UI/m^2/dose).

Secondo un altro dei suoi aspetti l'invenzione comprende un kit per trattamento e/o profilassi delle patologie linfoproliferative, che comprende la composizione farmaceutica dell'invenzione in e/o sargramostim e/o IFN-α2a ricombinante.

Il kit dell'invenzione preferibilmente comprende la composizione farmaceutica dell'invenzione in forma di unità di dosaggio comprendente il principio attivo in ragione di 0,5 mg e/o sargramostim (GM-CSF, 50 $\mu g/m^2$/dose) e/o IFN-α2a ricombinante (1.000.000 UI/m^2/dose).

L'invenzione sarà adesso illustrata a mezzo di esempi non limitativi, nei quali verrà fatto riferimento alle figure allegate, date a solo titolo indicativo e non limitativo dove:

- la Figura 1 mostra l'attività citotossica specifica di linee Linfociti T Citotossici policlonali (CTL) sensibilizzate con segmenti proteici immunogenici ricombinanti VK3-20 e VK3-15;
- la Figura 2 mostra l'attività citotossica specifica di linee CTL policlonali sensibilizzate con segmenti proteici immunogenici ricombinanti VK3-20 di pazienti diversi per verificarne il riconoscimento crociato;
- la Figura 3 mostra l'attività citotossica specifica di linee CTL policlonali sensibilizzate con segmenti proteici immunogenici ricombinanti VK3-20 o VK3-15 per il riconoscimento di bersagli autologhi "accoppiati" o "discordanti";
- la Figura 4 mostra la capacità di CTL VK3-20-specifici di riconoscere e uccidere in modo HLA Classe I-ristretto sia cellule di linfoma B (DG75) naturalmente esprimenti la proteina VK3-20 che una linea linfoblastoide B (SH9) naturalmente esprimente la proteina molecolarmente correlata VK3-15.
- la Figura 5 mostra la presenza di risposte memoria specifiche per VK3-20 o VK3-15 da parte di linfociti T CD8+ in pazienti con linfomi HCV-correlati valutata mediante saggi INF-γ-ELISPOT;
- la Figura 6 mostra la Percentuale relativa di legame di peptidi della proteina VK3-20 ad 8 diversi alleli HLA di Classe I determinata attraverso il sistema iTOPIA.

Parte sperimentale

Esempio 1

Isolamento, preparazione, caratterizzazione in vitro di Ig clonotipiche ricombinanti

Sono state inserite e riprodotte *in vitro* le regioni VH e VK di sei pazienti HCV infetti con crioglobulinemia mista di tipo II e concomitante NHL-B e le proteine a singolo filamento (ScFv) derivanti da queste sequenze sono state prodotte e purificate per affinità.

Solo le proteine derivate dalle catena VK di due pazienti , VK3-20 (VK-gal) e VK3-15 (VK-gent), sono state ulteriormente caratterizzate immunologicamente *in vitro*. Il DNA è stato estratto rispettivamente dalle cellule del tumore proveniente da una biopsia epatica e da cellule del midollo osseo, entrambi i tessuti erano involti da un linfoma non Hodgkin a basso grado di malignità di tipo immunocitoma linfoplasmocitico-linfoplasmocitoide secondo la classificazione di Kiel. In entrambi i casi, la regione VK è stata amplificata come precedentemente riportato (De Re V, e col. Blood. 2000;96:3578-84). I geni costituenti le regioni variabili della catena leggera delle immunoglobuline sono: il VK3-20/JK1*01 e VK3-15/JK1*01. Le sequenze VK sono state successivamente clonate ed espresse come singolo frammento. A questo scopo, i prodotti di PCR sono stati recuperati dal gel di agarosio, digeriti con gli enzimi di restrizione BamHI e XhoI, e legati nel sito di restrizione BamHI-XhoI del vettore plasmidico pET26b (Novagen, Madison, WI, Stati Uniti) a formare i plasmidi di espressione pET26b/VK3-20 e pET26b /VK3-15. A valle il primer FL7 (5'-CGG GAT CCG GAA ATT GTG TTG ACG-3') presenta un sito di restrizione per l'enzima BamHI e in 3' il primer FL5 (5'CCG CTC GAG TCA TTT GAT TTC CAC C-3') per il sito di restrizione XhoI.

