



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101996900547784
Data Deposito	09/10/1996
Data Pubblicazione	09/04/1998

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		
Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	07	K		

Titolo

COMPOSIZIONE IMMUNOGENICA DA TLP

DESCRIZIONE

a corredo di una domanda di brevetto per invenzione dal titolo:

"Composizione immunogenica da TLP"

a nome: ISTITUTO FARMACOTERAPICO ITALIANO S.p.A.

inventore: Tarro Giulio

La presente invenzione concerne una composizione farmaceutica comprendente almeno una proteina da complesso TLP (Tumor Liberated Particles) per uso terapeutico e immunogenico.

I complessi TLP sono complessi proteici presenti in cellule tumorali umane. Tra le proteine TLP è descritta una proteina di 100 KDa (Tarro G., Oncology 40, 248-253, 1983). Le TLP sono isolate da tessuti tumorali come descritto nel brevetto EP n. 283443. Il brevetto EP n. 649433 identifica una proteina TLP da carcinoma polmonare. La domanda di brevetto italiana N. RM96A000496 indica che TLP da carcinomi dell'apparato uro-genitale comprendono peptidi di sequenza differente da quelli già identificati. I frammenti proteici di proteine da TLP possono essere anche prodotti per via sintetica con tecniche note.

L'autore della presente invenzione ha ora documentato in maniera accurata l'utilizzo clinico del TLP come agente immunomodulante (capace di stimolare le risposte immunitarie dell'ospite) tanto nel combattere patologie neoplastiche diagnosticate (immunoterapico), quanto per prevenire patologie cancerose (vaccino).

Forma pertanto oggetto della presente invenzione una composizione immunogenica comprendente almeno una proteina da

Ing. Barzani G. Barzani
Roma 1987

TLP o almeno un frammento immunogenico di essa in una dose farmaceuticamente efficace e accettabile.

Preferibilmente la composizione immunogenica dell'invenzione comprende un frammento immunogenico comprendente almeno una delle seguenti sequenze amminoacidiche:

ArgThrAsnLysGluAlaSerIle

GlySerAlaXPheThrAsn

AsnGlnArgAsnArgAsp.

Alternativamente la composizione immunogenica dell'invenzione comprende un frammento immunogenico comprendente la seguente sequenza amminoacidica:

GlyProProGluValGlnAsnAlaAsn.

DISEGNO SPERIMENTALE

In base all'esperienza acquisita nello studio dei modelli sperimentali i requisiti indispensabili per potere utilizzare un antigene come il TLP dal punto di vista terapeutico sono:

1. presenza dell'antigene sulla superficie delle cellule tumorali;
2. possibilità di indurre o di incrementare farmacologicamente l'espressione dell'antigene sulla superficie delle cellule;
3. capacità dell'antigene di stimolare linfociti ad attività specifica antitumorale (capacità blastogenetica ed attività CTL (linfociti T citotossici) cytotoxic tymus dependent lymphocytes);
4. presenza di TLP nel siero (indice di eventuale correlazione tra i livelli serici e l'espressione dell'antigene sulla superficie cellulare e

*Ing. Baranò & Baranò
Roma s.p.a.*

dell'assenza di sistemi di "clearance" (esecuzione renale o di altri sistemi emuntori come cutanei o intestinali) rapida dal circolo).

METODOLOGIA

Presenza dell'antigene TLP sulla superficie delle cellule tumorali.

L'antigene TLP è stato ricercato sulla superficie di cellule neoplastiche fresche ottenute da espianti di carcinomi polmonari non-microcitoma (NSCLC) mediante tecnica citofluorimetria a flusso (Facsan-BD).

La marcatura delle cellule è stata eseguita mediante l'aggiunta di anticorpo monoclonale anti-TLP (CSH # 419, Cold Spring Harbor Lab. NJ USA) coniugato (secondo step) con un secondo anticorpo di capra anti-IgG di coniglio marcato con fluorocromo (goat anti-rabbit IgG-RPE).

La specificità del legame TLP-antiTLP è stata valutata con l'impiego di antisieri aspecifici o di siero pre-immune. La specificità fenotipica delle cellule è stata valutata marcando con antiTLP cellule di linee tumorali stabilizzate o di cellule fresche provenienti da neoplasie diverse dal NSCLC.

Possibilità di indurre o di incrementare farmacologicamente la espressione dell'antigene sulla superficie delle cellule.

Le cellule sono state processate a fresco e dopo allestimento di colture primarie (terreno RPMI 1640 completo addizionato di FCS 10%).

Oltre alle variazioni del TLP sono state studiate altre possibili modificazioni fenotipiche (IL-2 rec (recettori interleuchine), HLA-Dr

Ing. Barrano & Ranardo
Roma s.p.a.

