

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102021000030398
Data Deposito	01/12/2021
Data Pubblicazione	01/06/2023

Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	39	12

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	39	21

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	P	31	18

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	07	K	16	28

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	07	K	16	42

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
G	01	N	33	68

Titolo

MINIBODY COME VACCINI PER L'HIV

TITOLO

“MINIBODY COME VACCINI PER L’HIV”

5

DESCRIZIONE

CAMPO TECNICO DELL’INVENZIONE

La presente invenzione si riferisce a un minibody anti-idiotipo in grado di legare specificatamente l’idiotipo di un anticorpo umano anti-gp120 ed in grado di evocare una risposta immunitaria anti-gp120. La presente invenzione si riferisce anche a composizioni immunogeniche comprendenti tale minibody ed il loro uso nel trattamento terapeutico o profilattico dell’infezione da HIV o delle malattie ad esso correlate.

15

STATO ANTERIORE DELLA TECNICA

Nel corso del tempo, l’impatto dell’infezione da HIV ha raggiunto proporzioni enormi. L’impossibilità di attuare meccanismi di controllo dell’infezione, o la loro inefficacia, ha già determinato conseguenze gravissime in diverse parti del globo. La terapia antiretrovirale, ove disponibile, ha migliorato l’aspettativa di vita dei soggetti infetti. Tuttavia è collegato ad una serie di fattori avversi che nel giro di pochi anni potrebbero ridurne l’impatto positivo. In primo luogo, le terapie oggi disponibili non riescono ad eliminare completamente il virus, ma i pazienti rimangono infetti e quindi sempre esposti al rischio di sviluppare gravi forme cliniche di infezione. Inoltre, i farmaci disponibili inducono frequentemente effetti collaterali. Di più, l’alto costo della terapia rende il suo uso assolutamente improbabile su larga scala nelle aree depresse del mondo che rappresentano il vero serbatoio di infezione a livello globale. Nel complesso, i fattori sopra descritti rendono necessaria l’elaborazione di strategie alternative o, complementari. Inoltre, per il controllo dell’infezione da HIV, lo sviluppo di un approccio vaccinale efficace avrà sicuramente un ruolo prioritario. Sfortunatamente, l’infezione da HIV è ancora oggi una sfida aperta e difficile da risolvere da parte della comunità scientifica. In effetti, gli approcci tradizionali ai vaccini, basati sulla somministrazione di particelle virali che non sono in grado di infettare ma in grado di stimolare il sistema immunitario, sono stati dimostrati come completamente inefficaci nei confronti di un virus che utilizza il polimorfismo molecolare, cioè la capacità di mutare per sfuggire alla risposta immunitaria, come arma vincente (*McMichael J., (2006) Annu. Rev. Immunol. 24: 227-55*). Anche altre

35

strategie per lo sviluppo di vaccini per il controllo dell'infezione da HIV sono risultate inefficaci. Alla luce di quanto detto è ancora di primaria importanza il problema della mancanza di un vaccino per l'HIV che sia realmente efficace. Nel brevetto EP2121763 (B1) gli inventori, autori anche della presente invenzione, hanno descritto un anticorpo monoclonale anti-immunoglobuline in grado di legarsi all'idiotipo di anticorpi umani anti-gp120. Quest'anticorpo monoclonale, che può essere definito come "anticorpo anti-idiotipo", è in grado di evocare una risposta immunitaria neutralizzante anti-gp120 nei conigli.

SOMMARIO DELL'INVENZIONE

Alla luce di un'estensiva sperimentazione compiuta dagli inventori e descritta in dettaglio nella sezione sperimentale qui riporta, è stato sorprendentemente scoperto che un anticorpo in formato *minibody* (mini-anticorpo) diretto contro l'idiotipo di anticorpi umani anti-gp120 è in grado di evocare una risposta immunitaria anti-gp120. Il formato *minibody* rispetto all'immunoglobulina completa presenta numerosi vantaggi, in particolare in termini di farmacocinetica.

Un primo oggetto della presente invenzione è un *minibody* anti-idiotipo comprendente:

- una sequenza *single chain fragment variable* (scFv) in grado di legare specificatamente l'idiotipo di un anticorpo umano anti-gp120, in cui detto scFv comprende il dominio variabile della catena pesante (VH) collegata al dominio variabile della catena leggera (VL) con una sequenza *linker*;

- una sequenza cerniera;

- un dominio IgG CH3.

Un ulteriore oggetto della presente invenzione è il minibody o una sequenza codificante detto minibody o un vettore comprendente detta sequenza secondo una qualsiasi delle forme di realizzazione qui descritte per l'uso nel trattamento terapeutico o profilattico dell'infezione da HIV o delle malattie ad esso correlate, in particolare mediante l'induzione di una risposta immunitaria neutralizzante contro l'HIV.

Una composizione immunogenica comprendente il minibody o una sequenza codificante detto minibody o un vettore comprendente detta sequenza secondo una qualsiasi delle forme di realizzazione qui descritte e un veicolante e/o diluente e/o adiuvante farmaceuticamente accettabili.

Un ulteriore oggetto è una sequenza nucleotidica codificante il minibody secondo una qualsiasi delle forme di realizzazione qui descritte o un vettore di espressione comprendente detta sequenza, in cui detta sequenza o detto vettore sono per l'uso

nel trattamento terapeutico o profilattico dell'infezione da HIV o delle malattie ad esso correlate.

I vantaggi, le caratteristiche e le modalità di impiego della presente invenzione risulteranno evidenti dalla seguente descrizione dettagliata di alcune forme di realizzazione, presentate a scopo esemplificativo e non limitativo.

BREVE DESCRIZIONE DELLE FIGURE

Figura 1. Curva di affinità dell'anticorpo b12, in formato Fab, per il minibody di P1 ad orientamento VH-VL. Grafico ricavato dai dati ottenuti in ELISA.

10 Figura 2. Curva di affinità dell'anticorpo b12, in formato Fab, per il minibody di P1 ad orientamento VL-VH. Grafico ricavato dai dati ottenuti in ELISA.

Figura 3. Rappresentazione grafica dei valori ottenuti mediante saggio ELISA gp120 del siero non diluito dei diversi conigli immunizzati con minibody di P1 orientamento VH-VL.

15 Figura 4. Rappresentazione grafica dei valori ottenuti mediante saggio ELISA gp120 del siero non diluito dei diversi conigli immunizzati con minibody di P1 orientamento VL-VH.

Figura 4B. Rappresentazione grafica dei valori ottenuti mediante saggio ELISA gp120 del siero non diluito dei diversi conigli immunizzati con minibody negativo.

20 Figura 5. Rappresentazione grafica dei valori ottenuti mediante saggio ELISA gp120 del siero diluito 1:20 FIGURA 5(A) e 1:200 FIGURA 5(B) dei diversi conigli immunizzati con minibody di P1 orientamento VH-VL.

Figura 6. Rappresentazione grafica dei valori ottenuti mediante saggio ELISA gp120 del siero diluito 1:20 FIGURA 6 (A) e 1:200 FIGURA 6 (B) dei diversi conigli immunizzati con minibody di P1 orientamento VL-VH.

25 Figura 7. Rappresentazione grafica dei valori ottenuti mediante saggio ELISA gp120 del siero diluito 1:20 FIGURA 7 (A) e 1:200 FIGURA 7 (B) dei diversi conigli immunizzati con minibody negativo.

Figura 8. Rappresentazione grafica dei valori ottenuti sulla gp120/HIV mediante saggio ELISA delle varie diluizioni del siero pre e post immunizzazione della coorte di conigli immunizzati con minibody di P1 orientamento VH-VL senza aver sottratto il segnale ottenuto sulla BSA FIGURA 8 (A) e dopo averlo sottratto FIGURA 8 (B). Nei grafici sono riportati anche i *p-value* ottenuti eseguendo il test di Wilcoxon.

30 Figura 9. Rappresentazione grafica dei valori ottenuti sulla gp120/HIV mediante saggio ELISA delle varie diluizioni del siero pre e post immunizzazione della coorte di conigli immunizzati con minibody di P1 orientamento VL-VH senza aver sottratto il segnale ottenuto sulla BSA FIGURA 9 (A) e dopo averlo sottratto FIGURA 9 (B). Nei

grafici sono riportati anche i *p-value* ottenuti eseguendo il test di Wilcoxon

Figura 10. Rappresentazione grafica dei valori ottenuti sulla gp120/HIV mediante saggio ELISA delle varie diluizioni del siero pre e post immunizzazione della coorte di conigli immunizzati con minibody negativo senza aver sottratto il segnale ottenuto sulla BSA FIGURA 10 (A) e dopo averlo sottratto FIGURA 10 (B). Nei grafici sono

Figura 11. Rappresentazione grafica dei valori ottenuti sulla gp120/HIV, dopo aver sottratto il segnale sulla BSA, mediante saggio ELISA delle varie diluizioni del siero post immunizzazione della coorte di conigli immunizzati con minibody di P1 orientamento VH-VL, minibody di P1 orientamento VL-VH e minibody negativo. Nei grafici sono riportati anche i *p-value* ottenuti eseguendo il test di Mann-Whitney.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

La presente invenzione si riferisce ad un minibody anti-idiotipo comprendente:

- una sequenza scFv in grado di legare specificatamente l'idiotipo di un anticorpo umano anti-gp120, in cui detto scFv comprende una catena pesante variabile (VH) collegata a una catena leggera variabile (VL) con una sequenza linker;
- una sequenza cerniera;
- un dominio IgG CH3.

Il termine "idiotipo" si riferisce alla totalità delle regioni ipervariabili del dominio variabile di un'immunoglobulina, vale a dire quelle strutture che caratterizzano una popolazione omogenea di molecole di anticorpi, come ad esempio le proteine di un mieloma o un anticorpo monoclonale, e quindi consentire di distinguere tra una popolazione omogenea di molecole di anticorpi e un'altra popolazione omogenea (ad esempio, tra un anticorpo monoclonale e un altro).

L'espressione "in grado di legare specificatamente l'idiotipo di un anticorpo umano anti-gp120" s'intende che il minibody della presente invenzione è in grado di reagire con l'idiotipo di un anticorpo umano diretto contro la proteina di HIV gp120 (Envelope glycoprotein GP120). L'affinità del minibody per l'idiotipo potrà essere misurata in un saggio di affinità diretto, oppure misurando la capacità d'inibire il legame dell'anticorpo con la proteina di gp120 usando saggi noti al tecnico del settore.

Il termine scFv si riferisce ad un formato anticorpale in cui i domini variabili della catena pesante (VH) e della catena leggera (VL) di un anticorpo intero tradizionale sono stati uniti da una sequenza linker, in modo da formare un frammento variabile a singola catena.

Il minibody (mini-anticorpo) è un formato di anticorpo che presenta un peso molecolare inferiore (~80kDa) rispetto all'anticorpo intero (~150kDa) mantenendo

però la proprietà di legame bivalente contro un determinato target (il formato minibody è descritto in Hu et al 1996 qui incorporato mediante referenza). Il "minibody" è un omodimero, in cui ciascun monomero è un frammento variabile a catena singola (scFv) collegato a un dominio CH3 IgG1 da una sequenza cerniera.