Sono state ottenute colture di Linfociti T Citotossici policlonali (CTL) mediante stimolazione di cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC) di tredici donatori sani non correlati tra loro, genotipizzati in base al sistema di istocompatibilità, con cellule dendritiche autologhe pulsate con le proteine idiotipiche VK3-20 e VK3-15. Sono state così ottenute nove linee di CTL stimolati con VK3-20 e quattro linee di CTL stimolati con VK3-15. Per valutare l'immunogenicità in vitro sono stati effettuati test di citotossicità utilizzando metodiche radioisotopiche (^{51}Cr) e non (rilascio di calceina). Un'altra prova dell'immunogenicità in vitro di tali proteine, tesa a valutare la specificità antigenica delle risposte immuni indotte, è stata condotta valutando la percentuale di inibizione dell'attività citotossica specifica in presenza dell'anticorpo disponibile commercialmente **W6/32**, ottenendo la dimostrazione che il meccanismo utilizzato è HLA classe I-ristretto (Figura 1).

Esempio 2

Riconoscimento crociato di proteine idiotipiche ricombinanti

È stato osservato che le risposte citotossiche stimolate da una catena leggera VK3-20 prototipica, derivata da un linfoma HCV-correlato, presentano una cross-reattività anche nei confronti di una proteina VK idiotipica codificata dallo stesso gene (VK3-20) ma derivata dal linfoma di un paziente diverso (Figura 2). I dati della Figura 2, ottenuti da quattro donatori non correlati e contraddistinti da diversi aplotipi HLA di classe I, dimostrano come le risposte immuni citotossiche indotte da una proteina VK3-20 prototipica ricombinante rivestano un potenziale immunoterapeutico significativo anche in pazienti non correlati ma affetti da linfomi esprimenti immunoglobuline idiotipiche comprendenti le catene leggere VK3-20.

Esempio 3

Valutazione della reattività crociata di CTL VK3-20- e VK3-15-specifici.

Ulteriori esperimenti sono stati condotti per valutare la capacità dei CTL VK3-20 e VK3-15 specifici di riconoscere e uccidere sia bersagli autologhi "accoppiati" (*matched target*), ovvero caricati con la corrispondente proteina utilizzata per la generazione dei CTL, che cellule autologhe "discordanti" (*mismatched target*), ovvero caricate con la proteina VK3 molecolarmente correlata. Nei tre donatori presi in esame, come mostrato nella Figura 3, i CTL VK3-20-specifici e VK3-15-specifici sono in grado di uccidere con modalità Classe I ristretta anche bersagli caricati rispettivamente con VK3-15 e VK3-20 (*mismatched target*). Le due proteine VK3 possiedono infatti un'omologia di sequenza superiore a 80% e questo ne giustifica la cross-reattività. Ciò fornisce il razionale per utilizzare tali proteine ricombinanti quali vaccini per il trattamento e la prevenzione di linfoproliferazioni esprimenti idiotipi molecolarmente correlati. . E' stato inoltre dimostrato come CTLs VK3-20-specifici riconoscano ed uccidano in modo Classe I-ristretto sia cellule di linfoma B (DG75) naturalmente esprimenti la proteina VK3-20 che una linea linfoblastoide B (SH9) naturalmente esprimente la proteina molecolarmente correlata VK3-15 (Figura 4). Ciò indica che VK3-20 e VK3-15 espresse da cellule di linfoproliferazioni B sono naturalmente processate e fisiologicamente producono epitopi immunogenici in grado di mediare risposte immuni cellulo-mediate di potenziale valore clinico.

Esempio 4

Identificazione di risposte memoria

Allo scopo di identificare cellule memoria specifiche per le IG idiotipiche selezionate in pazienti affetti da neoplasie linfoidi, sono state condotte analisi ELISPOT basate sulla identificazione di linfociti T CD8+ secernenti interferone-γ.

Tali analisi dimostrano, Figura 5, la presenza di risposte memoria specifiche per VK3-15 e VK3-20 in pazienti con linfoma VK+. I saggi con il metodo ELISPOT sono stati condotti a 48 ore su PBMC di 13 pazienti con linfoma HCV-correlato, utilizzando come cellule presentanti l'antigene monociti autologhi caricati con le proteine ricombinanti selezionate e linfociti T CD8+ come cellule "responder".