(antigene leucocitario umano), CD16 (sottopopolazioni linfocitarie), ecc.) indotte da trattamenti con agenti singoli o in combinazione (chemioterapici, citochine).

La liberazione del TLP nel sovranatante delle colture viene verificata mediante test ELISA.

Capacità dell'Ag di stimolare linfociti ad attività specifica antitumorale (capacità blastogenetica ed attività CTL).

I linfociti ottenuti dal sangue periferico dei pazienti da cui proviene l'espanto di cellule neoplastiche (linfociti autologhi) sono stati caratterizzati mediante citofluorimetria a flusso (fenotipi CD4/CD25, CD8/CD25, CD56-16-3 $\pm$ /CD25) prima e dopo il trattamento in vitro con TLP, da solo ed in associazione con chemioterapici e/o citochine.

L'attività citotossica dei linfociti autologhi (trattati e non) viene determinata mediante test del rilascio del ^{51}CR a 4h utilizzando come cellule bersaglio le cellule tumorali ottenute da espanto di tumore dello stesso paziente.

Linfociti provenienti da soggetti sani e da pazienti portatori di altre patologie neoplastiche vengono utilizzati (come effettori) contro linee cellulari neoplastiche (target NK sensibili e resistenti) quali controlli per stabilire la specificità della lisi tumorale.

RISULTATI

La presenza del TLP su cellule di carcinoma polmonare (NSCLC) è stata dimostrata con la metodica illustrata.

Il trattamento con TLP in vitro dei linfociti di pazienti portatori di NSCLC induce attività blastica particolarmente nei confronti di alcuni

Ing. Barzani G. Renato
Roma s.p.a.

fenotipi: cellule attivate che esprimono il recettore ad alta affinità per IL-2) CD3+/CD25+; cellule NK (CD56+/CD16+/CD3±); cellule citotossiche attivate CD25+/CD8+.

Fenotipi	CD25	NK	CD25/CD8
Linfociti non trattati	3,3-4,6	10,1-18,9	3,5-5,3
Linfociti + TLP*	5,5-16,1	21,4-32,2	8,6-11,3**

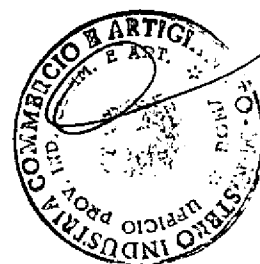
* µg/ml

** si osserva un effetto dose dipendente nell'aggiunta di TLP nel mezzo e l'attivazione delle cellule CD8+ (che raggiungono anche 20% di tutta la popolazione in coltura).

Il trattamento dei linfociti con TLP è in grado inoltre di indurre un'attività litica sia di tipo NK (cellule natural killer, cellule bersaglio K562) che CTL (verso cellule del proprio tumore). L'attività NK presenta la stessa dose dipendenza mostrata dalle cellule CD8+CD25+ e sembra inoltre strettamente correlata con il numero di queste cellule. Questa osservazione e l'assenza di attività litica (né spontanea né TLP indotta) di tipo LAK (cellule killer attivate da linfocine, verso cellule NK resistenti, Daudi) indicherebbe una specificità dell'attivazione.

I linfociti omologhi, trattati con TLP, si sono dimostrati attivi anche verso le cellule di una metastasi cerebrale da NSCLC.

Analogamente il polipeptide sintetico (CSH 275) dimostra ottima capacità immunogena. gli studi immunologici infatti indicano una stimolazione specifica dei linfociti CD8 citotossici, solo nei pazienti portatori di neoplasia NSCLS.



UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Antonio Taliencio
(N° d'iscr. 171)

Taliencio

Ing. Barzani & Barzani
Roma s.p.a.

RIVENDICAZIONI

1. Composizione immunogenica comprendente almeno una proteina da TLP o almeno un frammento immunogenico di essa in una dose farmaceuticamente efficace e accettabile.

2. Composizione immunogenica secondo la rivendicazione 1 in cui detto frammento immunogenico comprende almeno una delle seguenti sequenze amminoacidiche:

ArgThrAsnLysGluAlaSerIle

GlySerAlaXPheThrAsn

AsnGlnArgAsnArgAsp.

3. Composizione immunogenica secondo la rivendicazione 1 in cui detto frammento immunogenico comprende la seguente sequenza amminoacidica:

GlyProProGluValGlnAsnAlaAsn.

Roma, - 9 OTT. 1996

p.p. Istituto Farmacoterapico Italiano S.p.A.

ING. BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

OC

*Ing. Barzano' & Zanardo
Roma S.p.A.*

per i e per gli altri
Antonio Talierecio
(N° d'iscr. 171)

Talierecio