5 Il scFv può avere un orientamento VH-VL o VL-VH, in cui un orientamento VH-VL significa che il dominio variabile della catena pesante (VH) del scFv è a monte del dominio variabile della catena leggera (VL) e un orientamento VL-VH significa che la VL del scFv è a monte della VH. Come qui usato, "a monte" significa il verso il N-terminale di una sequenza amminoacidica o il verso dell'estremità 5' di una sequenza
10 nucleotidica. La VH e la VL sono collegate tra loro da una sequenza linker di aminoacidi, oppure della sequenza nucleotidica codificante il minibody. Come risulta dai dati riportati nella sezione sperimentale gli inventori hanno sorprendentemente scoperto che solo la configurazione VH-VL è in grado di evocare una risposta immunitaria diretta contro gp120/HIV statisticamente significativa rispetto a quella che
15 si sviluppa immunizzando un minibody negativo di controllo. Pertanto, le forme di realizzazione preferite di minibody sono quelle con l'orientamento VH-VL.

Il minibody secondo la presente invenzione risulta particolarmente vantaggioso per la loro capacità di stimolare una risposta immunitaria specifica anti-gp120 in modelli animali diversi dai topi, ad esempio nei conigli. Gli esperimenti di immunizzazione
20 descritti nella sezione sperimentale della domanda di brevetto mostrano che questi minibody, in particolare quelli rivolti contro l'idiotipo dell'anticorpo umano b12, sono in grado di evocare una risposta immunitaria specifica anti-gp120 rapida e forte. I dati ottenuti quindi indicano che i minibody qui descritti sono particolarmente utili come vaccini, in particolare per il trattamento profilattico e terapeutico dell'infezione da HIV
25 o delle malattie ad esso correlate.

Sono quindi oggetto della presente invenzione minibody in grado di reagire specificamente con l'idiotipo di anticorpi umani anti-gp120, in particolare sono oggetto della presente invenzione minibody in grado di reagire specificamente con l'idiotipo di anticorpi umani anti-gp120 diretti contro la porzione di gp-120 che lega il recettore
30 CD4, ovvero le porzioni della proteina virale gp120 che legano il recettore della cellula bersaglio e i corecettori al momento dell'infezione. Ad esempio sono oggetto della presente invenzione minibody in grado di legare specificatamente l'idiotipo dell'anticorpo umano b12 descritto in Burton et al. 'A large array of human monoclonal antibodies to type 1 human immunodeficiency virus from combinatorial libraries of
35 asymptomatic seropositive individuals' Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10134-10137 e Burton et al. 1994. 'Efficient neutralization of primary isolates of HIV-1 by a recombinant human monoclonal antibody' Science 266:1024-1027 qui incorporati

mediante referenza.

Secondo una forma di realizzazione il minibody comprende almeno un frammento variabile a catena singola (scFv), preferibilmente entrambi, in cui il dominio della catena pesante (VH) ed il dominio variabile della catena leggera (VL) corrispondono
5 rispettivamente alle sequenze SEQ ID NO:2 e SEQ ID NO:1. Secondo una forma di realizzazione la VH e VL corrispondono a quelle dell'anticorpo P1 descritte nel brevetto EP2121763 qui incorporato interamente mediante referenza. Secondo una forma di realizzazione la VH e VL hanno una sequenza almeno per il 95%, preferibilmente almeno per il 98%, ancora più preferibilmente per il 99% identiche
10 rispettivamente alle sequenze SEQ ID NO:2 e SEQ ID NO:1 o alle sequenze VH e VL dell'anticorpo P1 descritte nel brevetto EP2121763.

Secondo un aspetto dell'invenzione, il dominio variabile della catena pesante (VH) ed il dominio variabile della catena leggera (VL) per formare frammento variabile a singola catena (scFv) saranno uniti da un linker con sequenza SEQ ID NO:3. Secondo
15 una forma di realizzazione il frammento variabile a catena singola (scFv) del minibody è collegato al dominio CH3 IgG1 con una sequenza cerniera avente sequenza SEQ ID NO:6.

Secondo una forma di realizzazione il dominio CH3 IgG1 del minibody è un dominio CH3 murino, il dominio CH3 del minibody della presente invenzione potrà ad esempio
20 avere la sequenza murina SEQ ID NO:7.

Secondo una forma di realizzazione il minibody comprende almeno un scFv, preferibilmente entrambi gli scFv aventi SEQ ID NO:4 oppure SEQ ID NO:5. Secondo una forma di realizzazione preferita il minibody comprende due scFv aventi SEQ ID NO:4 avente configurazione VH-VL. Secondo una forma di realizzazione almeno un
25 scFv, preferibilmente entrambi gli scFv del minibody hanno una sequenza almeno per il 95%, preferibilmente almeno per il 98%, ancora più preferibilmente per il 99% identica alla sequenza SEQ ID NO:4.

Secondo una forma di realizzazione il minibody comprende almeno un scFv, preferibilmente entrambi gli scFv, in cui la VH e VL hanno le seguenti CDR (Complementary Determining Region, sulla base del database IMGT e/o IgBlast tool):
30 SEQ ID NO:13 Sequenza amminoacidica CDR1 catena leggera (VL)
SEQ ID NO:14 Sequenza amminoacidica CDR2 catena leggera (VL) (sequenza YAS-Tyr-Ala-Ser)
SEQ ID NO:15 Sequenza amminoacidica CDR3 catena leggera (VL)
35 SEQ ID NO:16 Sequenza amminoacidica CDR1 catena pesante (VH)
SEQ ID NO:17 Sequenza amminoacidica CDR2 catena pesante (VH)
SEQ ID NO:18 Sequenza amminoacidica CDR3 catena pesante (VH)

Secondo le forme di realizzazione descritte nel presente documento, ciascun monomero del minibody può essere codificato da una sequenza nucleotidica che include i seguenti elementi, da N-terminale a C-terminale: (a) una sequenza scFv che può legare specificatamente l'idiotipo di un anticorpo umano anti-gp120, (b) una sequenza cerniera e (c) una sequenza CH3. I minibody possono essere espressi da una cellula, una linea cellulare o altro idoneo sistema di espressione. In alcune forme di realizzazione, una linea cellulare di mammifero (ad esempio, linea cellulare CHO-K1) può essere utilizzata come sistema di espressione per produrre i minibody, potranno essere usati anche sistemi di espressione batterica (ad esempio, E. Coli, B. subtilis) sistemi di espressione di lievito (ad esempio, Pichia, S. cerevisiae) o qualsiasi altro sistema di espressione noto al tecnico del settore

Secondo una forma di realizzazione il minibody ha la sequenza SEQ ID NO:10 o SEQ ID NO:11 o una sequenza almeno per il 95%, preferibilmente almeno per il 98%, ancora più preferibilmente per il 99% identiche alla sequenza SEQ ID NO:10 o SEQ ID NO:11. È anche oggetto della presente invenzione una composizione immunogenica comprendente una quantità immunologicamente efficace di almeno un minibody anti-idiotipo dell'invenzione, preferibilmente il minibody con la VH e VL dell'anticorpo P1 descritte nel brevetto EP2121763 secondo la configurazione VH-VL e un veicolante e/o diluente farmaceuticamente accettabile.

Opzionalmente, la composizione immunogenica può comprendere ulteriormente uno o più adiuvanti. Un adiuvante è un composto che ha un'attività di stimolazione non specifica sul sistema immunitario. Esempi non limitativi di adiuvanti sono complessi immunostimolanti, le saponine, gli oli minerali, gli oli vegetali, idrossido di alluminio, fosfato di alluminio o ossido di alluminio, ecc.

È anche oggetto della presente invenzione un kit di parti comprendente un minibody anti-idiotipo dell'invenzione, e l'antigene gp120 HIV o altri antigeni naturali o artificiali, come preparazione combinata per la somministrazione simultanea, separata o sequenziale in un regime di immunizzazione terapeutica o profilattica contro l'HIV.

Infine, data la loro capacità di reagire in modo specifico con anticorpi anti-gp120/HIV, i minibody anti-idiotipo dell'invenzione, possono essere usati come reagenti diagnostici per il rilevamento di anticorpi anti-gp120 e/o sottopopolazioni di anticorpi in un campione biologico, come ad esempio un campione di siero, plasma, sangue o qualsiasi altro materiale biologico adatto derivato da un animale, incluso un essere umano, ad esempio un paziente infetto o sospettato di essere infetto dall'HIV.

Un ulteriore oggetto della presente invenzione sono sequenze nucleotidiche comprendenti o consistenti in una sequenza codificante un minibody anti-idiotipo in grado di legare specificatamente l'idiotipo di un anticorpo umano anti-gp120,

preferibilmente secondo una configurazione VH-VL, ancora più preferibilmente detta sequenza nucleotidica è una sequenza di mRNA. Vantaggiosamente, la sequenza di mRNA codificante per il minibody secondo una qualsiasi delle forme di realizzazione qui descritte può essere utilizzata per la generazione di vaccini a RNA messaggero (mRNA) con il vantaggio di essere monocistronico. Sistemi per la somministrazione in vivo del mRNA sono ad esempio descritti in Kauffman et al., 2016)(Guan & Rosenecker, 2017). In alcune forme di realizzazione dette sequenze nucleotidiche per facilitarne la veicolazione in vivo saranno formulate in nanoparticelle, per esempio in nanoparticelle lipidiche, nanoparticelle lipidiche cationiche, esempi di tali formulazioni possono essere trovati in US2020197510. Secondo una forma di realizzazione detto mRNA codifica per un minibody secondo una qualsiasi delle forme di realizzazione qui descritte, ad esempio per un minibody in grado di legare specificatamente l'idiotipo dell'anticorpo umano anti-gp120 b12. Un ulteriore oggetto della presente invenzione sono sequenze di mRNA comprendenti o consistenti in una sequenza codificante un minibody anti-idiotipo e composizioni immunogeniche che lo comprendono. In una forma di realizzazione dette sequenze nucleotidiche sono sequenze di DNA, ad esempio SEQ ID NO:9 o sequenze nucleotidiche codificanti SEQ ID NO:10.

Ulteriore oggetto della presente invenzione sono vettori comprendenti molecole di acido nucleico che codificano per minibody secondo una qualsiasi delle forme di realizzazione qui descritte ed il loro uso nella prevenzione e trattamento d'infezioni da HIV. Il gene codificante il minibody potrà essere inserito in un vettore che potrà ulteriormente comprendere sequenze di controllo della trascrizione e traduzione. Esempi di Vettori che potranno essere usati sono vettori di virus a RNA, vettori di virus a DNA, vettori di virus plasmidici, vettori di adenovirali, vettori di virus dell'herpes e vettori di retrovirus. È anche oggetto della presente invenzione una cellula ospite trasformata con uno o più vettori in grado di esprimere i minibody secondo una qualsiasi delle forme di realizzazioni qui descritte.