Esempio 5

Identificazione e validazione degli epitopi immunogenici

Allo scopo di identificare i peptidi di VK3-20 in grado di legare i più comuni alleli HLA di classe I, sono state condotte analisi delle regioni VH e VL ottenute da Ig clonotipiche di linfoproliferazioni HCV-associate con metodi informatici di predizione degli epitopi (Syfpeithi, Net-MHC, Bimas). Solo per l'allele HLA-A*0201 sono stati identificati 35 potenziali epitopi in grado di legare tale elemento di restrizione. Allo scopo di identificare e validare epitopi immunogenici della proteina VK3-20 è stato utilizzato il sistema *iTopia™ high-throughput Epitope Discovery System* (Beckman Coulter). Sono stati successivamente identificati epitopi immunogenici della proteina VK3-20. Attraverso una serie di test ELISA-like di legame, di dissociazione e di affinità dei peptidi a molecole HLA in forma ricombinante, si è analizzata una libreria di 100 nonameri, sovrapposti di un aminoacido, derivati dalla proteina VK3-20. Sono quindi stati identificati 22 peptidi con moderate capacità di legare ciascuno di 7 differenti alleli HLA-A e –B (Figura 6 e Tabella 1). E' stato inoltre dimostrato che CTLs indotti in diversi donatori con la proteina VK3-20 riconoscono e uccidono in modo A2-ristretto sia bersagli caricati con peptidi A*0201 che la linea linfoblastoide SH9 esprimente naturalmente la proteina VK3-15. Ciò ad ulteriore conferma della cross-reattività delle risposte immuni indotte da epitopi della proteina VK3-20.

Esempio 6

Produzione di Ig clonotipiche ricombinanti

Allo scopo di produrre le Ig clonotipiche ricombinanti VK3-20 e VK3-15 ed implementare il processo di produzioni e purificazione, tali frammenti derivati da linfomi HCV correlati sono stati inseriti nel vettore di espressione batterico pET26b, idoneo alla produzione per uso clinico.

Sono state quindi effettuate le seguenti operazioni:

- inserimento nel vettore batterico pET26b delle sequenze nucleotidiche codificanti per VK3-20 e VK3-15
- inoculo ad una concentrazione pari all'1% del volume totale in terreno di coltura SB tamponato all'1% di glucosio
- fermentazione 8-12 ore a 37°C
- purificazione dei frammenti.

Nel passaggio di inserimento i frammenti vengono inseriti in maniera stabile nel vettore di espressione batterico pET26b resistente alla kanamicina, i frammenti prodotti vengono identificati e quantizzati con Anticorpi monoclonali (mAb) diretti contro le regioni VK. Nel passaggio di inoculo un'aliquota batterica, pET26b/VK3-20/VK3-15, pari all'1% del volume totale è inoculata in terreno SB modificato con aggiunta di tampone fosfato e all'1% di glucosio, indotto con IPTG e mantenuto in coltura per tutta la notte ad una temperatura di 37°C, passaggio di fermentazione. I frammenti di interesse sono purificati nel passaggio di purificazione sia dal mezzo di coltura sia dallo spazio periplasmico batterico. Il processo prevede il passaggio dell'estratto e del terreno su una resina a scambio ionico Q Sepharose FF (Amersham-GE) al fine di legare i prodotti di scarto, mentre i frammenti di interesse VK3-20 e VK3-15 sono raccolti come prodotti di eluizione della colonna ed

ulteriormente processati su resina a scambio cationico S Sepharose FF (Amersham-GE). La purezza dei frammenti VK3-20 e VK3-15 è stimata con analisi SDS-PAGE. Il processo sopra descritto ha consentito, entro tollerati limiti, di purificare circa 37 mg di frammento con una resa di 4 mg/L da estratto periplasmico e di 30 mg da terreno di coltura con una resa di 20 mg/L.

RIVENDICAZIONI

1. Vaccino comprendente almeno un segmento proteico scelto tra VK3-20 e VK3-15.

2. Vaccino secondo la rivendicazione 1 comprendente entrambi i segmenti proteici VK3-20 e VK3-15.

3. Uso di un segmento proteico scelto tra VK3-20, VK3-15 VK3-20, VK3-15 e le loro miscele, per la preparazione di un medicamento o di un vaccino per il trattamento e/o profilassi delle patologie linfoproliferative.

