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

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	**102018000007017**
Data Deposito	**06/07/2018**
Data Pubblicazione	**06/01/2020**

Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	N	15	113

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	N	15	115

Titolo

APTAMERI PER L'USO NELLA TERAPIA, PREVENZIONE, DIAGNOSI E RILEVAMENTO DEL PAPILLOMAVIRUS

Classe Internazionale: C12N 000/0000

Descrizione del trovato avente per titolo:

"APTAMERI PER L'USO NELLA TERAPIA, PREVENZIONE, DIAGNOSI E RILEVAMENTO DEL PAPILLOMAVIRUS"

a nome ULISSE BIOMED S.R.L. di nazionalità italiana con sede legale in Via Cavour, 20 - 33100 UDINE (UD)

dep. il al n.

* * * * *

CAMPO DI APPLICAZIONE

Forme di realizzazione qui descritte si riferiscono ad aptameri per l'uso nella terapia, prevenzione, diagnosi e rilevamento del Papillomavirus.

STATO DELLA TECNICA

Papillomavirus

È noto che i Papillomavirus appartengono alla famiglia dei Papillomaviridae e comprendono un gruppo eterogeneo di virus in grado di infettare uccelli, rettili, marsupiali e mammiferi (Bravo, I. G., de Sanjosé, S. & Gottschling, M. *The clinical importance of understanding the evolution of Papillomaviruses.* Trends Microbiol. 432–438 (2010)).

Secondo il database denominato Papillomavirus Episteme, (PaVe; https://pave.niaid.nih.gov/), sono stati identificati più di 250 Papillomavirus e oltre 100 di questi possono essere trovati nell'uomo (Bernard, H. U. *et al. Classification of Papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments.* Virology 70–79 (2010)).

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

I Papillomavirus umani (HPV) sono virus a DNA a filamento doppio, che infettano i tessuti epiteliali della mucosa del tratto anogenitale, della cavità orale e del tratto digerente superiore, nonché i tessuti epiteliali cutanei delle mani, dei piedi e dei tronchi (Van Doorslaer, K. et al. *Evolution of the Papillomaviridae.* Virology 11–20 (2013)). Il genere più grande è il gruppo α, che comprende 64 HPV i quali infettano principalmente gli epiteli della mucosa (HPV mucosali). I tredici HPV ad alto rischio (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59) che sono stati classificati come oncogeni e i sei tipi probabilmente ad alto rischio (26, 53, 66, 68, 73 e 82) appartengono a questo gruppo.

HPV può causare diverse tipologie di tumore, ma di certo il cancro alla cervice uterina è quello associato ad HPV in modo più significativo (Venturoli, S. et al. *Correlation of high-risk human Papillomavirus genotypes persistence and risk of residual or recurrent cervical disease after surgical treatment.* J. Med. Virol. 1434–1440 (2008)).

Oltre ai genotipi mucosali, esistono degli α-HPV cutanei considerati a basso rischio, ovvero hanno un basso potenziale oncogenico. HPV2 e 57 (che causano le verruche comuni), HPV3 e 10 (che causano le verruche piane) appartengono a questa classe. Il gruppo successivo più grande è il β, i cui membri infettano principalmente gli epiteli cutanei (Tommasino, M. et al. *The biology of beta human Papillomaviruses. Virus Research 128–138 (2017)*). Possono essere associati a tumori umani e, in particolare, a carcinomi cutanei non melanomatosi. Gli HPV dei restanti gruppi (in particolare γ, μ e ν) normalmente causano solo lesioni di tipo benigno.

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

Entrata virale dell'HPV e traffico cellulare

L'adesione del virione di HPV alle cellule bersaglio rappresenta il primo evento fondamentale nel ciclo infettivo virale. Tale processo inizia attraverso il legame extracellulare dell'eparan solfato proteoglicano (HSPG) che induce un cambiamento conformazionale delle proteine capsidiche L1 e L2; ciò porta al successivo trasferimento dei virioni a un complesso di recettori superficiali di membrana necessario per l'ingresso di molecole all'interno della cellula (Aksoy P. et al. Rev. *HPV entry into cells.* Mutat. Res. 13–22 (2017)). Nonostante il ciclo infettivo di Papillomavirus sia stato estensivamente oggetto di studio, così come la sua capacità oncogenica, il processo dell'entrata virale è al contrario uno dei meccanismi biologici meno caratterizzati.

Le proteine Kallekrein-8 (KLK8) e furina legano specificamente le proteine L1 e L2 e questo rappresenta un importante evento "attivante" che consente il successivo traffico intracellulare delle particelle virali. L'endocitosi virale avviene attraverso un processo dipendente dall'actina; la proteina tetraspanina CD151 e i suoi associati $\alpha3\beta1$, $\alpha6\beta1$ e $\alpha6\beta4$, i recettori tirosin-chinasi del fattore di crescita, l'annessina A2 e l'adattatore citoscheletrico obscurin-like 1 (OBSL1) sono coinvolti nell'ingresso di HPV16 dipendente da un microdominio arricchito da tetraspanina (TEM). È importante sottolineare che la maggior parte dei meccanismi specifici che caratterizzano l'entrata virale di Papillomavirus e il relativo trafficking intracellulare sono stati descritti solamente per un'esigua popolazione di Papillomavirus, principalmente HPV16.

Mentre l'endocitosi delle singole particelle virali legate alla superficie

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

cellulare è relativamente rapida, l'interiorizzazione delle particelle ad alta m.o.i. (*moiety of infection*) è discontinua e lenta, e impiega parecchie ore (Schelhaas M. Helenius A. et al. *Entry of human Papillomavirus type 16 by actin-dependent, clathrin- and lipid raft-independent endocytosis.* PLoS Pathog. (2012)).

Le proteine CD151 e i TEM associati probabilmente coordinano l'organizzazione e l'assemblaggio dei complessi del recettore d'ingresso; una volta assemblati e legati al virione, questi complessi facilitano l'ingresso rapido. Un ruolo simile svolto da altre tetraspanine è stato riscontrato nel caso di altri virus con o senza *envelope (*Feneant L. et al. *CD81 and hepatitis c virus (HCV) infection.* Viruses. 535–572. (2014)). Il taglio di L2 da parte di furina si verifica sulla superficie della cellula ospite e sulla matrice extracellulare (ECM) dopo il legame dei virioni con HSPG (Richards R.M. et al. *Cleavage of the Papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection.* PNAS. 1522–1527 (2006)).

Il C-terminale della furina è scisso sul residuo finale (arginina) di un sito di consenso conservato (RTKR, residui 9-12 per HPV16); vengono rimossi 12 residui N-terminali della proteina L2 di HPV16. Il significato biologico di questa scissione rimane sconosciuto, ma l'inibizione della proteolisi attraverso la mutazione del sito di taglio o l'inibizione biochimica della furina provoca alternazioni al trafficking del complesso L2 / vDNA (viral DNA), e l'infezione virale risulta potenzialmente inibita.

Il taglio mediato da furina sembra causare un cambiamento

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

conformazionale nella struttura del capside e/o della proteina L2, in quanto l'epitopo RG-1 conservato e neutralizzante (residui 17-36 per HPV16) diventa accessibile allo *staining* con tecniche di immunoistochimica poco dopo il legame del virione in modo dipendente dalla furina (Day P.M. et al. *Mechanisms of human Papillomavirus type 16 neutralization by L2 cross-neutralizing and L1 type-specific antibodies.* J. Virol.4638–4646. (2008)). Anche le ciclofiline di superficie cellulare (peptidil-prolil isomerasi, PPI) sembrano modulare la conformazione di L2, poiché l'esposizione dell'epitopo RG-1 è sensibile alla ciclosporina A, un ampio inibitore di PPI (Broniarczyk J. et al. *Human Papillomavirus infection requires the TSG101 component of the ESCRT machinery.* Virology. 460–461 (2014)).

Poco dopo l'entrata, il traffico iniziale di HPV è modulato dalla tetraspanina CD63 e dai suoi partner sintenina / ALIX. Queste molecole sono necessarie per lo smistamento dei virioni dell'HPV dai primi endosomi (EE) in acidi endosomiali tardivi (LE) e corpi multivescicolari (MVB), un prerequisito per il disassemblaggio del capside, l'*uncoating* e la segregazione del complesso L2/vDNA dalla proteina L1 (Broniarczyk J. et al. *The VPS4 component of the ESCRT machinery plays an essential role in HPV infectious entry and capsid disassembly.* Sci. Rep. (2017)).

Se il traffico degli MVB viene interrotto dal *knockdown* del fattore CD63 o della sintenina, il trasporto subcellulare del complesso L2 / vDNA risulta alterato e l'infezione è parzialmente bloccata; pertanto questi cofattori costituiscono un requisito essenziale per il trasporto virale negli MVB.

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

Di conseguenza, i componenti del macchinario ESCRT (*Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*), un gruppo di complessi citosolici di multisubunità che facilitano la maturazione endosomiale e la biogenesi degli MVB, garantiscono un'efficace infezione da HPV.

L'acidificazione endosomiale è un requisito necessario per l'infezione da HPV16, ma non è chiaro se sia semplicemente necessario per una corretta maturazione endosomiale e biogenesi degli MVB, o se l'acidificazione possa innescare anche cambiamenti conformazionali nel capside dell'HPV o nelle proteine dell'ospite che sono richieste per processi a valle come *l'uncoating* e il traffico di vDNA.

Le proteasi catepsine acido-dipendente scindono ulteriormente il capside L1 processandolo all'interno dei compartimenti endososomiali.

La proteolisi e lo smontaggio del capside possono essere visualizzati mediante immunofluorescenza con l'anticorpo monoclonale L1-7, specifico per i residui L1 303-313, localizzati nelle cavità centrali al di sotto di ciascuno dei pentameri di L1 (Bienkowska-Haba M. et al. *Cyclophilins facilitate dissociation of the human Papillomavirus type 16 capsid protein L1 from the L2/DNA complex following virus entry*. J. Virol. 9875–9887 (2012)). Questa regione è disponibile solo per il legame a L1-7 dopo la degradazione del capside, circa 8 ore dopo l'infezione.