ESEMPI E DATI SPERIMENTALI

Disegno del minibody di P1 con due diversi orientamenti

Il minibody è una forma ingegnerizzata delle immunoglobuline in cui al formato ScFv viene aggiunta la porzione costante CH3.

Per il disegno del minibody è stato preso in considerazione l'articolo 'Effective Therapeutic Approach for Head and Neck Cancer by an Engineered Minibody Targeting the EGFR Receptor' Kim et al. PLoS One (qui incorporata mediante referenza). Nel dettaglio, per produrre i minibody di P1 con i due diversi orientamenti

(VH-VL e VL-VH), sono stati disegnati i rispettivi ScFv. Sono state prese in considerazione le sequenze variabili della catena leggera e della catena pesante dell'immunoglobulina denominata P1, anti-idiotipo dell'anticorpo umano b12, e, tra le due sequenze, è stata inserita una sequenza costituita da 18 residui amminoacidici (linker) corrispondente a SEQ ID NO:3. Questa sequenza linker permette l'assemblaggio tridimensionale delle due catene, in modo che venga mantenuta la capacità legante dell'anticorpo originario. Il linker utilizzato è stato descritto nel lavoro 'An improved linker for single chain fv with reduced aggregation and enhanced proteolytic stability' Whitlow et al. Protein Eng Des Sel 1993, in cui ne viene dimostrata la capacità di garantire una maggiore solubilità della proteina prodotta, che ne avvantaggerebbe la purificazione.

Al fine di rendere i ScFv dei minibody, è stata aggiunta la regione cerniera (Hinge), una regione flessibile presente tra la porzione variabile e quella costante degli anticorpi, e la terza porzione della regione costante della catena pesante (CH3, SEQ ID NO:8). Relativamente alla porzione CH3, la sequenza è murina (stessa specie d'origine dell'anticorpo P1), ed è stata utilizzata la sequenza dell'anticorpo MAK33, in quanto in letteratura 'Folding and association of the antibody domain C(H)3: Prolyl isomerization precedes dimerization' M J Thies et al. J Mol. Biol. è stata descritta la sua struttura cristallografica e l'omodimerizzazione dopo espressione e produzione in un sistema procariotico.

Al fine di poter clonare queste sequenze nel vettore di espressione (pCM) ('A phage display vector optimized for the generation of human antibody combinatorial libraries and the molecular cloning of monoclonal antibody fragments' Solforosi et al. New Microbiol), al 5' è stato introdotto il sito di restrizione riconosciuto dall'enzima SacI, mentre al 3' è stato introdotto il sito di restrizione riconosciuto dall'enzima SpeI. Al fine di controllare che questi siti di restrizione non fossero presenti all'interno della sequenza, si è proceduto con l'analisi di restrizione delle sequenze mediante il tool Plasma DNA. Poiché nel minibody di P1 con orientamento VH-VL il sito di restrizione era presente anche all'interno della sequenza codificante la proteina, si è provveduto a modificare la sequenza nucleotidica tramite mutazione silente. Dopo aver disegnato queste sequenze, il DNA corrispondente è stato fatto sintetizzare da una ditta specializzata.

Clonaggio dei minibody di P1 con diverso orientamento nel vettore di espressione

Il frammento nucleotidico codificante per i minibody di P1 a diverso orientamento e il vettore di espressione (pCM) sono stati digeriti con gli enzimi SacI e SpeI (New

England Biolabs, NEB). La reazione di digestione è stata condotta per 1-2h a 37°C, e il prodotto di digestione è stato analizzato mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 1%.

Avendo constatato la corretta digestione, le bande di interesse (ovvero delle bande del gene minibody di P1 VH-VL e del gene minibody di P1 VL-VH digeriti con SacI e SpeI di dimensione di ~ 1100bp, e del vettore digerito SacI e SpeI di dimensione di ~ 4000bp) sono state estratte dal gel di agarosio, mediante kit specifico (QIAGEN), seguendo le indicazioni della casa fornitrice.

Si è proceduto successivamente alle ligazioni:

- 1) gene Mb P1 VH-VL digerito SacI e SpeI + vettore digerito SacI e SpeI
 - 2) gene Mb P1 VL-VH digerito SacI e SpeI + vettore digerito SacI e SpeI
- utilizzando la T4 ligasi (NEB) e seguendo le indicazioni della casa fornitrice. Al termine, alcuni microlitri della reazione sono stati utilizzati per trasformare delle cellule di E.coli ceppo XL1blue elettrocompetenti (Stratagene). Il giorno seguente sono state fatte crescere 5 colonie, per ogni trasformazione, a 37°C in agitazione overnight. Dalle crescite è stato estratto il DNA plasmidico, mediante l'utilizzo del kit specifico (QIAGEN), che è stato sequenziato per osservare il corretto clonaggio dei frammenti di DNA.

Espressione e purificazione dei minibody di P1 a diverso orientamento

La purificazione dei minibody è stata eseguita mediante cromatografia ad affinità.

Per produrre i minibody di P1 a diverso orientamento sono state trasformate con circa 100ng di vettore (precedentemente sequenziato) delle cellule E. coli XL1blue elettrocompetenti. Il giorno seguente una colonia per ogni trasformazione è stata inoculata in 10ml di SB con ampicillina e lasciata a crescere per tutta la notte in agitazione a 37°C. Il mattino dopo, 5 ml di coltura sono stati subinoculati in 500ml di SB con ampicillina a 37°C in agitazione e, quando le colture hanno raggiunto un O.D.600nm ottimale ($\approx 0,6-0,8$), sono state indotte con 250ul di IPTG 1M e lasciate in agitazione a 30°C per tutta la notte.

Il giorno seguente, le colture sono state centrifugate (15 minuti a 3100 rcf), il pellet è stato risospeso con 20ml di PBS e sottoposto a 3 cicli di sonicazione (sonicazione 1'30", riposo 1') in ghiaccio. I detriti batterici sono stati eliminati mediante centrifugazione (30 minuti a 10571 rcf). Recuperiamo il surnatante e lo filtriamo utilizzando un filtro da 0,2 μ e procediamo con il protocollo di purificazione mediante cromatografia di affinità utilizzando la resina opportuna (ThermoFisher) e seguendo le indicazioni della casa produttrice. La quantità e il grado di purezza delle proteine purificate sono state valutate mediante corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide.

Valutazione in ELISA del legame del B12 verso i minibody di P1 a diverso orientamento

Conclusa la purificazione dei minibody di P1 a diverso orientamento, è stata valutata l'affinità dell'anticorpo anti-HIV b12, in formato Fab, verso i minibody di P1 mediante saggio ELISA. Infatti, essendo il P1 una immagine interna dell'idiotipo di b12, la premessa indispensabile per un suo funzionamento come immunogeno è la capacità di riconoscere l'anticorpo stesso.

Su una piastra da 96 pozzetti (Corning) sono stati legati circa 100ng/pozzetto del minibody ad orientamento VH-VL e la piastra è stata conservata a 4°C per tutta la notte.

Il giorno successivo, la piastra è stata lavata con H₂O (in modo da eliminare l'antigene in eccesso che non si è legato), ed è stata bloccata con una soluzione di PBS/BSA 1% (Sigma) per 1 ora a 37°C. Terminato il periodo di incubazione, la soluzione di PBS/BSA 1% è stata eliminata, e sono state aggiunte diluizioni dell'anticorpo Fab anti-HIV b12 in base 2 (da 10ng/μl). La piastra è stata incubata per 1 ora a 37°C. Terminata l'incubazione, la piastra è stata lavata 5 volte con PBS/Tween20 0,1% (Sigma) ed è stato aggiunto l'anticorpo secondario commerciale diretto contro la porzione costante delle catene leggere umane coniugato con la perossidasi di rafano (HRP, α-human Fab coniugato con HRP, Sigma). La piastra è stata incubata per 45 minuti a 37°C. Terminata l'incubazione, la piastra è stata lavata 5 volte con PBS/Tween20 0,1% e sono stati aggiunti 40ul della soluzione di sviluppo (TMB, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, Invitrogen, substrato cromogeno per la rilevazione della HRP). Dopo 15 minuti a 37°C, la reazione è stata bloccata mediante l'aggiunta di 40ul di soluzione di stop (acido solforico, Carlo Erba). La lettura colorimetrica è stata eseguita mediante lettore automatico di piastre a 450 nm (figura 1).

Lo stesso protocollo è stato seguito per la valutazione dell'affinità dell'anticorpo b12, in formato Fab, verso il minibody di P1 ad orientamento VL-VH. L'unica variazione al protocollo appena descritto riguarda il coating della piastra, in cui sono stati coatati 100ng/pozzetto del minibody di P1 ad orientamento VL-VH. I risultati di questo esperimento sono riportati in figura 2.

Utilizzo dei minibody di P1 a diverso orientamento come immunogeno in conigli

I minibody di P1 a diverso orientamento sono stati utilizzati come immunogeni in conigli per poter valutare la loro capacità di indurre una specifica risposta immunitaria diretta contro gp120/HIV, lo stesso antigene riconosciuto dall'anticorpo b12 che P1 è in grado di suscitare a seguito di una immunizzazione. Per l'immunizzazione è stato

utilizzato un protocollo basato su quello descritto in 'Anti-HIV-1 Response Elicited in Rabbits by Anti-Idiotypic Monoclonal Antibodies Mimicking the CD4-Binding Site' 2008 PLoS One.

Nel dettaglio, il protocollo di immunizzazione condotto dalla Davids Biotechnologie GmbH prevedeva l'utilizzo di coorti costituite ognuna da 5 conigli (New Zealand White Rabbits). Il protocollo presentava 5 immunizzazioni eseguite bisettimanalmente con 120ug di immunogeno (per coniglio) e come adiuvante è stato utilizzato l'adiuvante Addavax. La durata complessiva del protocollo è stata di 63 giorni, giorno del sacrificio dei diversi conigli immunizzati.

Di seguito è riportata la Tabella del protocollo di immunizzazione

Day

Order Confirmation: 3202

22.10.2018	Preimmune	Day 1
22.10.2018	1. Immunization	Day 1
05.11.2018	2. Immunization	Day 14
19.11.2018	3. Immunization	Day 28
26.11.2018	Test Bleed for ELISA Determination	Day 35
03.12.2018	4. Immunization	Day 42
17.12.2018	5. Immunization	Day 56
24.12.2018	Final Bleed	Day 63
07.01.2019	Estimated Shipping Date	

I campioni biologici ottenuti mediante questa sperimentazione sono stati i seguenti:

- siero dei conigli prima dell'inizio del protocollo di immunizzazione (siero pre-immunizzazione)

- siero dei conigli prelevato durante il protocollo di immunizzazione, test-bleed, per la valutazione dell'andamento della sperimentazione (si è osservato se il siero prelevato al giorno 35 dall'inizio della sperimentazione fosse in grado di reagire con l'antigene utilizzato per l'immunizzazione, per valutare se quindi effettivamente il coniglio si stesse siero positivizzando per quell'antigene)

- siero e milza dei conigli prelevati durante e dopo il sacrificio.