4. Uso secondo la rivendicazione 3 nel trattamento e/o profilassi delle patologie linfoproliferative HCV-correlate e non HCV-correlate .

5. Composizione farmaceutica per il trattamento delle linfoproliferazioni che comprende come principio attivo almeno un segmento proteico scelto tra VK3-20 e VK3-15, in miscela con almeno un eccipiente farmaceuticamente accettabile.

6. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 5 che comprende come principio attivo entrambi i segmenti proteici scelti tra VK3-20 e VK3-15.

7. Composizione farmaceutica secondo una delle rivendicazioni 5 o 6 per la somministrazione orale, parenterale o topica, da 0,1 a 1 mg di principio attivo .

8. Procedimento per la produzione di almeno un segmento proteico scelto tra VK3-20 e VK3-15 che comprende l'inserimento della sequenza nucleotidica in un vettore d'espressione adatto, la fermentazione, l'isolamento e la purificazione del detto segmento proteico.

9. Procedimento secondo la rivendicazione 8 in cui detto almeno un segmento proteico scelto tra VK3-20 e VK3-15 è inserito in un vettore d'espressione pET26b resistente alla kanamicina, a formare il ceppo batterico ricombinante

pET26b/VK3-20/VK3-15.

10. Procedimento secondo le rivendicazioni 8 o 9 in cui detto almeno un segmento proteico scelto tra VK3-20 e VK3-15 è identificato e quantizzato con mAb anti-VK.

11. Procedimento secondo una delle rivendicazioni 9 o 10, in cui detta fermentazione comprende l'inoculo dell'1% del detto ceppo batterico ricombinante pET26b/VK3-20/VK3-15 in terreno SB.

12. Procedimento secondo la rivendicazione 11 in cui detto terreno SB è tamponato.

13. Procedimento secondo la rivendicazione 12 in cui detto terreno è tamponato con tampone fosfato e contiene 1% (p/p?) di glucosio.

14. Procedimento secondo una delle rivendicazioni 11-13 in cui detto ceppo batterico ricombinante è mantenuto in coltura a 37°C per 8-12 ore.

15. Procedimento secondo una delle rivendicazioni da 8-14 in cui detto almeno un segmento proteico scelto tra VK3-20 e VK3-15 è isolato o dal mezzo di coltura o dallo spazio periplasmico batterico, tramite eluizione su resina a scambio ionico Q Sepharose FF (Amersham-GE).

16. Procedimento secondo la rivendicazione 15 in cui il prodotto della detta eluizione è purificato su resina a scambio cationico S Sepharose FF (Amersham-GE).

17. Kit comprendente la composizione farmaceutica delle rivendicazioni da 5 a 7 e/o sargramostim e/o IFN-α2a ricombinante.

18. Kit comprendente la composizione farmaceutica delle rivendicazioni da 5 a 7 comprendente 0,5 mg di principio attivo e/o sargramostim (GM-CSF, 50 $\mu g/m^2$/dose) e/o IFN-α2a ricombinante (1.000.000 UI/m^2/dose).

Dr.ssa Tiziana SANTORO (537BM)

19. Vaccino comprendente un segmento proteico in grado di riconoscere almeno uno dei 22 epitopi immunogenici identificati della proteina VK3-20.

20. Vaccino secondo la rivendicazione 19 in cui detto segmento proteico è in grado di riconoscere più di uno dei 22 epitopi identificati.

21. Vaccino secondo le rivendicazioni 19-20 in cui detto segmento proteico è in grado di riconoscere tutti i 22 epitopi identificati.

22. Uso di almeno un segmento proteico in grado di riconoscere almeno uno dei 22 epitopi immunogenici identificati della proteina VK3-20 per la preparazione di un vaccino per il trattamento e/o la profilassi delle patologie linfoproliferative.

23. Uso secondo la rivendicazione 22 per la preparazione di un vaccino per il trattamento e/o la profilassi delle patologie linfoproliferative HCV e non HCV-correlate

24. Uso secondo le rivendicazioni 22-23 in cui detto segmento proteico è in grado di riconoscere più di uno dei 22 epitopi identificati.