Sebbene sia utile per la marcatura del disassemblamento del capside, la reattività di L1-7 non rivela un vero e proprio *uncoating* infettivo, poiché la colorazione viene bloccata dagli inibitori della catepsina senza alcun effetto sull'infettività. All'interno degli MVB il complesso L2 /

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

vDNA viene allontanato dalla proteina del capside L1 parzialmente degradata in maniera dipendente dalla ciclofilina (Popa A. et al. *Direct binding of retromer to human Papillomavirus type 16 minor capsid protein L2 mediates endosome exit during viral infection.* PLoS Pathog. (2015)).

Il complesso quindi si trasferisce al trans-Golgi (TGN) grazie al retromero (Popa A. et al. *Direct binding of retromer to human Papillomavirus type 16 minor capsid protein L2 mediates endosome exit during viral infection.* PLoS Pathog. (2015)), dove risiede fino all'inizio della mitosi (Di Giuseppe S. et al. *Human Papillomavirus major capsid protein L1 remains associated with the incoming viral genome throughout the entry process.* J. Virol. (2017)).

Recenti studi hanno dimostrato che una frazione del capside L1, sotto forma di pentameri conformazionalmente intatti, accompagna il complesso L2 / vDNA al TGN e al nucleo, ma il ruolo funzionale di questi pentameri di L1 rimane poco chiaro (Lipovsky A. et al. *Application of the proximity-dependent assay and fluorescence imaging approaches to study viral entry pathways.* Methods Mol. Biol. 437–451. (2015)).

La colocalizzazione di L2 / vDNA con marcatori TGN è stata confermata da numerosi studi, ma diversi gruppi hanno segnalato il trasporto di vDNA anche in siti retrogradi più distali. È stata riportata la colocalizzazione di alcuni marcatori parziali di vDNA con marcatori del cis-Golgi come il fattore GM130 e la giantina (Zhang W et al. *Vesicular trafficking of incoming human Papillomavirus 16 to the Golgi apparatus*

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

and endoplasmic reticulum requires γ-secretase activity. mBio. (2014)). Allo stesso modo, tecniche sensibili come il *Proximity Ligation Assay* hanno suggerito che i traffici retrogradi L2 / vDNA oltre il Golgi si dirigono verso il reticolo endoplasmatico (ER) (Villeneuve J. et al. *Golgi enzymes do not cycle through the endoplasmic reticulum during protein secretion or mitosis.* Mol. Biol. Cell. 141–151 (2017)).

Se questi poi rappresentino vie di infezione primarie o alternative, o anche vicoli ciechi improduttivi, non è ancora chiaro. Vale la pena notare che il flusso dinamico delle proteine all'interno dei compartimenti secretivi rende difficile determinare con precisione dove avviene la colocalizzazione tramite microscopia.

Trattamenti terapeutici delle infezioni di HPV

I trattamenti terapeutici per infezioni di HPV sono diversi a seconda della sede dell'infezione; la scelta terapeutica si differenzia in base al tipo di lesione, alla sua posizione, alla profondità, al numero e all'estensione dell'area colpita.

Ad esempio, per quanto riguarda le infezioni alla cervice uterina, si procede con tecniche di rimozione chirurgica (conizzazione), laserterapia, cauterizzazione o crioterapia, che vengono effettuate solo quando la lesione è ritenuta di alto grado e maggiormente prona al conseguente sviluppo tumorale.

Per quanto riguarda i condilomi genitali e le verruche cutanee, si procede con trattamenti chirurgici, laser, basati sulla cauterizzazione, oppure trattamenti con immunomodulanti (come Inquimod, prodotto da Aldara).

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

È possibile anche aggredire le verruche con acidi o distruggerle con il laser, con la tecnica della diatermocoagulazione o con l'azoto liquido, tuttavia tutti questi metodi provocano danni al tessuto sano e la comparsa di recidive ha una frequenza non trascurabile. Inoltre, la riparazione del tessuto è lenta e la ferita si può infettare.

Alcune verruche isolate possono essere rimosse con il cucchiaio tagliente, detto Curette, che è in grado di staccare la verruca dal resto della pelle. Esistono anche alcuni trattamenti non specifici che inducono la necrosi, la coagulazione delle proteine tissutali o la citolisi superficiale (podofillotossina, acidotricloroacetico, nitrizinc complex, acido salicilico). Esiste anche un derivato del tè verde basato su sinecatechine, un attivatore del sistema immunitario.

Ad ogni modo non esiste una terapia specifica che abbia dimostrato prova di efficacia nel determinare la completa guarigione in tutti i pazienti.

Quando le verruche regrediscono spontaneamente (circa il 65% dei casi) non lasciano cicatrici né altri reliquati, mentre la maggior parte dei trattamenti chimici, fisici, farmacologici o chirurgici comportano un rischio più o meno elevato di effetti collaterali, reazioni avverse e/o esiti dicromici o cicatriziali.

Tuttavia, le verruche possono causare un significativo dolore e disagio per il paziente, e la regressione spontanea può avvenire molto lentamente (tra uno e cinque anni). Le terapie attuali hanno un altissimo tasso di recidiva o reinfezione; l'alta contagiosità dell'infezione e l'autoinoculazione sono elementi che inducono ad una scelta a favore del

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 – 33100 UDINE

trattamento.

Un altro importante fattore da considerare in favore del trattamento delle verruche cutanee è la possibilità di eliminare le fonti di contagio, e quindi a scopo preventivo, ad esempio nei bambini in età scolare o nei soggetti che vivono/frequentano comunità.

E' consigliato a fini di prevenzione proteggere piccole lesioni cutanee che possono facilitare l'ingresso dell'agente infettivo; l'osservazione di norme igieniche elementari, come non condividere asciugamani, ciabatte e strumenti per la cura delle unghie, contribuisce alla prevenzione, ma non abbatte il rischio.

Lo stesso concetto può essere rivolto alla gestione delle infezioni genitali, sia per quanto riguarda i condilomi che le lesioni cervicali, vaginali o del pene. In tale contesto, si consiglia l'utilizzo di preservativi che fungono da barriera meccanica.

Il preservativo offre una certa protezione, ma non può prevenire totalmente l'infezione, poiché non copre la regione genitale nella sua interezza.

Pertanto, ad oggi nessuno degli strumenti preventivi conosciuti risulta efficace al 100%. È importante sottolineare che non esistono trattamenti preventivi o terapeutici farmacologici che agiscano in maniera diretta sull'infezione del Papillomavirus.

Aptameri

Gli aptameri sono acidi nucleici sintetici costituiti da oligonucleotidi, ad esempio a DNA o RNA o altre strutture secondarie di acidi nucleici, di lunghezza variabile (generalmente tra le 20 e le 100 paia di basi),

aventi la proprietà di legarsi ad una molecola o ad una proteina. Essi sfruttano le naturali interazioni che avvengono tra gli acidi nucleici e le altre molecole (proteine, peptidi, zuccheri, lipidi, piccole molecole inorganiche, ioni metallici, o macrostrutture come virus e batteri interi etc).

Come altri oligonucleotidi naturali, gli aptameri sono capaci di instaurare interazioni forti con bersagli non-nucleici, grazie alla formazione di strutture secondarie (strutture a forcine, loops, strutture quadruplex etc) che gli oligonucleotidi possono assumere oltre ai legami a idrogeno di appaiamento di basi di Watson-Crick.

Grazie a questa alta affinità hanno potenziali applicazioni in molti campi, come quello terapeutico, di drug-delivery, nei biosensori e come sistemi diagnostici. Il vantaggio principale, oltre all'alta affinità, risiede nel fatto che gli aptameri vengono sintetizzati chimicamente a bassissimo costo.

È noto che gli aptameri possono legare diverse porzioni della molecola target, e possono avere un'influenza funzionale sul target stesso; ad esempio, possono inibire la funzionalità di una proteina, o possono mascherarne i siti catalitici o di interazione con altre molecole.

Gli aptameri sono stati sviluppati nel 1990 in parallelo da due gruppi di ricerca: quello del dr. Larry Gold e del Szostak lab, che ne coniò il nome.

Gli aptameri vengono generalmente prodotti attraverso una selezione in vitro denominata SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*), che dal 2001 può essere svolta in maniera

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

automatizzata riducendo considerevolmente i tempi della selezione (da alcune settimane a pochi giorni).

Negli ultimi decenni l'uso degli aptameri come sostituti degli anticorpi ha avuto un ampio sviluppo, tra le molteplici applicazioni degli aptameri è possibile menzionare il loro uso come recettori biologici aventi scopi analitici e diagnostici e come molecole terapeutiche.

Gli aptameri offrono molti vantaggi rispetto alle proteine o a piccole molecole farmacologiche, in quanto sono sintetici (elevata riproducibilità di effetto rispetto agli anticorpi) e specifici (maggiore specificità rispetto alle piccole molecole). Gli aptameri possono esser usati direttamente in fluidi biologici o sintetici ma spesso devono essere apportate delle modifiche chimiche per garantirne la stabilità e l'efficienza di riconoscimento del bersaglio. Ad oggi, sono stati selezionati per una varietà di *target* sia aptameri a DNA che a RNA: tra cui lisozima, trombina, HIV transactiv responsive element, hemina, interferon gamma, Prostate Specific Antigen (PSA), VEGF etc.

Gli aptameri non sono solo una valida alternativa agli anticorpi ma rappresentano una peculiare classe di molecole con specifiche uniche ed un potenziale applicativo molto vasto.

È noto il documento MX-A-2010/012604 che descrive aptameri di RNA per la rilevazione e diagnosi di lesioni della cervice associate ad HPV umano, ottenuti mediante tecnica SELEX con libreria ARN, cioè una libreria di aptameri a RNA. Le proteine E2, E7 e L1 sono state utilizzate singolarmente come target per selezionare aptameri a RNA affini ad esse. Tali aptameri presentano affinità e specificità nel legame

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

con le proteine ricombinanti E2, E7 e L1 di HPV16 prodotte in batteri e sono utilizzati per la rilevazione di infezioni di HPV in campioni biologici. In questo documento noto si descrive la produzione in batteri di VLPs (*Virus Like Particles*) che sono costituite dalla sola proteina L1, ma la selezione degli aptameri non viene fatta utilizzando le VLPs. Anche qualora venissero utilizzate le VLPs per la selezione di aptameri, non sarebbero selezionati aptameri contro la proteina L2 che è contenuta nel capside dei Papillomavirus presenti in natura.