Il protocollo di immunizzazione è stato eseguito utilizzando sia i minibody di P1 a diverso orientamento, sia un minibody negativo (ovvero un minibody che non venisse legato dall'anticorpo anti-HIV b12, in formato Fab, prodotto e purificato seguendo lo stesso protocollo utilizzato per i minibody di P1 a diverso orientamento).

Valutazione della reattività dei sieri dei conigli verso la glicoproteina gp120/HIV

Al fine di valutare la capacità dei minibody di P1 a diverso orientamento di indurre nei

conigli una risposta immunitaria diretta contro gp120/HIV, è stato eseguito un saggio ELISA immobilizzando su piastra la gp120/HIV e utilizzando come anticorpo primario diverse diluizioni del siero dei conigli immunizzati (come descritto nell'articolo 'Anti-HIV-1 Response Elicited in Rabbits by Anti-Idiotypic Monoclonal Antibodies Mimicking the CD4-Binding Site' 2008 PLoS One).

Una piastra da 96 pozzetti (Corning) è stata ricoperta con 100 ng/pozzetto di gp120/HIV (strain YU2) commerciale e lasciata a 4°C per tutta la notte.

Il giorno successivo, la piastra è stata lavata con H₂O (in modo tale da eliminare l'antigene in eccesso che non si è legato) e bloccata con una soluzione PBS/BSA 1% (Sigma) per 1 ora a 37°C. Terminato il periodo di incubazione, è stata eliminata la soluzione di PBS/BSA 1% e sono stati aggiunti i sieri pre-immunizzazione e post immunizzazione non diluiti. La piastra è stata incubata per 1 ora a 37°C. Terminata l'incubazione, sono stati fatti 5 lavaggi con PBS/Tween20 0,1% (Sigma) e a ogni pozzetto sono stati aggiunti 40µl dell'anticorpo secondario α-rabbit commerciale coniugato con la perossidasi di rafano (HRP, α-rabbit coniugato con HRP, Sigma). Come controllo positivo è stato utilizzato l'anticorpo anti-HIV b12 (10ng/µl) e come controllo per eventuali segnali aspecifici dovuti all'anticorpo secondario è stato utilizzato l'anticorpo secondario α-rabbit su un pozzetto in cui non era stato aggiunto precedentemente il siero dei conigli. La piastra è stata lasciata per 45 minuti a 37°C.

Terminata l'incubazione, sono stati fatti 5 lavaggi con PBS/Tween20 0,1% e a ogni pozzetto sono stati aggiunti 40ul della soluzione di sviluppo (TMB, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, Invitrogen, substrato cromogeno per la rilevazione della HRP). Dopo 15 minuti a 37°C, la reazione è stata bloccata mediante l'aggiunta di 40ul di soluzione di stop (acido solforico, Carlo Erba). La lettura colorimetrica è stata eseguita mediante lettore automatico di piastre a 450 nm. Per valutare eventuali segnali aspecifici dei sieri, come antigene di controllo è stata utilizzata la BSA (Sigma). Il protocollo precedentemente descritto è stato utilizzato per la valutazione dei sieri ottenuti dai conigli immunizzati con minibody di P1 orientamento VH-VL (figura 3), con minibody di P1 orientamento VL-VH (figura 4) e con minibody negativo (figura 4B). Lo stesso protocollo è stato seguito per la valutazione dei sieri ottenuti dai conigli diluiti 1:20 e 1:200 immunizzati con minibody di P1 orientamento VH-VL (figura 5A/B), con minibody di P1 orientamento VL-VH (figura 6A/B) e con minibody negativo (figura 7A/B)

Analisi statistica

Per valutare se il segnale ottenuto sulla gp120/HIV utilizzando il siero dei conigli dopo l'immunizzazione avesse una rilevanza statisticamente significativa rispetto al

segnale ottenuto sulla stessa proteina utilizzando il siero dei conigli ottenuto prima dell'inizio dell'immunizzazione, si è proceduto con l'analisi Wilcoxon (test non parametrico per campioni non indipendenti) utilizzando il programma GraphPad Prism.

5 Questa analisi statistica è stata fatta per il siero dei conigli pre e post immunizzazione per ogni immunogeno utilizzato e per le varie diluizioni prese in considerazione nel saggio ELISA. Inoltre, va precisato che la significatività statistica considerata per questo test è stata di $p < 0.1$, a causa della bassa potenza del test, eseguito solo su 5 campioni (ovvero i 5 conigli che costituivano le varie coorti di immunizzazione).

10 Il test di Wilcoxon è stato effettuato sia utilizzando i segnali riportati dai sieri conigli sulla gp120/HIV (come già descritto in letteratura 'Epitopes for neutralizing antibodies induced by HIV-1 envelope glycoprotein BG505 SOSIP trimers in rabbits and macaques' P J Klasse et al. PLoS Pathog), sia sul segnale della gp120/HIV in cui si era precedentemente sottratto il segnale aspecifico ottenuto sulla BSA dallo stesso
15 siero del coniglio analizzato.

Sono riportati i grafici ottenuti mediante l'analisi statistica eseguiti per le varie diluizioni suddivisi per il minibody di P1 orientamento VH-VL (figura 8A/B), minibody di P1 orientamento VL-VH (figura 9A/B) e minibody negativo (figura 10A/B).

Per valutare quale tra i due minibody fosse l'immunogeno migliore per indurre una
20 risposta immunitaria diretta contro gp120/HIV è stata condotta il test statistico di Mann-Whitney (test non parametrico per campioni indipendenti) utilizzando il programma GraphPad Prism.

L'analisi statistica è stata condotta sul segnale ottenuto sulla gp120/HIV, dopo aver sottratto la BSA, con i sieri post-immunizzazione dei conigli divisi per coorti di
25 immunogeno (figura 11).

Osservazioni conclusive alla luce dei dati sperimentali ottenuti

I dati in nostro possesso indicano che:

- Immunizzando i conigli con il formato minibody P1 orientamento VH-VL,
30 molecola in grado di reagire con l'anticorpo b12, si è sviluppata una risposta immunitaria diretta contro gp120/HIV.
- Immunizzando i conigli con il formato minibody P1 orientamento VL-VH, molecola in grado di reagire con l'anticorpo b12, non si è sviluppata una risposta immunitaria statisticamente significativa diretta contro gp120/HIV rispetto a quella che
35 si sviluppa immunizzando con il minibody negativo.
- Immunizzando i conigli con il formato minibody negativo, molecola non in grado di reagire con l'anticorpo b12, non si è sviluppata una risposta immunitaria

diretta contro gp120/HIV.

- Immunizzando i conigli con il formato minibody P1 ad orientamento VH-VL si sviluppa una risposta immunitaria diretta contro gp120/HIV statisticamente significativa rispetto a quella che si sviluppa immunizzando con il minibody negativo.

5 Sulla base di queste osservazioni, si può concludere che l'immunizzazione con il minibody P1 con orientamento VH-VL si è dimostrata efficace nella stimolazione di una risposta anti-anti idiotipo nei conigli, risposta che come atteso è in grado di riconoscere l'antigene riconosciuto dall'idiotipo originale (quello di b12). Al contrario il formato minibody P1 con orientamento VL-VH, nonostante reagisca con l'anticorpo
10 b12 (quindi è formalmente un anticorpo anti-idiotipo), non è in grado di indurre lo stesso tipo di risposta nei conigli. I due minibody hanno identica, ma invertita, sequenza delle parti variabili, riconoscono correttamente l'epitopo di b12, ma solo uno dei due riesce a suscitare una risposta anti gp120 statisticamente significativa.

15 Descrizione sequenze

SEQ ID NO:1 Sequenza aminoacidica VL (catena variabile leggera P1)

ELVMTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSTSSYSYMHW
YQQKPGQPPKLLIKYASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNI
HPVEEEDTATYYCQHSWEIPYTFGGGTKLEIKR

20 SEQ ID NO:2 Sequenza aminoacidica VH (catena variabile pesante P1)

LEQSGAELVKPGASVKISCKASGYSTFDYMNWVKQSNG
KSLEWIGVINPNSGTTGYNQKFKGKATLTVDQSSSTAYMQ
LNSLTSEDSAVYYCAEYYYGEDPFAYWGQGTLVTVSTA
kttppsvyplapgsaaqt

25 SEQ ID NO:3 Sequenza aminoacidica linker 18 residui

GSTSGSGKPGSGEGSTKG

SEQ ID NO:4 Sequenza aminoacidica del ScFv P1 con orientamento VH-VL

LEQSGAELVKPGASVKISCKASGYSTFDYMNWVKQSNG
KSLEWIGVINPNSGTTGYNQKFKGKATLTVDQSSSTAYMQ
30 LNSLTSEDSAVYYCAEYYYGEDPFAYWGQGTLVTVSTAG
STSGSGKPGSGEGSTKGELVMTQSPASLAVSLGQRATISC
RASQSVSTSSYSYMHWYQQKPGQPPKLLIKYASNLESGV
PARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDTATYYCQHSWEIPYTF
GGGTKLEIKR

35 SEQ ID NO:5 Sequenza aminoacidica del ScFv P1 con orientamento VL-VH

ELVMTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSTSSYSYMHW
YQQKPGQPPKLLIKYASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNI

HPVEEEDTATYYCQHSWEIPYTFGGGTKLEIKRGSTSGSG
KPGSGEGSTKGLEQSGAELVKPGASVKISCKASGYSFTD
YNMNWVKQSNGKSLEWIGVINPNSGTTGYNQKFKGKATL
TVDQSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCAEYYYGEDPFAYW
5 GQGT LVTVSTA

SEQ ID NO:6 Sequenza aminoacidica della regione cerniera (hinge)

EPKSPKSADKHTAP

SEQ ID NO:7 Sequenza aminoacidica del CH3 di MAK33 (ID sequenza 1CQK_A)

PAAPQVYTIPPPLEQMAKDLVSLTCMITDFFPEDITVEWQ
10 WNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVQKSNWEAG
NTFTCSVLHEGLHNHHTTEKSLSH

SEQ ID NO:8 Sequenza aminoacidica della regione cerniera (hinge) e sequenza aminoacidica del CH3 di MAK33

EPKSPKSADKHTAPPAAPQVYTIPPPLEQMAKDLVSLTC
15 MITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFV
YSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTTEKSLSH

SEQ ID NO:9 Sequenza nucleotidica codificante il minibody di P1 orientamento VH-VL

CTCGAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGCGCTTCAGTGAAGATATC
20 CTGCAAGGCTTCTGGTACTCATTCACTGACTACAACATGAACTGGGTGAAGCA
GAGCAATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGTAATTAATCCTAACTCTGGTAC
TACTGGCTACAATCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGACCAAT
CTTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAACAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCA
GTCTATTACTGTGCAGAATATTACTACGGCGAGGATCCTTTTGCTTACTGGGGC
25 CAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTACAGCCGGCAGCACCAGCGGCAGCGGCA
AACCGGGCAGCGGCGAAGGCAGCACCAAAGGCGAACTCGTGATGACACAGTC
TCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAGGGCCACCATCTCATGCAGGG
CCAGCCAAAGTGTCAGTACATCTAGCTATAGTTATATGCACTGGTACCAACAGA
AACCAGGACAGCCACCCAACTCCTCATCAAGTATGCATCCAACCTAGAATCTG
30 GGGTCCCTGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAA
CATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATACTGCAACATATTACTGTCAGCACAGTT
GGGAGATTCCGTACACGTTCCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAACGGGA
ACCGAAAAGCCCGAAAAGCGCGGATAAAACCCATACCGCGCCGCGCGGGCT
CCACAGGTGTACACCATTCACCTCCCCTGGAGCAGATGGCCAAGGATCTAGT
35 CAGTCTGACCTGCATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGACATTACTGTGGAGTG
GCAGTGGAATGGGCAGCCAGCGGAGAACTACAAGAACACTCAGCCCATCATG
GACACAGATGGCTCTTACTTCGTCTACAGCAAGCTCAATGTGCAGAAGAGCAA

CTGGGAGGCAGGAAATACTTTACCTGCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCACA
ACCACCATACTGAGAAGAGCCTCTCCAC

SEQ ID NO:10 Sequenza aminoacidica del minibody di P1 orientamento VH-VL

LEQSGAELVKPGASVKISCKASGYSTFDYNMNWVKQSNQ
5 KSLEWIGVINPNSGTTGYNQKFKGKATLTVDQSSSTAYMQ
LNSLTSEDSAVYYCAEYYYGEDPFAYWGQGTLVTVSTAG
STSGSGKPGSGEGSTKGELVMTQSPASLAVSLGQRATISC
RASQSVSTSSYSYMHWYQQKPGQPPKLLIKYASNLESGV
PARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDTATYYCQHSWEIPYTF
10 GGGTKLEIKREPKSPKSAADKTHTAAPPAAPQVYTIPPLEQ
MAKDLVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPI
MDTDGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHH
TEKSLSH

SEQ ID NO:11 Sequenza nucleotidica codificante il minibody di P1 orientamento VL-
15 VH

GAGCTCGTGATGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAG
GGCCACCATCTCATGCAGGGCCAGCCAAAGTGTCAGTACATCTAGCTATAGTT
ATATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAACTCCTCATCAAG
TATGCATCCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTC
20 TGGGACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATACTGCAA
CATATTACTGTCAGCACAGTTGGGAGATTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACC
AAGCTGGAAATAAAACGGGGCAGCACCAGCGGCAGCGGCAAACCGGGCAGC
GGCGAAGGCAGCACCAAAGGCCTCGAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGTGAAGC
CTGGCGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGACT
25 ACAACATGAACTGGGTGAAGCAGAGCAATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGA
GTAATTAATCCTAACTCTGGTACTACTGGCTACAATCAGAAGTTCAAGGGCAAG
GCCACATTGACTGTAGACCAATCTTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAACAG
CCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAGAATATTACTACGGCGA
GGATCCTTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTACAGCCG
30 AACCGAAAAGCCCGAAAAGCGCGGATAAAACCCATACCGCGCCGCGGGCGGC
TCCACAGGTGTACACCATTCACCTCCCCTGGAGCAGATGGCCAAGGATCTAG
TCAGTCTGACCTGCATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGACATTACTGTGGAGT
GGCAGTGGAATGGGCAGCCAGCGGAGAACTACAAGAACAACACTCAGCCCATCAT
GGACACAGATGGCTCTTACTTCGTCTACAGCAAGCTCAATGTGCAGAAGAGCA
35 ACTGGGAGGCAGGAAATACTTTACCTGCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCAC
AACCACCATACTGAGAAGAGCCTCTCCAC

SEQ ID NO:12 Sequenza aminoacidica del minibody di P1 orientamento VL-VH

ELVMTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSTSSYSYMHW
YQQKPGQPPKLLIKYASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNI
HPVEEEDTATYYCQHSWEIPYTFGGGTKLEIKRGSTSGSG
KPGSGEGSTKGLEQSGAELVKPGASVKISCKASGYSFTD
5 YNMNWVKQSNGKSLEWIGVINPNSGTTGYNQKFKGKATL
TVDQSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCAEYYYGEDPFAYW
GQGTLVTVSTAEPKSPKSADKTHHTAPPAAPQVYTIPPLE
QMAKDLVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQ
PIMDTDGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHN
10 HHTEKSLSH
SEQ ID NO:13 CDR1 VL

QSVSTSSYSY

15 SEQ ID NO:14 CDR2 VL (la sequenza 14 (tyr-ala-ser) non è stata inserita nel
sequence listing perchè una sequenza inferiore a quattro residui)

YAS

20 SEQ ID NO:15 CDR3 VL

HSWEIPY

SEQ ID NO:16 CDR1 VH

25 GYSFTDYN

SEQ ID NO:17 CDR2 VH

INPNSGTT

30 SEQ ID NO:18 CDR3 VH

AEYYYGEDPFAY

35

RIVENDICAZIONI

1. Minibody anti-idiotipo comprendente:

- una sequenza scFv in grado di legare specificatamente l'idiotipo di un anticorpo umano anti-gp120, in cui detto scFv comprende il dominio variabile della catena pesante (VH) collegata al dominio variabile della catena leggera (VL) con una sequenza linker;
- una sequenza cerniera;
- un dominio IgG CH3.

2. Minibody secondo la rivendicazione 1, in cui detto scFv ha configurazione VH-VL.

3. Minibody secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui detto scFv è in grado di legare specificatamente l'idiotipo dell'anticorpo umano anti-gp120 b12.

4. Minibody secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3, in cui l'idiotipo di detto anticorpo umano anti-gp120 è diretto contro la porzione di gp-120 che lega il recettore CD4.

5. Minibody secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4, in cui detto minibody è in grado di evocare una risposta immunitaria anti-gp120, in particolare detto minibody è murino.

6. Minibody secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 5, in cui le 3 CDR di detto dominio variabile della catena pesante (VH) e le 3 CDR di detto dominio variabile della catena leggera (VL) hanno le seguenti sequenze amminoacidiche:

SEQ ID NO:13 Sequenza amminoacidica CDR1 catena leggera

Tyr-Ala-Ser (YAS) Sequenza amminoacidica CDR2 catena leggera

SEQ ID NO:15 Sequenza amminoacidica CDR3 catena leggera

SEQ ID NO:16 Sequenza amminoacidica CDR1 catena pesante

SEQ ID NO:17 Sequenza amminoacidica CDR2 catena pesante

SEQ ID NO:18 Sequenza amminoacidica CDR3 catena pesante

7. Minibody secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6, in cui di detto dominio variabile della catena pesante (VH) ha la sequenza amminoacidica SEQ ID NO:2 e di detto dominio variabile della catena leggera (VL) ha la sequenza amminoacidica SEQ ID NO:1.

8. Minibody secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 7, in cui

-detto linker ha la sequenza amminoacidica SEQ ID NO:3; e/o

-detta cerniera ha la sequenza amminoacidica SEQ ID NO:6; e/o

-detto dominio IgG la sequenza amminoacidica CH3 ha SEQ ID NO:7.

9. Minibody secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 8, in cui detto scFV ha la sequenza amminoacidica SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:5 o una sequenza almeno per il 95%, preferibilmente almeno per il 98%, ancora più preferibilmente per il 99%

identica alla sequenza SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:5.

10. Minibody secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 9, in cui detto minibody ha la sequenza amminoacidica SEQ ID NO:10 o SEQ ID NO:12 o una sequenza almeno per il 95%, preferibilmente almeno per il 98%, ancora più preferibilmente per il 99% identica alla sequenza SEQ ID NO:10 o SEQ ID NO:12.

11. Sequenza nucleotidica codificante un minibody secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 10, preferibilmente detta sequenza è una sequenza di mRNA o DNA, in particolare detta sequenza nucleotidica ha SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:11.

12. Vettore di espressione comprendente una sequenza nucleotidica secondo la rivendicazione 11.

13. Minibody secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 10 o sequenza nucleotidica secondo la rivendicazione 11 o vettore secondo la rivendicazione 12, per l'uso nel trattamento terapeutico o profilattico dell'infezione da HIV o delle malattie ad esso correlate, in particolare mediante l'induzione di una risposta immunitaria neutralizzante contro l'HIV.

14. Composizione immunogenica comprendente il minibody secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 10 o una sequenza nucleotidica secondo la rivendicazione 11 o un vettore secondo la rivendicazione 13 e un veicolante e/o diluente e/o adiuvante farmaceuticamente accettabili, in particolare per l'uso nel trattamento terapeutico o profilattico dell'infezione da HIV o delle malattie ad esso correlate.