25. Uso secondo le rivendicazioni 22-23 in cui detto segmento proteico è in grado di riconoscere tutti i 22 epitopi identificati.

Dr.ssa Tiziana SANTORO (537BM)

Figure

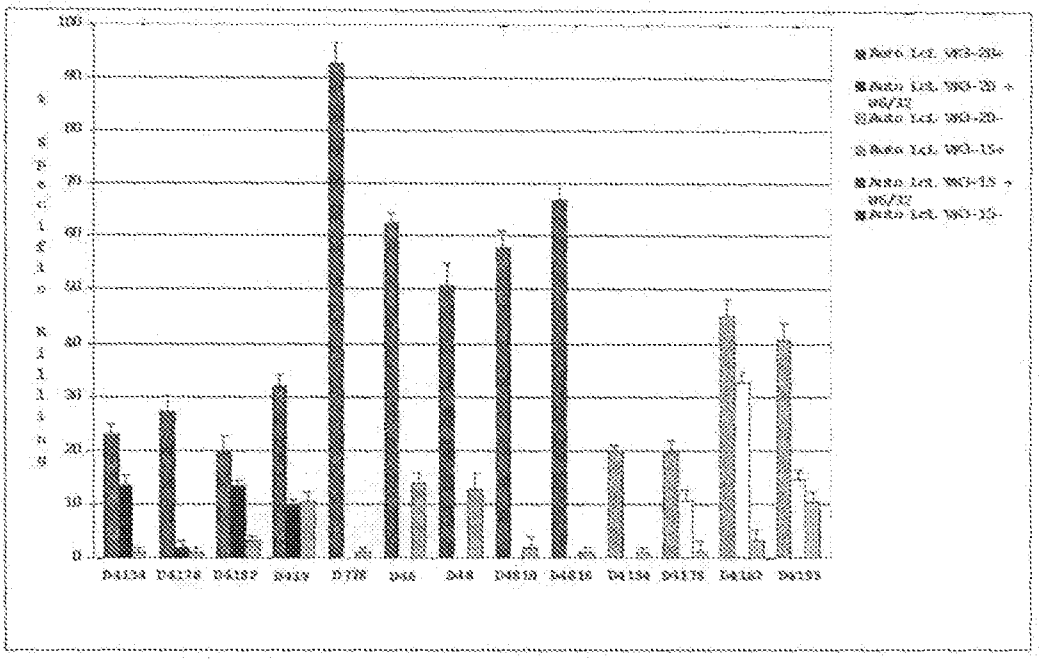


Figura 1: Attività citotossica specifica di linee Linfociti T Citotossici policlonali (CTL) sensibilizzate con segmenti proteici immunogenici ricombinanti VK3-20 o VK3-15.

MI2007 A 0 0 1 5 2 2

Dr. T. Santoro (No. Iscr. 537)