In questo documento noto inoltre, le proteine E2, E7 e L1 per la selezione di aptameri sono utilizzate in forma denaturata e quindi prive di struttura terziaria, il che non permette di ottenere aptameri che legano gli epitopi conformazionali dei capsidi dei Papillomavirus presenti in natura. Inoltre, un ulteriore fattore che limita l'efficacia di questi aptameri nel rilevamento dei virioni presenti in natura, è dovuto alla produzione delle proteine E2, E7 e L1 in sistemi procariotici (batteri). Infatti, i Papillomavirus avendo il ciclo infettivo in cellule eucariotiche, hanno normalmente proteine del capside con modificazioni post-traduzionali che i batteri non sono in grado di fare. Tali modifiche post-traduzionali hanno un significato biologico nel Papillomavirus in quanto contribuiscono a decretarne tropismo, infettività ed immunogenicità (Fang et al. *Differences in the post-translational modifications of human papillomavirus type 6b major capsid protein expressed from a baculovirus system compared with a vaccinia virus system.* Biotechnol Appl Biochem. (2000)).

Quindi in generale il documento noto descrive un sistema che non è in

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

grado di selezionare efficacemente per epitopi esposti dai Papillomavirus presenti in natura.

Esiste pertanto la necessità di perfezionare aptameri per l'uso nella terapia, prevenzione, diagnosi e rilevamento del Papillomavirus che possano superare almeno uno degli inconvenienti della tecnica sopracitata.

Per ovviare agli inconvenienti della tecnica nota e per ottenere questi ed ulteriori scopi e vantaggi, la Richiedente ha studiato, sperimentato e realizzato il presente trovato.

Altre limitazioni e svantaggi di soluzioni e tecnologie convenzionali saranno chiare ad una persona esperta del ramo a seguito della lettura della rimanente parte della presente descrizione con riferimento ai disegni ed alla descrizione delle forme di realizzazione che seguono, sebbene si intenda che la descrizione dello stato della tecnica correlato alla presente descrizione non debba essere considerata un'ammissione che quanto qui descritto sia già noto dallo stato della tecnica anteriore.

ESPOSIZIONE DEL TROVATO

Il presente trovato è espresso e caratterizzato nella rivendicazione indipendente, nelle rivendicazioni indipendenti. Le rivendicazioni dipendenti espongono altre caratteristiche del presente trovato o varianti dell'idea di soluzione principale.

In accordo con forme di realizzazione, sono previsti aptameri per l'uso nella terapia e/o prevenzione del Papillomavirus. Secondo una forma di realizzazione, i suddetti aptameri sono configurati per legare specificamente con alta affinità epitopi conformazionali e con modifiche

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

post-traduzionali appartenenti all'intero capside del Papillomavirus.

Rientrano nelle forme di realizzazione qui descritte anche un prodotto per l'applicazione topica su pelle e/o mucose, e/o un farmaco o dispositivo medicale comprendente aptameri in accordo con la presente descrizione.

Ulteriori forme di realizzazione si riferiscono anche ad un metodo per la diagnosi di Papillomavirus. Secondo una forma di realizzazione, il suddetto metodo prevede l'uso, in un campione biologico di fluido corporeo, di aptameri in accordo con la presente descrizione, in cui detti aptameri alternativamente:

- sono legati con un marcatore adatto la cui attività viene monitorata al fine di rilevare la presenza del Papillomavirus in fluidi corporei, in cui detto marcatore è un reporter a fluorescenza, oppure un enzima la cui attività può essere rilevabile elettrochimicamente, in assorbanza o luminescenza;
- fungono da anticorpo primario in tecniche immunochimiche;
- si legano ad un nanointerruttore per la rilevazione di analiti proteici;
- si utilizzano in tecniche biosensoristiche che comprendono misure in amperometria, impedenza, voltammetria, capacità, elettrochemiluminescenza, chemiluminescenza.

Ancora ulteriori forme di realizzazione si riferiscono ad un kit per la diagnosi di Papillomavirus; il suddetto kit comprende aptameri in accordo con la presente descrizione.

Ulteriori forme di realizzazione si riferiscono ad un metodo di selezione di aptameri per la terapia, prevenzione, diagnosi e rilevamento

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

del Papillomavirus, detto metodo prevedendo di generare aptameri che, oltre ad essere configurati per legare specificamente con alta affinità epitopi conformazionali e con modifiche post-traduzionali appartenenti all'intero capside del Papillomavirus, hanno specifiche caratteristiche che soddisfano contemporaneamente anche le seguenti condizioni:

i) legame con detti epitopi ad alta affinità definito mediante tecnica SELEX;

ii) legame con detti epitopi, avente funzione inibitoria definita (saggio funzionale);

iii) stabilità in fluidi corporei e/o iv) stabilità in prodotti per applicazione od uso topico su pelle o mucose, ad esempio, creme, gel ed oli;

in cui le condizioni iii) e iv) possono essere entrambe soddisfatte oppure alternative, a seconda che detti aptameri siano previsti rispettivamente per uso diagnostico in un campione biologico oppure per uso nell'applicazione topica su pelle e/o mucose.

Ancora ulteriori forme di realizzazione si riferiscono ad un metodo di identificazione di nuovi epitopi responsabili dell'infettività dei Papillomavirus. In una forma di realizzazione, tale metodo prevede di utilizzare aptameri selezionati mediante un metodo di selezione di aptameri in accordo con la presente descrizione per ottenere una dimostrazione iniziale di un sito rilevante per l'infettività che, una volta identificato, può essere utilizzato come bersaglio di farmaci o anticorpi monoclonali.

Questi ed altri aspetti, caratteristiche e vantaggi della presente divulgazione saranno meglio compresi con riferimento alla seguente

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

descrizione, alle tavole di disegno e alle annesse rivendicazioni. Le tavole di disegno, che sono integrate e facenti parte della presente descrizione, illustrano alcune forme di realizzazione del presente oggetto e, unitamente alla descrizione, si propongono di descrivere i principi della divulgazione.

I vari aspetti e caratteristiche descritte nella presente descrizione possono essere applicati individualmente, dove possibile. Questi aspetti individuali, ad esempio aspetti e caratteristiche presenti nella descrizione oppure nelle rivendicazioni dipendenti allegate, possono essere oggetto di domande divisionali.

Si fa notare che qualsiasi aspetto o caratteristica che si trovi essere già nota durante la procedura di brevettazione si intende non essere rivendicata ed essere l'oggetto di un disclaimer.

ILLUSTRAZIONE DEI DISEGNI

Queste ed altre caratteristiche del presente trovato appariranno chiare dalla seguente descrizione di forme di realizzazione, fornite a titolo esemplificativo, non limitativo, con riferimento agli annessi disegni in cui:

- la Figura 1 è un grafico esemplificativo e rappresentativo dell'effetto sulle cellule HaCaT dell'aggiunta di aptameri specifici per HPV selezionati mediante SELEX, misurato in termini di vitalità cellulare;
- la Figura 2 è uno schema di flusso di una tecnica utilizzata per selezionare aptameri in accordo con forme di realizzazione qui descritte.

DESCRIZIONE DI FORME DI REALIZZAZIONE

Si farà ora riferimento nel dettaglio alle varie forme di realizzazione

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

del trovato, delle quali uno o più esempi sono illustrati nelle figure allegate. Ciascun esempio è fornito a titolo di illustrazione del trovato e non è inteso come una limitazione dello stesso. Ad esempio, le caratteristiche illustrate o descritte in quanto facenti parte di una forma di realizzazione potranno essere adottate su, o in associazione con, altre forme di realizzazione per produrre un'ulteriore forma di realizzazione. Resta inteso che il presente trovato sarà comprensivo di tali modifiche e varianti.

Prima di descrivere le forme di realizzazione, si chiarisce, inoltre, che la presente descrizione non è limitata nella sua applicazione ai dettagli come descritti nella seguente descrizione utilizzando le figure allegate. La presente descrizione può prevedere altre forme di realizzazione ed essere realizzata o messa in pratica in altri svariati modi. Inoltre, si chiarisce che la fraseologia e terminologia qui utilizzata è a fini descrittivi e non deve essere considerata come limitante.

Salvo che siano definiti altrimenti, tutti i termini tecnici e scientifici utilizzati qui e di seguito hanno lo stesso significato comunemente inteso da una persona di ordinaria esperienza nel campo della tecnica cui appartiene il presente trovato. Anche se metodi e materiali simili o equivalenti a quelli qui descritti possono essere utilizzati nella pratica o nelle prove di verifica della presente divulgazione, di seguito sono descritti, a titolo di esempio, i metodi e i materiali. In caso di conflitto prevale la presente domanda, incluse le definizioni. I materiali, metodi ed esempi hanno carattere puramente illustrativo e non devono essere intesi in modo limitativo.

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

Forme di realizzazione qui descritte riguardano l'uso di aptameri composti da strutture secondarie di acidi nucleici sintetici ed aptameri composti da strutture secondarie di acidi nucleici modificate chimicamente per prevenire, limitare, trattare, rilevare e diagnosticare infezioni causate da Papillomavirus. Tali aptameri sono stati selezionati per essere stabili in fluidi corporei, per legare sia epitopi lineari che conformazionali presenti nell'intero capside del Papillomavirus inibendo la sua infettività cellulare.

In particolare, un aspetto della presente descrizione si riferisce ad aptameri per l'uso nella terapia e/o prevenzione del Papillomavirus, detti aptameri essendo configurati per legare specificamente con alta affinità epitopi conformazionali e con modifiche post-traduzionali appartenenti all'intero capside del Papillomavirus.

Qui e nella presente descrizione, con l'espressione "modifiche post-traduzionali" si intendono per esempio glicosilazioni, fosforilazioni, mannosilazioni, sumoilazioni, ubiquitinazioni, metilazioni, acilazioni, prenilazione, coniugazione con glicosifosfatidilinositolo, lipoilazione, coniugazione con composti a base di flavina, coniugazione a gruppi EME, fosfopanteteinilazione, basi di Schiff, alchilazioni, amidazione, poliglutamilazione, poliglicilazione, butirilazione, gamma-carbossilazione, idrossilazione, iodinazione, aggiunta di nucleotidi (ADP-ribosilazione), adenilazione, uridilazione, propionilazione, coniugazione con S-glutatione, S-nitrosilazione, S-sulfenilazione, S-sulfinilazione, succinilazione, carbamilazione, carbonilazione, biotinilazione, ossidazione, pegilazione, ISGilazione, neddilazione,

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

pupilazione, citrullinazione, deamidazione, eliminilazione, aggiunta di ponti disolfuro, racemizzazione.