Curva di legame Fab B12 su MB VHVL P1

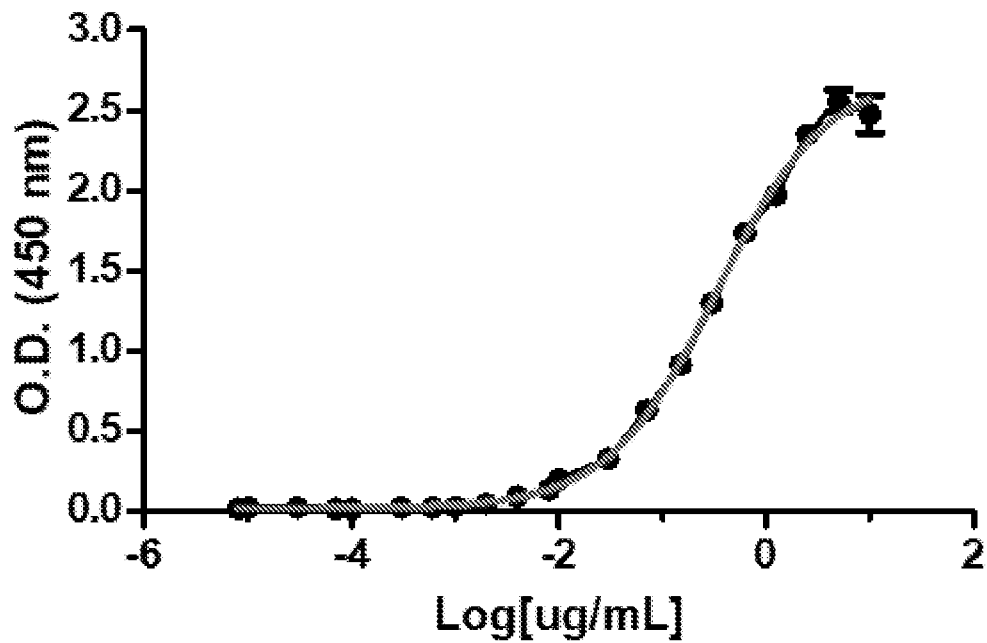


FIG. 1

Curva di legame Fab B12 su MB VLVH P1

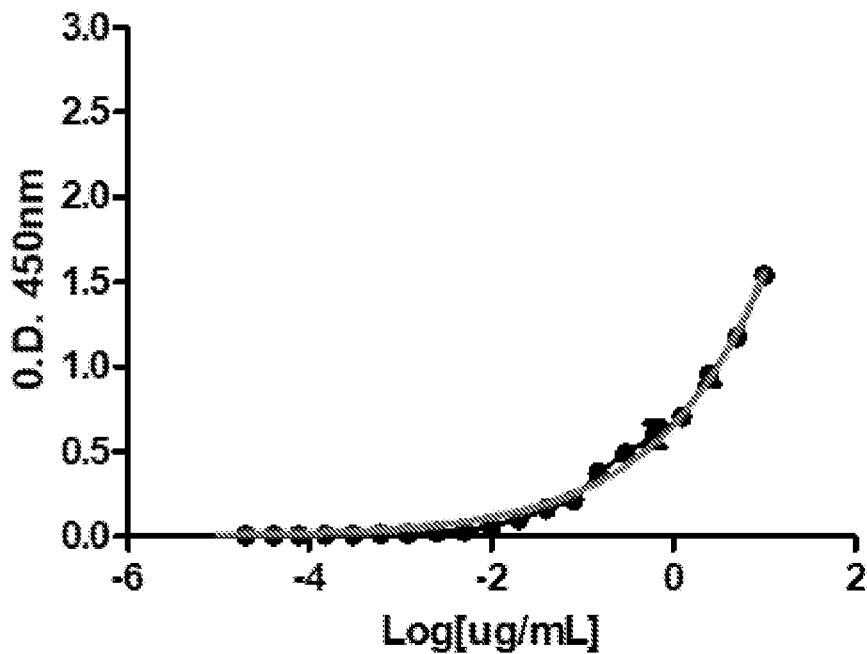


FIG. 2

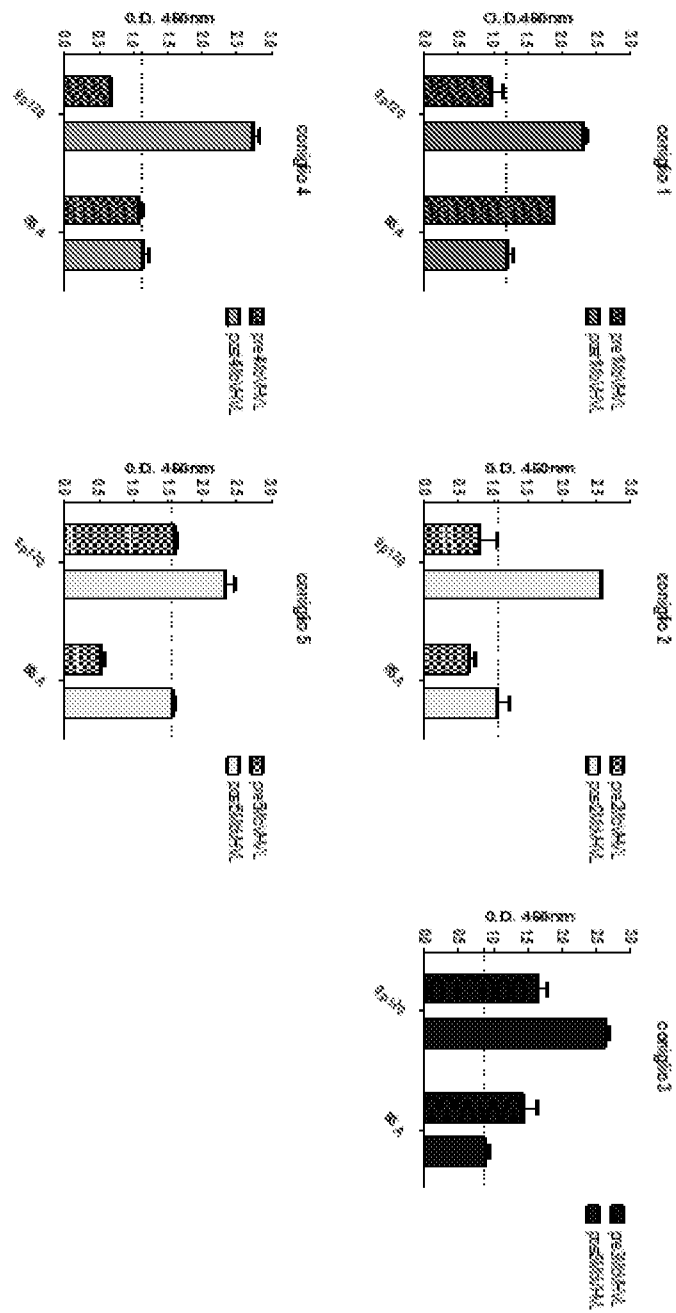


FIG. 3

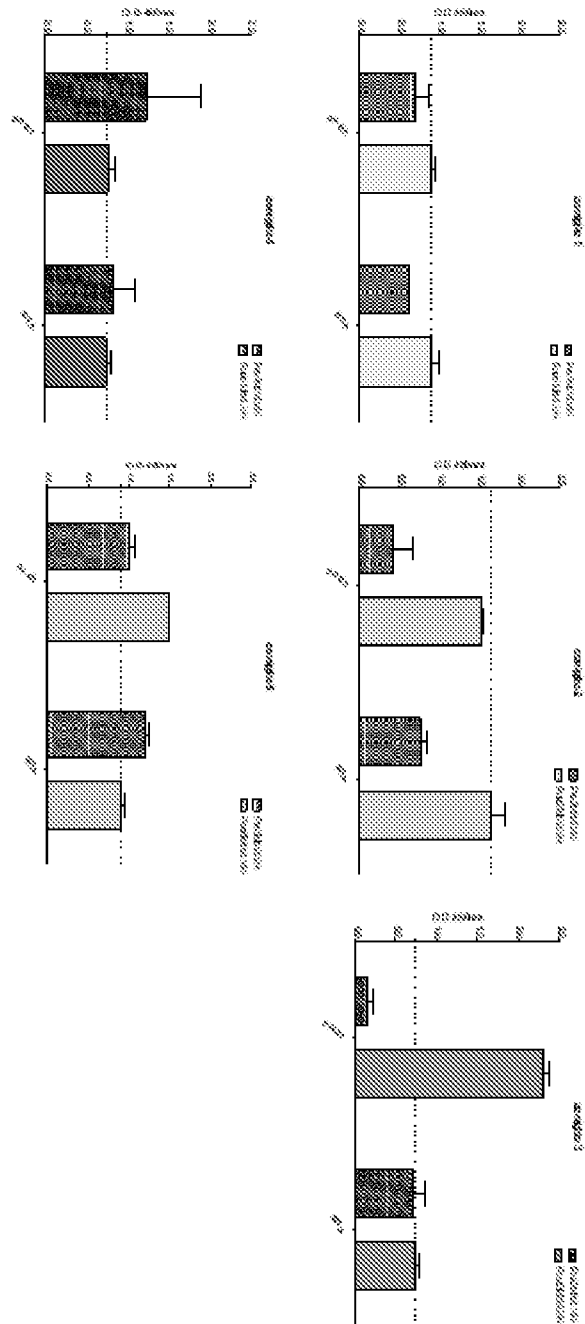


FIG. 4

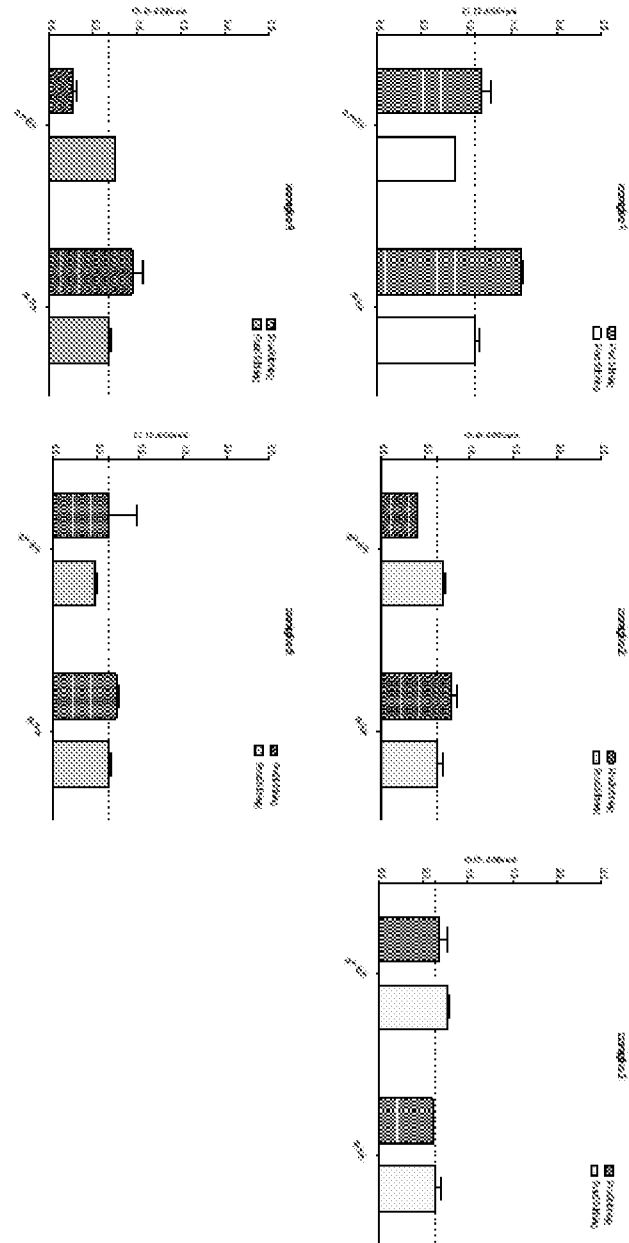


FIG. 4B

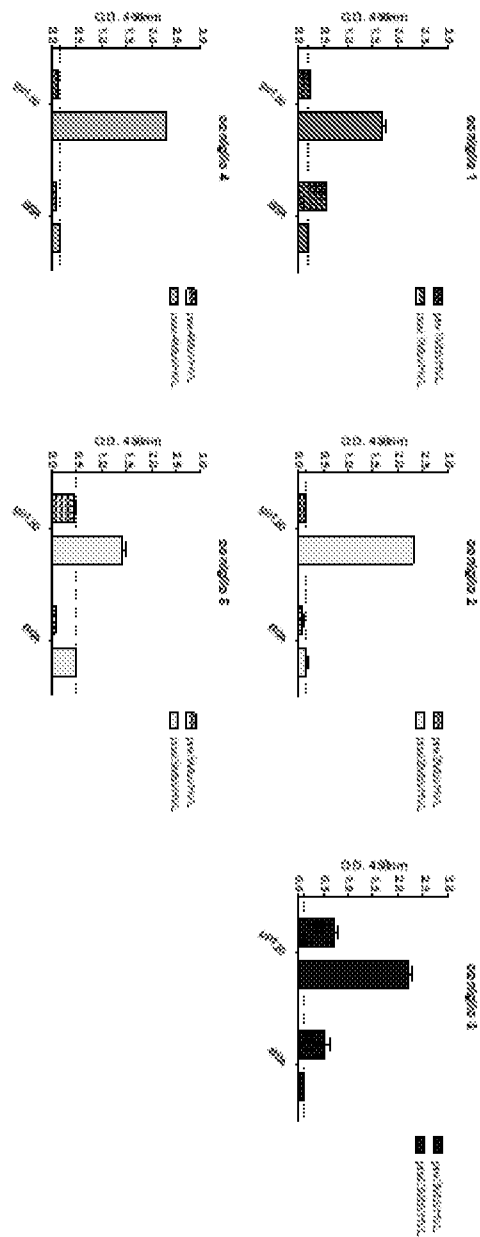