ALBO CAMERA DI COMMERCIO MILANO

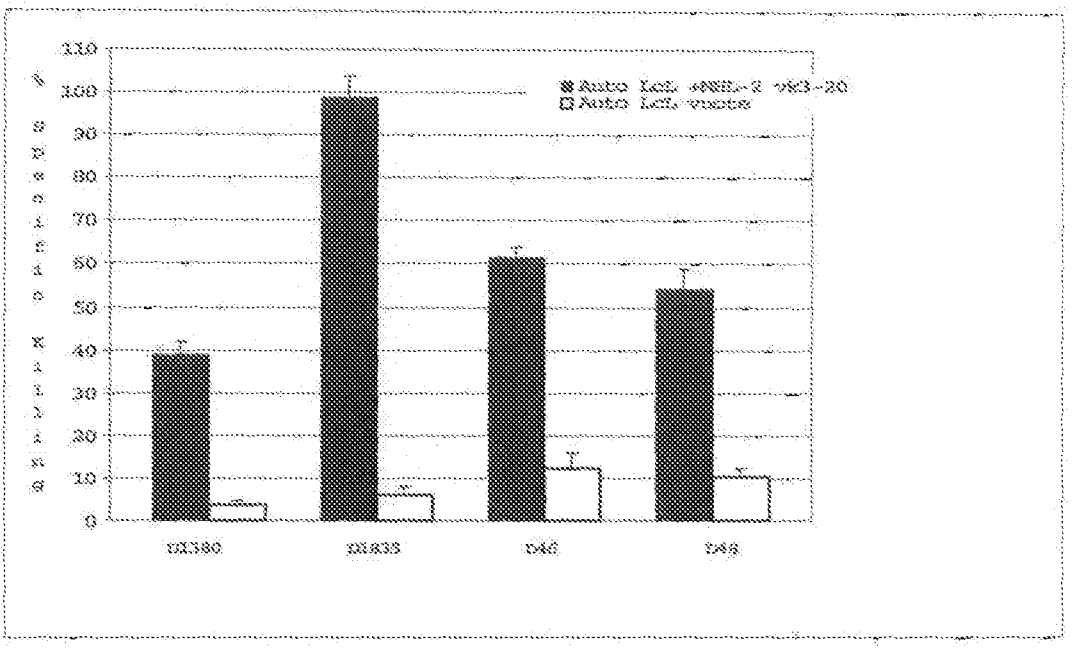


Figura 2: Linee CTL policlonali sensibilizzate con il segmento proteico immunogenico ricombinante VK3-20 di un linfoma HCV-correlato sono in grado di riconoscere ed uccidere in modo specifico bersagli autologhi caricati con una proteina VK3-20 derivata dal linfoma di un paziente diverso.

MI2007 A 00 1522

Dr. T. Saltoro (No. Iscr. 537)

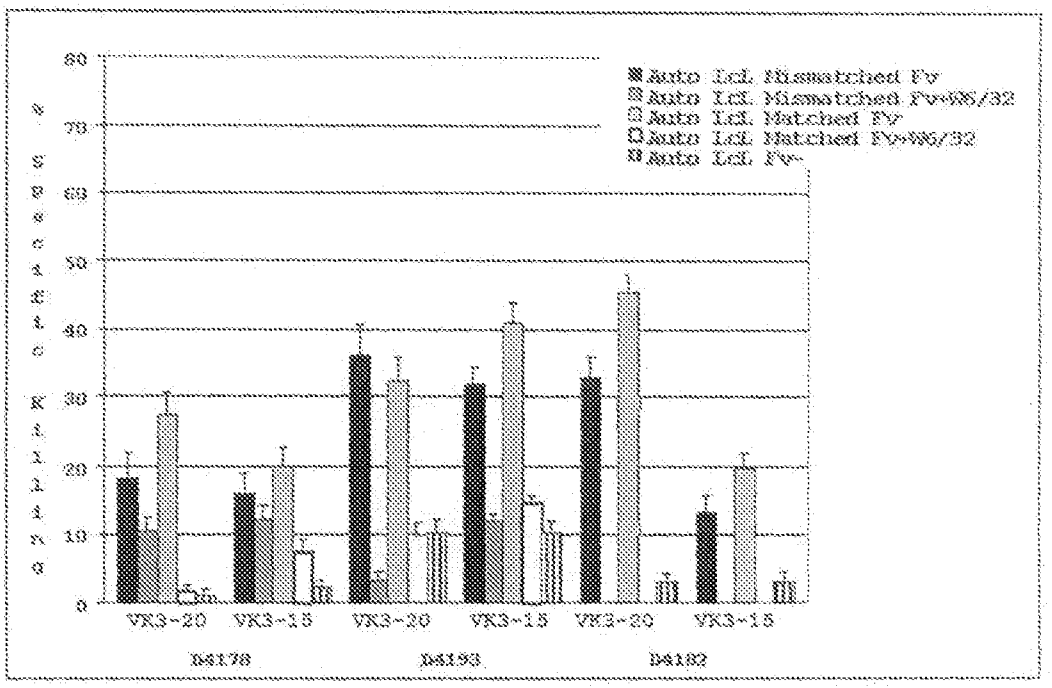
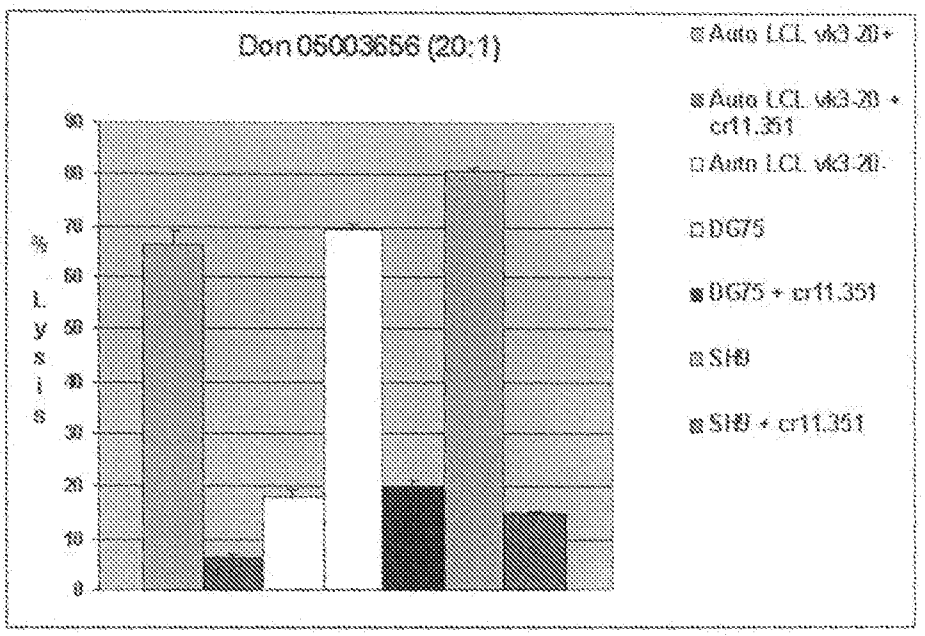