Gli aptameri o miscela di aptameri che possono essere utilizzati in associazione con le forme di realizzazione qui descritte possono essere scelti tra una o più delle seguenti tipologie di aptameri:

- aptameri a DNA: sono più economici da produrre, sono stabili fino ad un anno a temperatura ambiente senza perdita di performance e hanno un'emivita in termini di ore in campioni biologici complessi come il sangue, contenente nucleasi;
- aptameri a RNA: sono più costosi da produrre e sono più instabili, ma possono essere modificati per essere molto stabili in campioni biologici complessi come il sangue per resistere alle nucleasi;
- aptameri a PNA (*peptide nucleic acids*): hanno una struttura simile al DNA ma basata su un'ossatura peptidica; pertanto è insensibile all'azione sia delle nucleasi che delle proteasi;
- aptameri a XNA (*xeno nucleic acids*): contengono analoghi "innaturali" delle basi azotate che ne conferiscono una particolare resistenza a nucleasi e proteasi;
- aptameri a LNA (*locked nucleic acids*): contengono ribonucleotidi modificati con un legame aggiuntivo che congiunge l'ossigeno al 2' con il carbonio al 4'; sono estremamente affini, specifici e stabili;
- spiegelmeri: sono aptameri a RNA ma con un'ossatura basata su L-ribosio anzichè D-ribosio.

In forme di realizzazione possibili, gli aptameri possono essere aptameri di DNA, di RNA, di PNA, di XNA, di LNA, spiegelmeri. Un

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

possibile esempio realizzativo sono aptameri di DNA. Un altro possibile esempio realizzativo sono aptameri di RNA.

La Richiedente ha vantaggiosamente utilizzato la tecnica SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*) mediante la quale è possibile individuare e selezionare aptameri che legano target come ad esempio una proteina.

In particolare, la Richiedente ha utilizzato la tecnica SELEX per selezionare aptameri che soddisfano i seguenti requisiti:

a) legare non solo le singole proteine del capside virale ma anche legare strutture complesse del capside virale come epitopi conformazionali comprendenti anche elementi proteici con modifiche post-traduzionali: infatti la SELEX non è stata eseguita con le proteine virali ma con i capsidi interi;

b) la Richiedente ha riscontrato che non tutto ciò che lega il capside inibisce l'infezione virale; quindi in concomitanza al legame la capacità degli aptameri selezionati è inibitoria nei confronti dell'infezione virale da Papillomavirus;

c) gli aptameri possiedono caratteristiche intrinseche e/o dovute a modifiche chimiche e/o nucleotidiche in grado di conferire stabilità delle molecole in fluidi corporei;

d) la possibilità di essere impiegati in maniera vincente per la diagnosi o il trattamento del Papillomavirus.

Gli aptameri utilizzati in accordo con la presente descrizione sono stati selezionati in vitro mediante tecnica SELEX. Gli aptameri leganti il capside del Papillomavirus hanno dimostrato di possedere una elevata

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

affinità e stabilità. Gli aptameri selezionati hanno un significativo effetto protettivo in vitro in quanto proteggono le cellule dall'infezione virale preservandone la vitalità se infettate con Papillomavirus.

Poiché il DNA è generalmente riconosciuto come sicuro per le applicazioni topiche, è un candidato allettante per uso anti-virale topico ad ampio spettro, per bloccare la trasmissione e l'autoinfezione dell'HPV (il DNA è classificato come condizionante della pelle - Cas-no 9007-49-2).

Quindi, gli aptameri delle forme di realizzazione qui descritte sono stati selezionati contro gli pseudovirioni di Papillomavirus, non contro le singole proteine di Papillomavirus come ad esempio E2, E7 e L1; tali pseudovirioni sono strutture molto complesse, sono interi capsidi assemblati che hanno potere infettivo. Vantaggiosamente tali strutture di pseudovirioni sono la struttura quanto più simile ai Papillomavirus presenti in natura a differenza delle particelle virali VLPs in quanto queste ultime contengono solo la proteina L1 mentre gli pseudovirioni sono composti da L1 e L2 assemblate in un capside, proprio accade in Papillomavirus *wilde-type*. In aggiunta, gli pseudovirioni vengono prodotti in cellule eucariotiche e hanno un pattern di glicosilazione che è quanto più simile a quello dei virioni naturali del Papillomavirus, al contrario delle proteine singole, che sono solamente parti di virus, prodotte in batteri; questi ultimi peraltro sono organismi molto differenti dalle cellule eucariotiche in quanto non sono provvisti di un apparato in grado di effettuare modifiche post-traduzionali.

In questo modo, come meglio descritto nel prosieguo, gli aptameri

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

ottenuti tramite tale SELEX sono ulteriormente selezionati per capacità inibitoria dell'infezione virale e pertanto biologicamente attivi. Vengono quindi selezionati popolazioni di aptameri biologicamente attivi che riconoscono anche elementi di giunzione dei capsomeri, epitopi proteici con modifiche post-traduzionali ed epitopi conformazionali che non sarebbe possibile ottenere se si utilizzassero le proteine singole di HPV, come ad esempio E2, E7 e L1. In particolare, la parte di target della tecnica SELEX non è una proteina singola, bensì è un'unità biologica attiva, cioè l'intera struttura dello pseudovirione, cioè interi capsidi assemblati di Papillomavirus che hanno potere infettivo.

In accordo con forme di realizzazione, pertanto, è previsto anche un metodo di selezione di aptameri per la terapia, prevenzione, diagnosi e rilevamento del Papillomavirus, detto metodo prevedendo di generare aptameri aventi specifiche caratteristiche non solo definite dal legame al capside virale ma anche che soddisfano contemporaneamente le seguenti condizioni:

i) legame con il capside ad alta affinità (SELEX);

ii) legame con effetto inibitorio sull'infezione virale (saggio funzionale);

iii) stabilità in fluidi corporei e/o iv) stabilità in prodotti per applicazione ad uso topico su pelle o mucose, ad esempio, creme, gel ed oli.

Gli aspetti iii) e iv) possono essere entrambi presenti o alternativi, ad esempio a seconda che gli aptameri siano previsti per uso diagnostico in un campione biologico (aspetto iii), oppure per uso nell'applicazione topica su pelle e/o mucose (aspetto iv).

Qui e nel seguito della descrizione, per mucosa si intende una

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

membrana che ricopre la faccia interna di alcuni apparati organici, quale la mucosa vescicale, la mucosa nasale, la mucosa vaginale, la mucosa rettale, la mucosa orale, intendendo anche la regione interna della bocca gengive comprese, la mucosa labiale, la mucosa orofaringea, e che viene continuamente mantenuta umida dalla secrezione di ghiandole mucipare o di altra natura.

In particolare, gli aptameri utilizzabili in accordo con le forme di realizzazione qui descritte potrebbero esser contenuti, compresi o formulati in prodotti per applicazione od uso topico su pelle o mucose quali ad esempio:

- creme e saponi per la pelle e mucose;
- oli, gel, saponi e lubrificanti per il corpo;
- colluttori, dentifrici, pomate, spray e altri prodotti per la salute e l'igiene orale;
- contraccettivi meccanici;
- vettori non virali in grado di trasfettare gli aptameri a livello intracellulare.

Come sopra descritto, ad oggi non esiste alcuna molecola attiva che efficacemente è in grado di prevenire o contrastare direttamente l'infezione da Papillomavirus. In tale contesto le forme di realizzazione qui descritte risolvono tale problema attualmente irrisolto, ed in particolare possono essere utilizzate:

1) a scopi preventivi, per evitare o ridurre la possibilità di contagio sia a livello cervicale, anogenitale, orale o cutaneo, ossia in tutti quei compartimenti ove gli Papillomavirus possono generare un'infezione

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

dannosa per i tessuti;

2) a scopi terapeutici, in caso di conclamate lesioni di Papillomavirus a livello cervicale, anogenitale, orale o cutaneo, in modo da impedire l'autoinfezione e propagazione del Papillomavirus abbattendo i tassi di recidiva e garantendo l'adeguato e risolutivo trattamento dell'infezione stessa;

3) a scopi diagnostici, in quanto l'aptamero marcato può essere utilizzato per il rilevamento del Papillomavirus in campioni biologici e conseguentemente per la diagnosi dell'infezione;

4) come strumento scientifico di indagine molecolare per la scoperta e caratterizzazione di nuovi epitopi responsabili dell'infettività virale. Non tutti gli epitopi legati all'infettività virale sono noti; infatti trovando tramite la qui descritta tecnica un aptamero in grado di inibire fortemente l'infezione e andandone a studiare l'epitopo è possibile caratterizzare nuovi siti di interazioni ancora sconosciuti.

Inoltre, forme di realizzazione qui descritte possono essere utilizzate anche nel settore della ricerca di base e applicata per la visualizzazione delle particelle virali in modelli cellulari, modelli animali, o sistemi in vitro.

Nello specifico, ad esempio la Richiedente ha condotto sperimentazioni per investigare l'effetto di aptameri specifici per Papillomavirus selezionati mediante SELEX in accordo con la presente descrizione, sulle cellule HaCaT, misurando l'effetto protettivo degli aptameri in presenza di Papillomavirus attraverso l'analisi della vitalità cellulare (Si veda Figura 1). Dalla Figura 1 si può osservare che la

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

somministrazione della libreria intera di aptameri (*full library*, seconda colonna) non preserva la vitalità delle cellule, che è paragonabile al valore riscontrato nel caso dell'infezione di Papillomavirus in assenza di aptameri (prima colonna). Tuttavia, l'aggiunta degli aptameri specifici per Papillomavirus consente di aumentare la vitalità cellulare (terza colonna), dimostrando un effetto protettivo.