FIG. 5 A

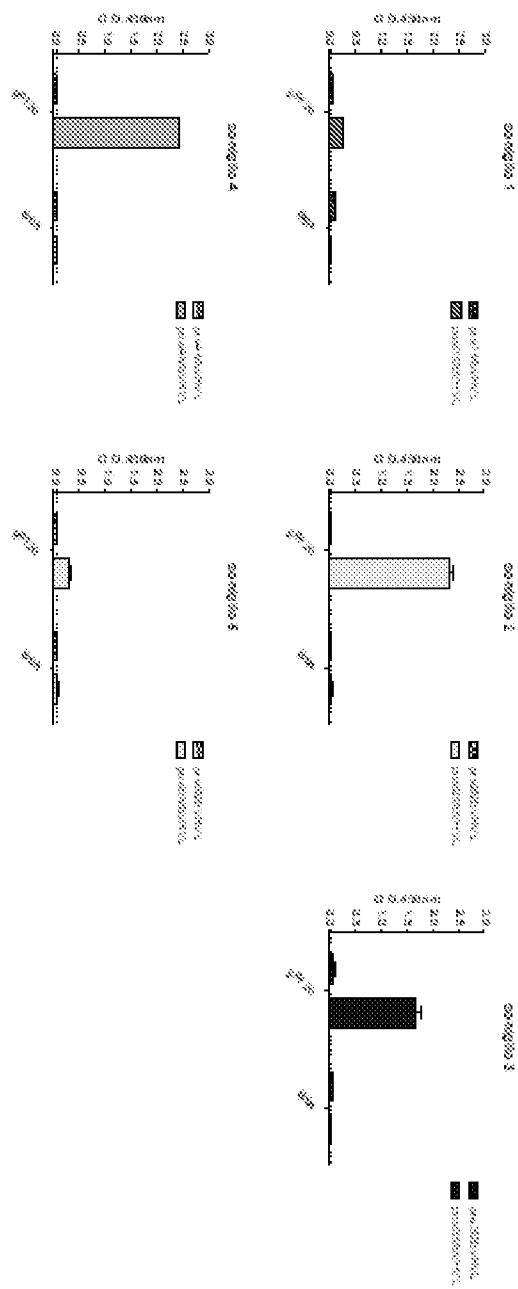


FIG. 5 B

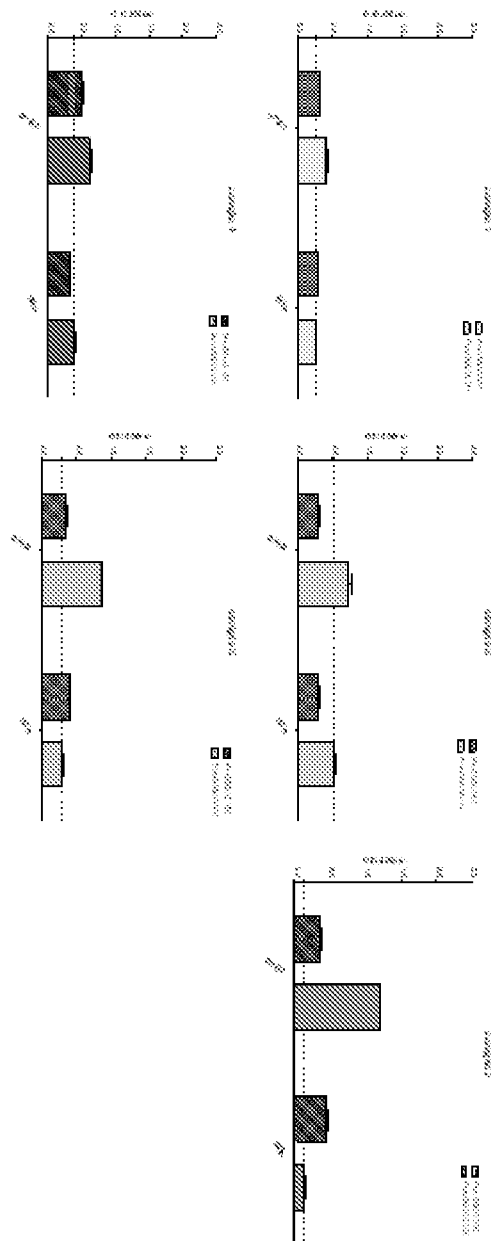


FIG. 6 A

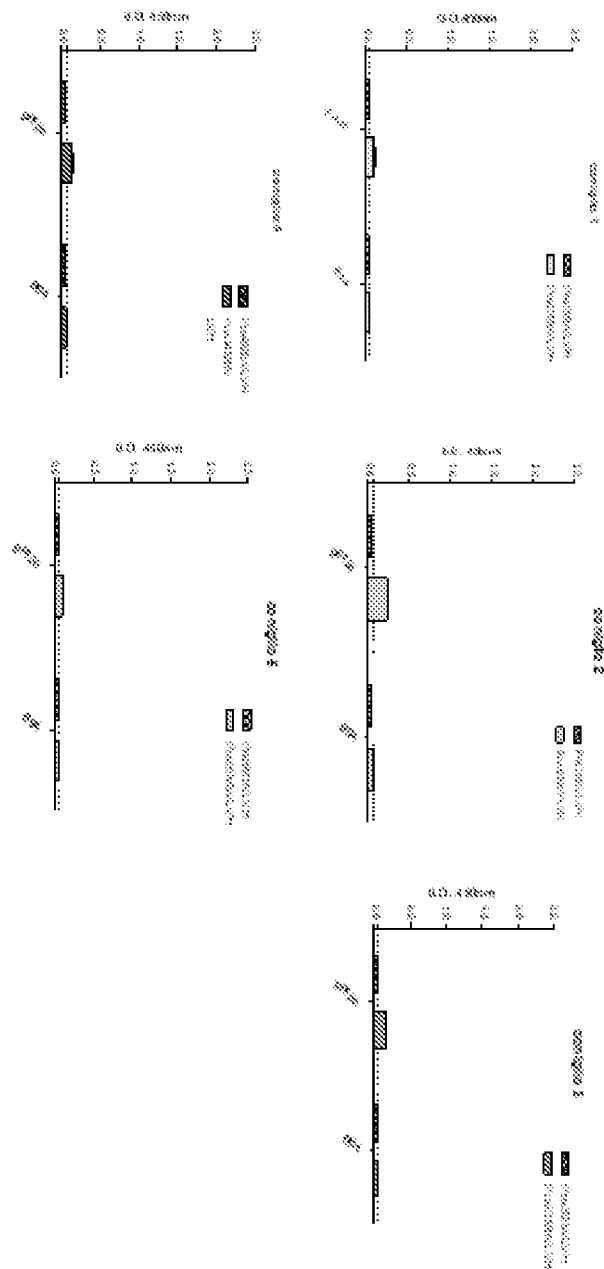


FIG. 6 B

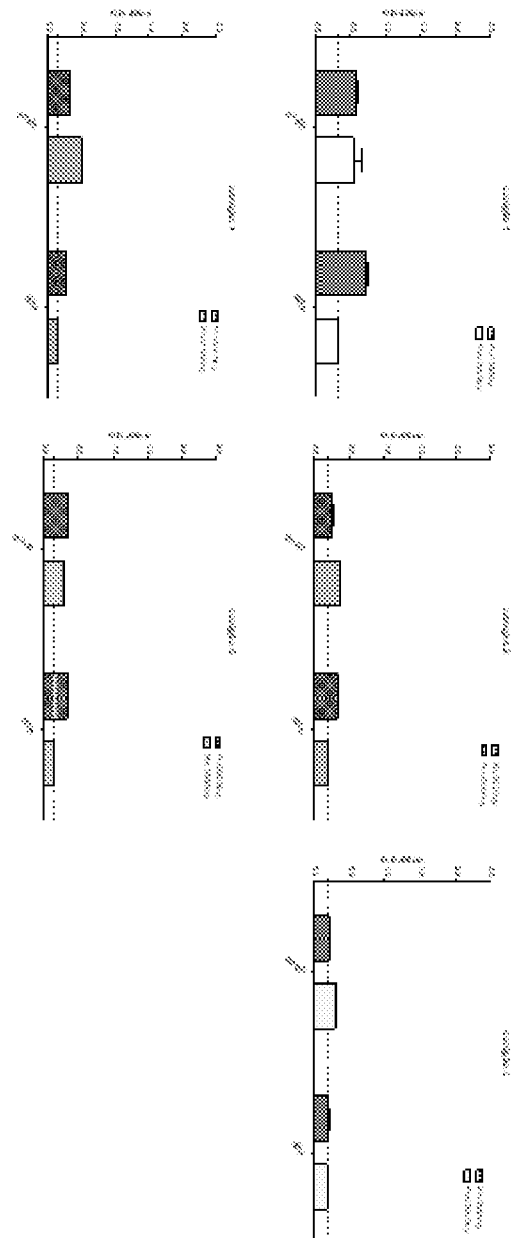


FIG. 7A

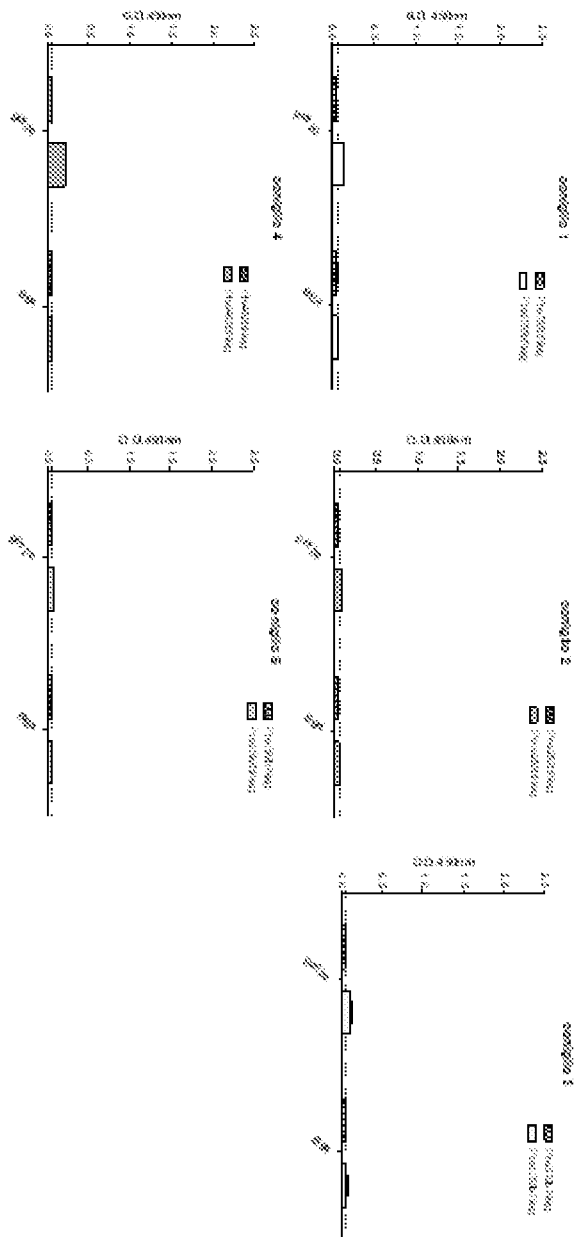


FIG. 7B

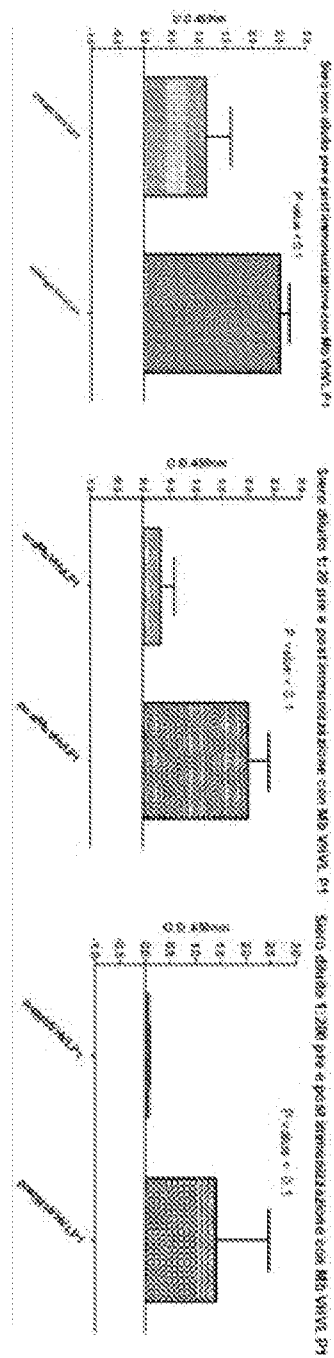


FIG. 8A

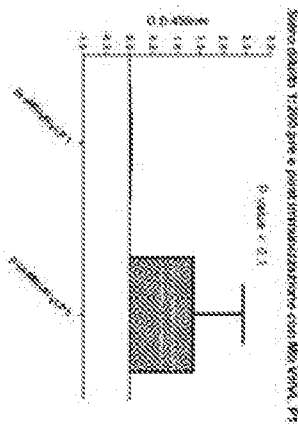