Figura 3: Attività citotossica specifica di linee CTL policlonali sensibilizzate con segmenti proteici immunogenici ricombinanti VK3-20 o VK3-15 per il riconoscimento di bersagli autologhi "accoppiati" o "discordanti".

MI2007 A00 1522

Dr. T. Salzoro (No. Iscr. 537)





Effettori: CTLs VK3-20-specifici
Bersagli: LCL autologhe
DG75 (HLA-A2, VK3-20+)
SH9 (HLA-A2, VK3-15+)

Figura 4: CTL VK3-20-specifici riconoscono e uccidono in modo HLA Classe I-ristretto sia cellule di linfoma B (DG75) naturalmente esprimenti la proteina VK3-20 che una linea linfoblastoide B (SH9) naturalmente esprimente la proteina VK3-15.

Dr. T. Santoro (No. Iscr. 537)

MI2007 A00 1522

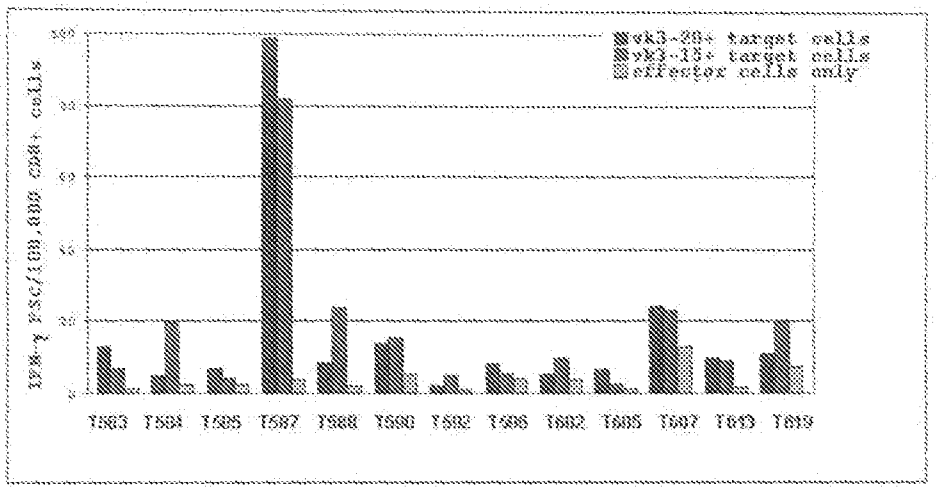


Figura 5: Presenza di risposte memoria specifiche per VK3-20 o VK3-15 da parte di linfociti T CD8+ in pazienti con linfomi HCV-correlati valutata mediante saggi INF-γ-ELISPOT

Dr. T. Santoro (No. Iscr. 537)