Aptameri

Gli aptameri o miscela di aptameri in accordo con la presente descrizione possono comprendere aptameri a DNA lunghi da 15 a 100 nucleotidi stabili in fluidi corporei poiché modificati chimicamente e/o sottoposti a modifica nucleotidica, aventi sia la capacità di legare il capside del Papillomavirus che al contempo di inibire la sua entrata nelle cellule bersaglio con il risultato di limitare infettività virale.

In possibili forme di realizzazione, sono qui contemplate sia varianti in cui uno specifico aptamero riconosce un solo genotipo, e quindi specifico per un ceppo solo (ad esempio un aptamero per HPV16), sia varianti in cui sono previsti aptameri in multiplex per un gruppo di genotipi.

In forme di realizzazione può essere prevista una miscela di aptameri che è in grado di legare ed inibire l'infezione specificamente di uno o più Papillomavirus umani (HPV) del tipo 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73.

In una forma di realizzazione preferita la miscela di aptameri è in grado di legare ed inibire l'infezione specificamente di uno o più Papillomavirus umani (HPV) del tipo 6, 11, 40, 42, 43, e 44).

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

In una forma di realizzazione preferita la miscela di aptameri è in grado di legare ed inibire l'infezione specificamente di uno o più Papillomavirus umani (HPV) del tipo 27, 57, 2 ,4, 5, 1 ,65.

In una forma di realizzazione preferita la miscela di aptameri è in grado di legare ed inibire l'infezione specificamente di almeno uno dei Papillomavirus non umani quali: AaPV1 (EEPV), BgPV1, BPV1, BPV2,BPV3, BPV4, BPV5, BPV6, BPV7, BPV8, BPV9, BPV10, BPV11,BPV12, BPV13, CdPV1,CdPV2,ChPV1,CcaPV1, (RdPV1,CcPV1), OvPV1 (DPV), OaPV1 (OvPV1), OaPV2 (OvPV2), OaPV3,RtPV1 (RPV),SsPV1,Canis familiaris oral Papillomavirus, CPV2 (CfPV2), CPV3, CPV4, CPV5, CPV6, CPV7, CPV8, CPV9, CPV10, CPV11, CPV12, CPV13, CPV14, CPV15, CcrPV1, FcaPV1 (FdPV1), FcaPV2 (FdPV2), LrPV1, PlpPV1, PlPV1, PcPV1, UuPV1,UmPV1, ZcPV1, Delphinus delphis Papillomavirus 1, PphPV1, PphPV2, PphPV4, PsPV1, TtPV1, TtPV2, TtPV3, TtPV4, TtPV5, TtPV6, TtPV7, Miniopterus schreibersii Papillomavirus 1, MscPV1, TT20F, MrPV1,RaPV1,Bettongia penicillata Papillomavirus 1, Erinaceus europaeus Papillomavirus 1, Francolinus leucoscepus Papillomavirus 1, Oryctolagus cuniculus Papillomavirus 1, SfPV1 (CRPV, SPV), Fringilla coelebs Papillomavirus 1, Equus caballus Papillomavirus 1, EcPV2 (EqPV2), EcPV3, EcPV4, EcPV5, EcPV6, EcPV7, Colobus guereza Papillomavirus 1, CgPV2, MfPV1, MfPV2, MfPV3 (RhPV-d), MfPV4, MfPV5 (MfPV-a, MfPV6, MfPV7, MfPV8 (RhPV-a), MfPV9, MfPV10, MfPV11 (RhPV-b), MmPV1 (RhPV1), PpPV1 (PCPV), PtPV1 (CCPV), PhPV1, Psittacus erithacus Papillomavirus 1, Apodemus sylvaticus

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

Papillomavirus 1, EdPV1, MnPV1 (MrPV, MmPV), McPV2, MaPV1 (HaOPV), MmiPV1 (MmPV1), MmuPV1, PmPV1, RnPV1, RnPV2, Trichechus manatus latirostris Papillomavirus 1, TmPV2, Morelia spilota Papillomavirus 1, Caretta caretta Papillomavirus 1, CmPV1.

In una forma di realizzazione preferita la miscela di aptameri lega il capside di HPV2 e contemporaneamente inibisce la sua internalizzazione cellulare diminuendo il suo potere infettivo.

Ad esempio, in forme di realizzazione, combinabili con tutte le forme di realizzazione qui descritte, gli aptameri o miscela di aptameri comprendono almeno una delle seguenti sequenze di aptameri:
SEQ ID No.: 1, SEQ ID No.: 2, SEQ ID No.: 3, SEQ ID No.: 4, SEQ ID No.: 5, SEQ ID No.: 6, SEQ ID No.: 7, SEQ ID No.: 8, SEQ ID No.: 9, SEQ ID No.: 10, SEQ ID No.: 11, SEQ ID No.: 12, SEQ ID No.: 13, SEQ ID No.: 14, SEQ ID No.: 15, SEQ ID No.: 16, SEQ ID No.: 17, SEQ ID No.: 18, SEQ ID No.: 19, SEQ ID No.: 20, SEQ ID No.: 21, SEQ ID No.: 22, SEQ ID No.: 23, SEQ ID No.: 24, SEQ ID No.: 25, SEQ ID No.: 26, SEQ ID No.: 27, SEQ ID No.: 28, SEQ ID No.: 29, SEQ ID No.: 30, SEQ ID No.: 31, SEQ ID No.: 32, SEQ ID No.: 33, SEQ ID No.: 34, SEQ ID No.: 35, SEQ ID No.: 36, SEQ ID No.: 37, SEQ ID No.: 38, SEQ ID No.: 39, SEQ ID No.: 40, SEQ ID No.: 41, SEQ ID No.: 42, SEQ ID No.: 43, SEQ ID No.: 44, SEQ ID No.: 45, SEQ ID No.: 46, SEQ ID No.: 47, SEQ ID No.: 48, SEQ ID No.: 49, SEQ ID No.: 50, SEQ ID No.: 51, SEQ ID No.: 52, SEQ ID No.: 53, SEQ ID No.: 54, SEQ ID No.: 55, SEQ ID No.: 56, SEQ ID No.: 57, SEQ ID No.: 58, SEQ ID No.: 59, SEQ ID No.: 60, SEQ ID No.: 61,

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

SEQ ID No.: 62, SEQ ID No.: 63, SEQ ID No.: 64, SEQ ID No.: 65, SEQ ID No.: 66, SEQ ID No.: 67, SEQ ID No.: 68, SEQ ID No.: 69, SEQ ID No.: 70, SEQ ID No.: 71, SEQ ID No.: 72, SEQ ID No.: 73, SEQ ID No.: 74, SEQ ID No.: 75, SEQ ID No.: 76, SEQ ID No.: 77, SEQ ID No.: 78, SEQ ID No.: 79, SEQ ID No.: 80, SEQ ID No.: 81, SEQ ID No.: 82, SEQ ID No.: 83, SEQ ID No.: 84, SEQ ID No.: 85, SEQ ID No.: 86, SEQ ID No.: 87.

Le 87 sequenze suindicate sono state identificate dalla Richiedente come efficaci nella terapia, prevenzione e rilevamento, nonché per l'uso diagnostico, quantomeno di Papillomavirus umano HPV2.

Gli aptameri qui impiegati hanno una serie di caratteristiche che ne rendono vantaggioso l'utilizzo in associazione con le forme di realizzazione qui descritte:

- affinità alta, simile ad un anticorpo;
- alta stabilità, anche in ambienti aggressivi;
- ottime proprietà di stoccaggio;
- basso costo di produzione;
- alta specificità dovuta ai metodi di selezione;
- assenza quasi totale di immunogenicità;
- riproducibilità di specifiche (mentre invece gli anticorpi variano da batch a batch);
- vengono sintetizzati chimicamente in base alla sequenza; sintesi molto rapida;
- completamente ingegnerizzati in una provetta.

Gli aptameri possono anche essere modificati, tali modifiche ne

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

aumentano la diversità e rendono l'affinità ancora più alta (sub-nanomolare) ampliando la gamma di interazioni possibili (ad esempio idrofobiche) e quindi di ulteriori legami.

In forme di realizzazione, gli aptameri o miscela di aptameri possono quindi essere modificati. Nello specifico possono essere incluse le seguenti modifiche degli aptameri:

- collegamento internucleotide terminale (3'-3 'e 5'-5'). Tali modifiche possono aumentare la stabilità e la resistenza degli aptameri alle 3'-esonucleasi presenti nel siero umano;
- biotinilazione al 3' (3'-biotina). In alcuni casi tale modifica potrebbe diminuire l'efficacia delle 3'-esonucleasi e quindi inibire la degradazione dell'aptamero modificato;
- modifiche al gruppo ribosio. Le modifiche agli zuccheri presenti nella struttura del DNA come l'aggiunta di 2'-fluoro (2'-F) o 2'-ammino (2'-NH2) sui residui pirimidinici o 2 ' -O-metil (2'-OMe) aumentano la resistenza alle nucleasi;
- LNA, UNA, 2'-F. Gli acidi nucleici del tipo "locked" (Locked Nucleic Acid) costituiscono un analogo dell'acido ribonucleico che presenta un legame metilenico tra 2'-O e il 4'-C di l'anello di zucchero. Questa modifica conferisce una grande resistenza alle nucleasi e una maggiore termostabilità. L'acido nucleico *unlocked* (UNA) in cui è presente un ulteriore legame tra gli atomi C2 e C3 dell'anello di zucchero è più flessibile rispetto all'LNA. Di conseguenza, la modifica dell'acido 2'-desossi-2'-fluoro-d-arabinonucleico (2'-F ANA) risulta molto adatta per migliorare le proprietà biologiche e fisico-chimiche dei quartetti G del

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

DNA;

- modifiche ai link fosfodiesterici (Metilfosfonato e fosforotioato). Il collegamento del fosfodiestere sostituito con l'analogo metilfosfonato o fosforotioato è comunemente usato per la modifica degli aptameri. Studi termodinamici hanno rivelato che la perdita della carica negativa del fosfato, come nel caso dell'analogo del metilfosfonato, ha destabilizzato la struttura G-quadruplex. La completa sostituzione con oligonucleotidi tiofosforilati deve essere limitata a livello sistemico (qualora si utilizzino tali molecole in applicazioni terapeutiche) perché hanno alte tossicità (si preferiscono sostituzioni parziali). Questa modifica tuttavia consente un'elevata resistenza del DNA alla degradazione da parte delle nucleasi presenti nel siero sanguigno o altri fluidi corporei. I legami fosforotossici (PS2) sono stati impiegati per stabilizzare la struttura del DNA. Inoltre, è stato riportato che le sostituzioni di PS2 hanno notevolmente migliorato l'affinità del legame target di circa 1000 volte;