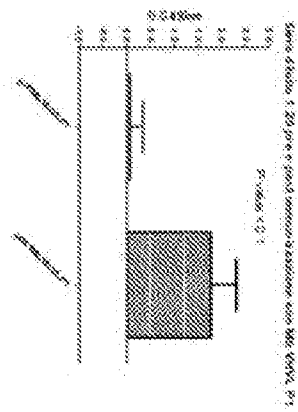
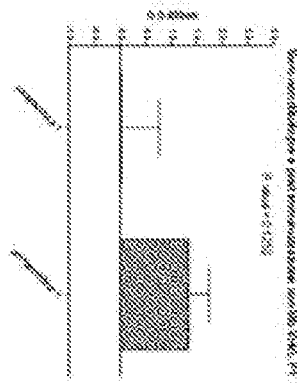


FIG. 8B

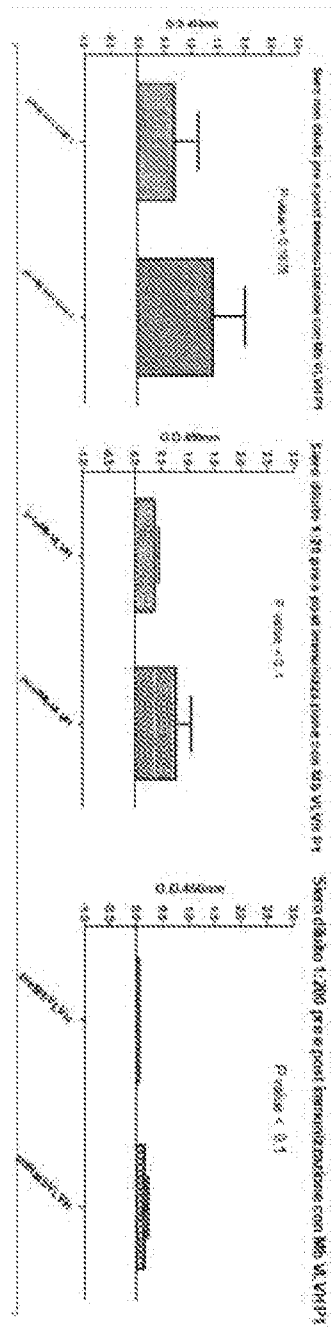


FIG. 9A

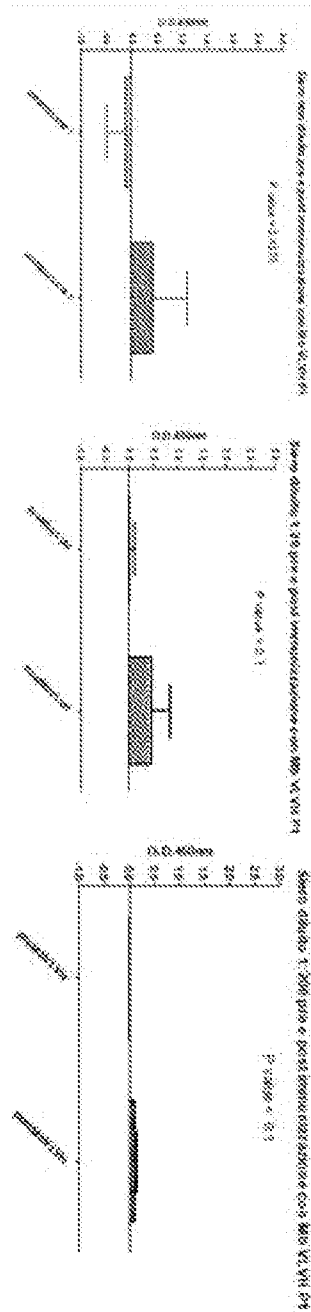


FIG. 9B

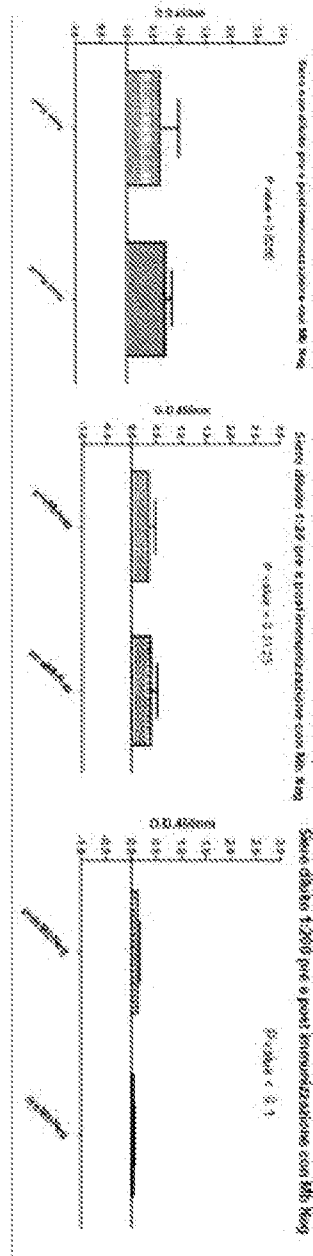


FIG. 10A

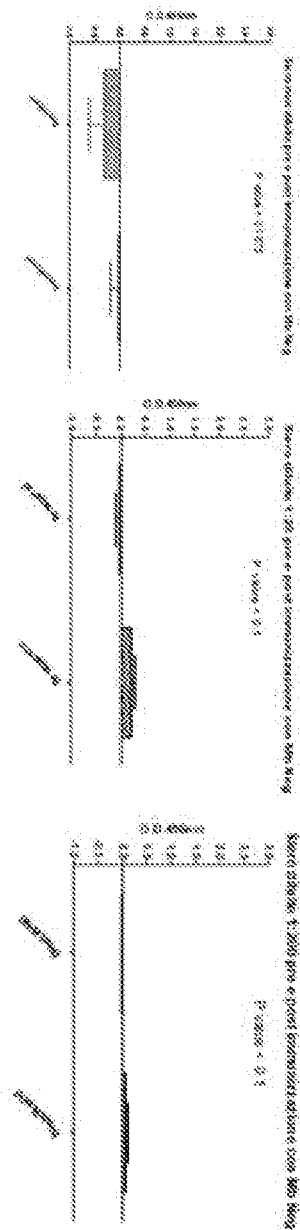


FIG. 10B

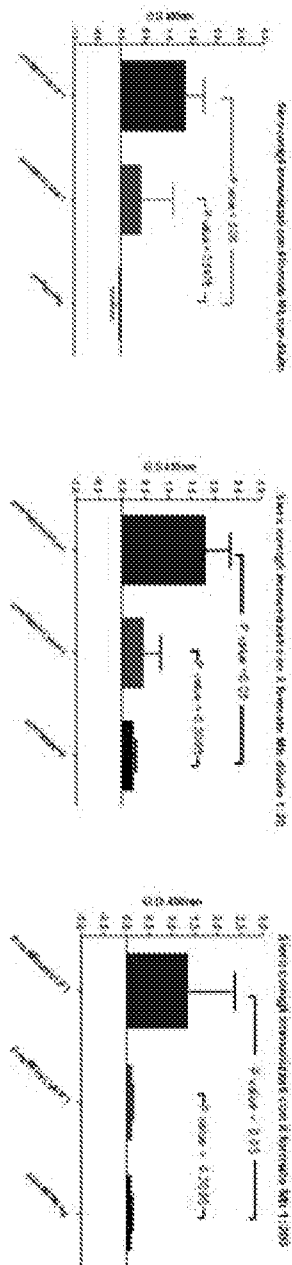


FIG. 11