MI2007 A00 1522

MI2007 A00 1522

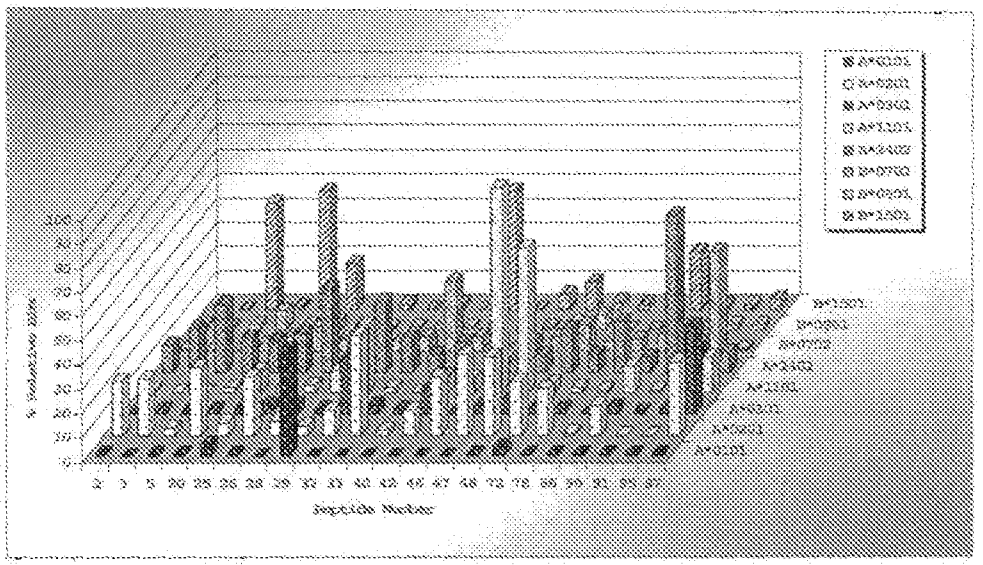


Figura 6: Percentuale relativa di legame di peptidi della proteina VK3-20 ad 8 diversi alleli HLA di Classe I determinata attraverso il sistema iTOPIA.

Dr. T. Santoro (No. Iscr. 587)

MI2007 A00 1522

CAMERA DI COMMERCIO INDUSTRIA ARTIGIANATO E AGRICOLTURA MILANO

Tabella 1:

Risultati legame

Peptide		Molecole HLA di Classe I							
N°	Sequenza	A*0101	A*0201	A*0301	A*1101	A*2402	B*0702	B*0801	B*1501
2	IVLTQSPGT	1	22	1	1	11	1	2	0
3	VLTQSPGTL	0	32	2	0	18	0	1	0
5	TQSPGTLSP	1	3	1	0	22	0	2	40
20	TLSCRASQI	1	28	2	2	14	3	3	1
23	ASQIVSSSY	5	5	2	9	13	6	2	30
26	SQIVSSSYL	1	23	4	3	16	10	3	19
28	IVSSSYLAW	0	6	4	3	34	5	2	0
29	VSSSYLAWY	55	4	2	0	12	1	1	2
32	SYLAWYQQK	0	10	21	28	29	4	1	0
33	YLAWYQQKP	0	31	4	2	14	6	2	2
40	KPGQAPRLL	0	2	2	0	7	23	1	0
42	GQAPRLLIY	0	10	10	7	12	6	3	40
46	RLLIYGASS	0	24	0	6	0	0	0	0
47	LLIYGASSR	0	13	4	37	5	4	1	6
48	LIYGASSRA	1	12	6	83	7	6	3	11
72	FTLTISRLE	4	22	2	4	18	11	6	3
78	RLEPEDFAV	1	16	2	2	7	4	0	2
86	VYYCQQYGS	1	1	0	1	21	3	0	1
90	QQYGSSPRT	1	12	3	11	6	7	1	24
91	QYGSSPRTF	1	0	1	1	65	6	1	2
92	SPRTFGQGT	1	0	2	0	32	31	2	2
97	RTFGQGTKV	1	30	33	15	8	1	3	4

MI2007 A 00 1522

Dr. T. Santoro (No. Iscr. 537)

ORDINE DEI CHIMICI E DEI FISICI - CAMERA DI CONSULTA - MILANO