- triazolo. La sostituzione del legame del fosfodiestere oligonucleotidico con composti a base di triazolo è particolarmente promettente. Gli analoghi dell'oligonucleotide legato al triazolo internucleoside hanno una maggiore resistenza alle DNAsi. Questa modifica può inoltre influenzare fortemente le proprietà di legame dell'aptamero;

- l-DNA. La transizione dalla forma del DNA naturale (D-DNA) all'immagine speculare conduce ad una forma chirale di DNA che può mostrare un'elevata resistenza alla degradazione da parte delle nucleasi e mantenere l'affinità con gli obiettivi;

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

- 5'- Aggiunta di colesterolo. Gli aptameri sono soggetti a rapida escrezione attraverso la clearance renale principalmente attraverso la filtrazione glomerulare. Il colesterolo è in grado di prolungare l'emivita degli aptameri nel flusso sanguigno;
- Polyethylene glycol (PEG) linkage. Tale modifica aumenta la stabilità nel siero da un giorno fino ad alcune settimane;

In forme di realizzazione preferite gli aptameri o miscela di aptameri possono essere modificati con una o più delle seguenti modifiche: inversioni internucleotidiche 3'-3 'e 5'-5' del DNA, biotinilazione al 3' del DNA, modifiche al gruppo ribosio, 2'-fluoro (2'-F) e/o 2'-ammino (2'-NH2) sui residui pirimidinici, 2 '-O-metil (2'-OMe), Locked Nucleic Acid, Unlocked Nucleic Acid, acido 2'-desossi-2'-fluoro-d-arabinonucleico (2'-F ANA), modifiche ai link fosfodiesterici (Metilfosfonato, fosforotioato, oligonucleotidi tiofosforilati), modifica con triazolo, DNA speculare chirale (I-DNA), aggiunta di colesterolo al 5' del DNA, Polyethylene glycol (PEG) linkage.

Tecnica di selezione aptameri

La Richiedente ha sviluppato un metodo per la selezione degli aptameri in accordo con la presente descrizione, di seguito descritto in dettaglio utilizzando la Figura 2. La seguente descrizione fa riferimento esemplificativamente ad aptameri di DNA, tuttavia è applicabile in modo opportuno anche ad altre tipologie di aptameri come qui descritte. La Figura 2 viene utilizzata per descrivere forme di realizzazione utilizzata per selezionare aptameri con le seguenti caratteristiche:

- alta affinità per pseudovirioni di Papillomavirus;

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

- in grado di limitare l'infezione virale;
- stabili in condizioni simili a quelle fisiologiche;
- stabili seppur contenuti in prodotti per l'applicazione topica su pelle o mucose, ad esempio creme, gel, e lozioni a base di oli minerali, sintetici e vegetali.

Inizialmente, la tecnica SELEX applicata ha permesso, dopo 9 cicli, di selezionare aptameri, ad esempio di DNA, aventi un'elevata affinità per gli pseudovirioni del Papillomavirus. Usare gli pseudovirioni nel processo di selezione è stato un passo importante al fine di ottenere una miscela di aptameri che potesse efficacemente inibire l'infezione virale. L'utilizzo di pseudovirioni implica un enorme vantaggio rispetto ad una selezione operata mediante singole proteine virali denaturate prodotte in sistemi procariotici.

La selezione di aptameri contro l'intero capside virale (pseudovirioni) permette di arricchire la selezione con aptameri che riconoscono il capside virale nei suoi elementi conformazionali, e/o con modifiche post-traduzionali, ed anche nei punti di giunzione tra capsomeri. Ad esempio, ciò non sarebbe stato possibile se fossero state utilizzate singolarmente le proteine virali capsidiche L1 e L2 come parametro di selezione nella tecnica SELEX.

Gli pseudovirioni, seppur di difficile produzione, mimano più fedelmente il comportamento del capside del Papillomavirus in vivo. Per questo motivo sono stati utilizzati gli pseudovirioni come bersaglio della SELEX, in quanto la selezione di aptameri contro gli pseudovirioni permette di ottenere aptameri più efficaci e con maggiore azione

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

protettiva in vivo.

Una volta ottenuti gli aptameri essi vengono clonati e sequenziati. Esperimenti condotti dalla Richiedente sia con miscele di essi che in singolo vengono fatti al fine di saggiare la loro azione protettiva nei confronti dell'infezione del Papillomavirus: gli aptameri sono disciolti in un terreno di coltura e somministrati alle cellule, in seguito le cellule vengono infettate con il Papillomavirus.

Il terreno utilizzato per la coltura cellulare mima parzialmente le condizioni fisiologiche, l'azione degli aptameri è testata a 37 °C, temperatura fisiologica.

A 24 ore dall'infezione virale, vengono eseguiti dei test di vitalità cellulare per identificare gli aptameri o le miscele di aptameri che hanno avuto un effetto protettivo sulle cellule in termini di vitalità cellulare tramite il saggio ATPlite.

Gli aptameri selezionati potranno subire, vantaggiosamente, diverse modifiche chimiche e/o nucleotidiche al fine di essere ancora più stabili ed efficaci se contenuti all'interno di prodotti per l'applicazione topica sulla pelle o mucose, ad esempio creme, oli e gel; tali modifiche sono oggetto di ulteriori saggi funzionali e quindi di selezioni successive operate direttamente su cellule in vitro (Figura 2).

Materiali e metodi

Reagenti chimici usati

I reagenti chimici utilizzati per realizzare tutto il processo di selezione e costruzione di aptameri anti-Papillomavirus sono stati comprati da Thermo Fisher Scientific, Sigma-Aldrich, Euroclone, Invitrogen, and

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

Qiagen.

Soluzioni base:

- 1x PBS: 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na_2HPO_4, 1.8 mM KH_2PO_4 in dH2O, pH 7.4;
- TE: 0.1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8.0 in dH2O;
- 10x TBE (tris-borate EDTA) buffer: 89 mM Tris, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA in dH2O, pH 7.5.

Preparazione di Pseudovirioni

Tutte le operazioni relative alla manipolazione di pseudovirioni di Papillomavirus devono esser eseguite utilizzando una cappa biologica (classe II).

Trasfezione del DNA per la produzione di Pseudovirioni

La trasfezione del DNA per la produzione degli pseudovirioni è effettuata in cellule HEK 293TT (Human Embryonic Kidney). Le cellule HEK 293TT sono piastrate in piastre di Petri da 10 cm x 10 cm contenenti terreno DMEM con l'aggiunta di siero fetale bovino al 10% e 1% di penicillina/streptomicina. Le piastre sono quindi depositate in un incubatore umidificato che mantiene una temperatura controllata di 37° C (5% di CO_2). Quando le cellule raggiungono circa il 70% di confluenza, viene effettuata la trasfezione del DNA plasmidico mediante calcio-fosfato. Per ciascuna piastra di cellule, 2,5 µg di plasmide codificante per le proteine L1 e L2 e 12,5 µg plasmide codificante per un gene reporter (luciferasi), vengono miscelati in una provetta contenente 22 µL di 2,5 M CaCl2 e 200 µL di TE. La soluzione è trasferita goccia per goccia in una provetta contenente 200 µL di HBS 2x (50 mM Hepes

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

pH 7,0, 28 mM NaCl, 1,5 mM Na2HPO4, pH 7,12). Dopo 20 minuti, ad ogni piastra contenente terreno e cellule vengono aggiunti 420 µl della soluzione di trasfezione. Le piastre sono poi riposte in un incubatore a 37 °C per 48 ore.

Maturazione degli pseudovirioni

Il terreno di coltura viene rimosso dalle piastre di crescita cellulare e le cellule sono trattate con 1 mL di tripsina / EDTA. Il lavaggio con tripsina è quindi rimosso e sostituito con 2 mL di tripsina fresca / EDTA. Le piastre sono quindi incubate con tripsina per almeno 5 minuti e le cellule sono quindi essere raccolte in una provetta da 50 mL, contenente 20 mL di PBS. La provetta a questo punto deve essere delicatamente centrifugata a 850xg per 5 minuti e ciò crea un pellet di sedimentazione cellulare; il pellet va quindi risospeso in 1 mL di PBS. Dopo la rimozione del surnatante avviene l'aggiunta di PBS + 9,5 mM MgCl2, e di una soluzione al 10% di Triton-X, 0,3% ed e 0,4% rispettivamente di benzonasi e di endonucleasi V (RecBCD). Sia la benzonasi che l'endonucleasi sono risultati utili per eliminare qualsiasi DNA genomico residuo, migliorando la purezza della preparazione. La soluzione deve quindi esser miscelata ed incubata in un termoblocco a 37 ° C per 24 ore, con miscelazione occasionale.

Purificazione degli Pseudovirioni da cellule HEK293TT

Dopo la fase di maturazione degli pseudovirioni, il lisato cellulare deve esser raffreddato in ghiaccio per 10 minuti. 0,17 volumi di PBS + 5 M NaCl sono quindi miscelati con il lisato, seguiti da 3 cicli di congelamento e scongelamento mediante l'uso di ghiaccio secco ed un

Il Mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

blocco termico riscaldato a 37 ° C. Il lisato cellulare è quindi centrifugato a 54000xg a 4 ° C per 5 minuti ed il surnatante deve esser conservato. Il pellet viene lavato 2 volte mediante 800 µL di HSB (25 mM HEPES pH 7,5, 500 mM NaCl, 1 mM MgCl2, 100 µM EDTA, 0,5% etanolo). Tutti i surnatanti devono esser recuperati e conservati. Nel frattempo, 4,5 mL di miscela "A" CsCl (preparata sciogliendo 54 g di CsCl in 200 mL di PBS) devono esser dispensati in una provetta per ultracentrifuga. Inoltre devono esser dispensati 4,5 mL di miscela "B" CsCl (preparata sciogliendo 77,7 g di CsCl in 200 mL di PBS). HSB deve esser aggiunto alla fine per riempire il tubo da ultracentrifuga. La provetta è quindi centrifugata a 20000xg a 4 ° C per 16 ore.

Gli pseudovirioni saranno raccolti utilizzando un ago 18G e una siringa da 2 ml, attraverso un lato del tubo. Successivamente, devono essere distribuiti in una unità filtrante e centrifugati alla massima velocità per 10 minuti. Dopo due lavaggi con HSB, gli pseudovirioni vengono risospesi in 50 µL di HSB ed aliquotati.

Saggio funzionale di infettività virale:

Colture Cellulari

Le HaCaT (CLS Cell Lines Service, 300493) è una linea cellulare di cheratinociti immortali aneuploidi trasformata spontaneamente, queste cellule rappresentano uno dei migliori modelli al mondo per studiare l'infettività del Papillomavirus umano.

Le cellule devono esser conservate a -80 ° C. Il terreno di coltura cellulare è DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) con 4,5 g / L di glucosio e 3,7 g / L di NaHCO3, senza L-glutammina e sodio piruvato

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

(PAN-Biotech). Il terreno è completato con il 10% di siero fetale bovino (FBS) e l'1% di penicillina/streptomicina.

Test di Vitalità cellulare

Il kit di analisi ATPlite 1step (PerkinElmer) è utilizzato per la valutazione quantitativa dell'effetto protettivo degli aptameri sull'infezione virale. Il saggio è eseguito secondo le istruzioni del produttore. In breve, diverse concentrazioni di cellule per pozzetto sono seminate in una piastra con 96 pozzetti. Le cellule devono esser incubate con miscele di aptameri. A diversi tempi dal trattamento con aptameri le cellule devono esser infettate con gli pseudovirioni per 48 ore. Dopo la lisi cellulare, seguendo le istruzioni del produttore, il saggio termina con un segnale di luminescenza rappresentativo della vitalità cellulare, il quale rilevato mediante lettore di micropiastre a rilevazione multipla. La Richiedente ha usato il modello EnVision 2104 (PerkinElmer).

SELEX

Il punto di partenza della SELEX è una libreria di strutture secondarie di acidi nucleici, che nel caso di specie è una libreria di DNA composta da sequenze contenenti una regione aptamero di 60 nucleotidi. Sono utilizzate due librerie identiche di DNA a filamento singolo (ssDNA). Le sequenze di riconoscimento per l'amplificazione delle due librerie sono perfettamente identiche (5'-AGACCACAACGGTTTCCC- (N50) - TAGCATAACCCCTTG-3'). L'obiettivo principale della SELEX è identificare un piccolo sottoinsieme di aptameri che legano con alta affinità le particelle di pseudovirioni di Papillomavirus.

Selezione positiva e negativa in vitro

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

Per la selezione positiva, si utilizzano le sfere Heparin-Agarose (Sigma Aldrich), poiché l'eparan-solfato di superficie cellulare è necessario per l'infezione di Papillomavirus in quanto rappresenta un recettore fondamentale per l'adesione cellulare del virus. 60 µl di eparina-agarosio devono essere centrifugati a 500xg per 1 minuto. Il surnatante è quindi rimosso e 50 µL di HSB + 2 µg di pseudovirioni di Papillomavirus devono esser aggiunti. Il tubo deve esser incubato su un Mini LabRoller ™ (Labnet) a 4 ° C per tutta la notte. 12 ore dopo, 2 nmol di libreria di aptameri (20 µL della soluzione madre da 100 µM) deveono esser aggiunti ad 1 mL di tampone di selezione (5 mM MgCl2, 10 mM KCl, 0,01% (v / v) Tween-20, 1x PBS).

Sfere di agarosio per la selezione negativa : 60 µl di eparina-agarosio devono esser centrifugati a 500xg per 1 minuto. Il surnatante deve esser quindi rimosso e le sfere lavate per tre volte con 500 µl di tampone di selezione seguito da centrifugazione a 500xg per 1 minuto. Infine, 150 µL di tampone di legame (tampone di selezione integrato con 2 µg / mL di tRNA di lievito (Invitrogen) e 125 µg / mL di albumina di siero bovino (BSA; Millipore)) e la libreria deve aggiunta alle sfere di agarosio. La provetta deve esser incubata su un Mini LabRoller™ a 37 °C per 15 minuti.

Le sfere di agarosio devono esser quindi centrifugate a 500xg per 1 minuto. Il surnatante viene recuperato e trasferito nella provetta contenente l'agarosio legato con gli pseudovirioni, che deve esser preparato centrifugando la provetta a 500xg per 1 minuto, rimuovendo il surnatante ed aggiungendo 600 µL di tampone di legame. Il campione è

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

quindi incubato su un Mini LabRoller ™ a 37 ° C per 15 minuti. Le sfere utilizzare per la selezione sono centrifugate a 500xg per 1 minuto e il surnatante, che conteneva DNA non legato, deve esser rimosso. Il pellet è trasferito in una nuova provetta per eliminare le sequenze che potrebbero essere state legate alle pareti del tubo. È quindi eseguito un lavaggio con 1 ml di tampone di selezione ed effettuata un centrifugata a 500xg per 1 minuto. Questo passaggio deve esser ripetuto per tre volte. 200 µl di tampone di eluizione (tampone di selezione integrato con 500 mM di imidazolo, pH 7,0) devono esser aggiunti al pellet e la libreria è eluita insieme agli pseudovirioni incubando la provetta su un Mini LabRoller ™ a temperatura ambiente per 10 minuti. Le sfere di agarosio sono quindi pellettate per centrifugazione, il surnatante è quindi recuperato e trasferito in un'altra provetta.
Il DNA deve esser precipitato con 750 µL di etanolo assoluto e centrifugato a 21000xg a 4 ° C per 40 minuti. Il pellet di DNA è quindi essiccato e risospeso in 20 µL di acqua.

Uso di Sonde ribosilate in PCR

La PCR è eseguita utilizzando la DNA polimerasi Phire Hot Start II (Thermo Fisher Scientific), seguendo le istruzioni del produttore. Il volume di reazione finale della PCR è 20 µL. Inizialmente deve esser preparata una miscela, che comprende 4 µL di tampone di reazione 5x, 0,4 µl di dnTP 10 mM (Thermo Fisher Scientific), 0,4 µl di polimero del DNA Hot Start II di fosforo, 0,25 µl di acido nucleico fluorescente SYTO ™ 9 da 160 µM Macchia (Thermo Fisher Scientific), 1 µL di sonda 10 µM in FW (5'-AGACCACAACGGTTTCCC-3 '), 1 µL di

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

sonda 10 µM REV (5'-CAAGGGGTTATGCTrA-3') e 10,95 µL di acqua. La libreria di aptameri è quindi diluita in tampone TE per ottenere campioni contenenti 100 ng / µL, 50 ng / µL e 25 ng / µL di DNA. 2 µL di ciascun campione in duplicato vengono dispensati in ciascun pozzetto. Il protocollo PCR da utilizzato è: 98 ° C per 30 secondi (denaturazione iniziale), 98 ° C per 5 secondi (denaturazione), un intervallo di temperature tra 50 ° C e 55 ° C per 30 secondi e 72 ° C per 5 secondi per 40 cicli e 72 ° C alla fine per 1 minuto (estensione finale).

Nel processo SELEX, per l'amplificazione PCR si utilizza la Platinum ™ Green Hot Start PCR 2x Master Mix (Invitrogen), seguendo le istruzioni del produttore. La PCR è eseguita in un volume finale di 100 µL, che comprende 50 µL di Master Mix Start Hot Green PCR 2x Platinum ™, 2 µL di primer 10 µM in avanti (5'-AGACCACAACGGTTCCC-3 '), 2 µL di 10 µM primer reverse (5'-CAAGGGGTTATGCTrA-3 '), 13 µL di acqua e 20 µL del campione ottenuto dopo la selezione positiva e negativa in vitro (sottotitolo 3.7.1 Selezione positiva e negativa in vitro). Il protocollo di ciclizzazione termica è: 94 ° C per 2 minuti (denaturazione iniziale), 94 ° C per 30 secondi (denaturazione), 52 ° C per 30 secondi (appaiamento delle sonde) e 72 ° C per 5 secondi (estensione), il tutto per 30 cicli.

Uso di sonde biotinilate

Le sonde biotinilate permettono di attaccare il filamento complementare all'aptamero alle sfere di Streptavidin-Agarose e di eluire solo quello aptamericico usando NaOH.

Separazione di DNA a doppio filamento e recupero del DNA a singolo

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

filamento

Alla fine di ciascun ciclo SELEX, il DNA a doppio filamento (dsDNA) trattato in maniera tale da recuperare l'aptamero a singolo filamento. Inizialmente, il dsDNA viene trattato con NaOH, caricato in un gel denaturante (PAGE) contenente urea al 10%. La banda corrispondente al ssDNA di interesse deve esser recuperata. A causa della bassa resa di ssDNA ottenuto con questa procedura, si utilizza il reagente Streptavidin-Agarose e il ssDNA deve esser eluito mediante l'utilizzo di NaOH.

Gel denaturante ed estrazione di ssDNA

I prodotti di PCR ottenuti utilizzando il primer ribosilato sono precipitati con 250 µL di etanolo assoluto freddo mediante centrifugazione della soluzione a 21000xg a 4 ° C per 30 minuti. Il supernatante è rimosso ed il pellet ottenuto è essiccato e risospeso in 90 µL di NaOH 0,25 N. Il campione è riscaldato in un blocco riscaldante a 92 ° C per 10 minuti (questo permette il distacco della base ribosilata). Dopo il riscaldamento, 10 µL di acetato di sodio 3 M sono aggiunti alla provetta e il DNA è stato precipitato con 250 µL di etanolo assoluto freddo mediante centrifugazione a 21000xg a 4 ° C per 30 minuti. Il supernatante è rimosso e il pellet di DNA è quindi asciugato.

Il pellet di DNA deve esser risospeso in 20 µL di soluzione di caricamento colorata (per 40 ml di soluzione: 4 g di saccarosio, 5 mg di bromofenolo blu, 5 mg di xilenocianolo FF, 200 µL di sodio dodecil solfato al 10%, 5 ml di 10x TBE , 22 g di urea, H2O) ed è riscaldato per 2 minuti a 92 ° C.

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

Nel frattempo deve esser preparato un gel PAGE denaturato al 10% (8 M di urea). Per 1 soluzione di 1 litro, sono miscelati 420,43 g di urea, 100 mL di 10x TBE e 250 mL di 40% 29: 1 acrilammide / bis-acrilammide. 35 mL di questa miscela sono uniti a 350 µL di APS (persolfato di ammonio) e 35 µL di TEMED (tetrametiletilendiammina). Il gel viene corso inizialmente a 40 mA per 20 minuti mediante cella elettroforetica. Il volume della banda del gel è stimato e 2 volumi di tampone di eluizione devono esser aggiunti. Il campione è incubato su un Mini LabRoller ™ a 37 ° C per 12 ore. La soluzione deve esser centrifugata alla massima velocità a 4 ° C per 1 minuto per precipitare l'acrilammide e il supernatante è recuperato in una nuova provetta. La centrifugazione e il recupero devono esser ripetuti dopo l'aggiunta di 0,5 volumi di tampone di eluizione all'acrilammide precipitata. Al campione vengono aggiunti 2,5 volumi di etanolo assoluto freddo e 0,3 M di acetato di sodio. Il campione viene quindi riposto a -20 ° C per 20 minuti e è centrifugato alla massima velocità a 4 ° C per 20 minuti. L'etanolo assoluto viene sostituito con 100 µl di etanolo al 70%, la provetta è quindi centrifugata alla velocità massima a 4 ° C per 10 minuti. Il supernatante viene rimosso, il pellet è essiccato e risospeso con 20 µL di H2O.

Uso della Streptavidina-Agarosio ed eluizione di ssDNA mediante NaOH

I prodotti PCR ottenuti utilizzando il primer biotinilato sono purificati mediante il kit di rimozione dei nucleotidi QIAquick del kit di estrazione del gel QIAquick (QIAGEN). In breve, 1 ml di tampone PN (40% (v / v) 5 M di cloruro di guanidinio, 60% (v / v) di isopropanolo) sono aggiunti

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

a 100 µL di miscela PCR. Il campione viene caricato nella colonna QIAquick e centrifugato a 8950xg per 1 minuto. Il volume centrifugato viene scartato e la centrifugazione viene ripetuta dopo l'aggiunta di 750 µL di tampone PE (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 80% etanolo). Dopo aver scartato il volume centrifugato, la provetta è centrifugata a 17900xg per 1 minuto al fine di eliminare ogni residuo di etanolo. La colonna QIAquick è quindi posizionata in un tubo pulito da 1,5 ml. Per eluire il DNA, 35 µl di H2O, che devono esser preriscaldato a 50 ° C e successivamente devono esser aggiunti alla colonna QIAquick. La colonna vine quindi centrifugata a 17900xg per 1 minuto e 2 µL di DNA sono eluiti. 70 µl di Streptavidin-Agarose (Sigma Aldrich) devono esser centrifugati a 500xg per 1 minuto. Il surnatante è rimosso e vengono effettuati due lavaggi con 70 µl di 1x PBS. I prodotti di PCR purificati sono dispensati alle sfere di agarosio ed incubati su un Mini LabRoller ™ a temperatura ambiente per 1 ora. Il tubo deve esser centrifugato a 500xg per 1 minuto, il surnatante viene quindi rimosso ed il pellet è lavato due volte con 70 µL di 1x PBS. Le sfere di agarosio sono incubate con 50 µL di NaOH 20 mM su un Mini LabRoller ™ per 10 minuti al fine di denaturare il DNA. La provetta viene quindi centrifugata a 500xg per 1 minuto e il surnatante viene successivamente recuperato. Il pH della soluzione è stato portato a circa 7,5. La qualità e la quantità di ssDNA eluito sono state valutate da NanoDrop ™ 1000.

Clonaggio del DNA a singolo filamento

Per il sequenziamento si utilizza TOPO® TA Cloning® Kit (Invitrogen) seguendo le indicazioni fornite dal produttore. I clonaggi

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

sono stati effettuati usando piastre LB Amp e batteri XL1-Blue competenti.

Produzione di prodotti PCR

La PCR è eseguita su 50 ng di ssDNA ottenuti al 9° ciclo del processo di selezione SELEX. La reazione di avviene in un volume di 50 µL. La reazione di PCR contiene: 1 µL di GoTaq® DNA Polymerase, 10 µL di 5x ColorTable GoTaq® Buffer, 1 µL di 10 µM primer in avanti (5'-AGACCACAACGGTTCCC-3 '), 1 µL di 10 µM primer reverse (5'-CAAGGGGTTATGCTA-3 '), 0,5 µL di 50 mM dNTPs, 19,5 µL di acqua e 22 µL di campione. Protocollo PCR: 95 ° C per 2 minuti (denaturazione iniziale), 95 ° C per 30 secondi (denaturazione), 52 ° C per 40 secondi (appaiamento delle sonde) e 72 ° C per 5 secondi (estensione) per 35 cicli e 72 ° C per 3 minuti (estensione finale). I prodotti ottenuti dalla PCR sono quindi purificati utilizzando il kit QIAquick PCR Purification del kit QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) seguendo le istruzioni del produttore. Il successo della reazione deve esser verificato mediante elettroforesi su un gel di agarosio al 2%.

Selezione per modifica chimica

Gli aptameri e le miscele di aptameri che hanno dimostrato nei saggi di vitalità cellulare esser efficaci contro l'infezione di Papillomavirus vengono ulteriormente sottoposti a modifiche chimiche per migliorare sia la loro stabilità che l'effetto protettivo antivirale. Per la biotinilazione si utilizza il kit Thermo Scientific™ *Kit* di *biotinilazione* Pierce™.

Gli aptameri selezionati vengono sintetizzati e modificati da ditte

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

esterne come IDT *Integrated DNA Technologies,* ed IBA *Lifesciences*. Tali aptameri vengono incubati nel terreno cellulare contenente cellule HaCaT secondo i protocolli precedentemente indicati al fine di testare se la modifica chimica apportata producesse un miglioramento sull'effetto protettivo nei confronti dell'infezione virale. Gli aptameri modificati vengono testati in singolo ed accoppiati a concentrazioni crescenti di sostanze normalmente presenti in creme ed oli quali: parabeni, siliconi, petrolati, oli minerali, oli naturali, detergenti, tensioattivi, conservanti.

Trattamento terapeutico e/o prevenzione

In accordo con forme di realizzazione, gli aptameri o miscela di aptameri in accordo con la presente descrizione possono essere contenuti, compresi o formulati in prodotti per applicazione od uso topico su pelle o mucose.

In una forma di realizzazione la miscela di aptameri descritta può essere una componente essenziale di un olio per la pelle.

In una forma di realizzazione la miscela di aptameri descritta può essere una componente essenziale di una lozione da applicare sulle mucose corporee.

In una forma di realizzazione la miscela di aptameri descritta può essere una componente essenziale di un crema vaginale.

In una forma di realizzazione la miscela di aptameri descritta può essere una componente essenziale di un crema del pene.

In una forma di realizzazione la miscela di aptameri descritta può essere una componente essenziale di un crema anale.

In una forma di realizzazione la miscela di aptameri descritta può

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

essere una componente essenziale di un preparato applicabile al cavo orale.

In una forma di realizzazione la miscela di aptameri descritta può essere una componente essenziale di un contracettivo meccanico.

In una forma di realizzazione la miscela di aptameri descritta può essere una componente essenziale di un vettore virale e non virale per la trasfezione e transduzione di acidi nucleici.

Diagnostica

In una forma di realizzazione la miscela di aptameri può legare il capside del Papillomavirus umano e legare un fluoroforo o un enzima al fine di poter monitorare con tecniche diagnostiche la presenza del Papillomavirus umano.

In una forma di realizzazione la miscela di aptameri può legare il capside del Papillomavirus umano e fungere da anticorpo primario in tecniche immunochimiche come ad esempio ELISA o Western Blot o immunofluorescenza.

In una forma di realizzazione la miscela di aptameri può legare il capside del Papillomavirus umano e legarsi ad un nanointerruttore per la rilevazione di analiti proteici. Possibili forme di realizzazione utilizzabili in associazione con il metodo di diagnosi secondo la presente descrizione sono descritte nelle domande internazionali PCT/EP2017/067904 e PCT/IT2017/000233 a nome della Richiedente e qui incorporata interamente come riferimento.

In forme di realizzazione la miscela di aptameri può legare il capside del Papillomavirus umano ed essere utilizzato in tecniche

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

biosensoristiche che comprendono misure in amperometria, impedenza, voltammetria, capacità, elettrochemiluminescenza, chemiluminescenza. Possibili forme di realizzazione utilizzabili in associazione con il metodo di diagnosi secondo la presente descrizione sono descritte nella domanda internazionale WO2015/114506 a nome della Richiedente e qui incorporata interamente come riferimento.

Le forme di realizzazione qui descritte si riferiscono all'uso di aptameri o una miscela di aptameri a DNA selezionati esclusivamente per legare specificamente l'intero capside del Papillomavirus, legame che si verifica tra aptamero ed epitopi proteici lineari, conformazionali, epitopi con modifiche post-traduzionali ed epitopi derivanti dai punti di giunzione tra i capsomeri virali.

Forme di realizzazione qui descritte si riferiscono anche l'uso di tali specifici aptameri come agenti in grado di legarsi al capside del Papillomavirus limitandone l'infettività attraverso un meccanismo di inibizione dell'entrata del virus nelle cellule e/o di inibizione del traffico endocellulare del virus.

Tali aptameri, secondo le forme di realizzazione qui descritte, possono esser usati in creme, unguenti, gels, contracettivi meccanici e lozioni corporee applicabili su pelle e mucose, o lozioni e soluzioni per il cavo orale, al fine di limitare, contrastare e trattare l'infezione da Papillomavirus.

Al tempo stesso nella presente descrizione si prevedono anche forme di realizzazione riferite all'uso diagnostico di tali aptameri in quanto oltre al legame con il capside virale essi possono esser direttamente o

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

indirettamente legati a marcatori, ad esempio reporter fluorescenti o enzimi, la cui attività può essere monitorata al fine di rilevare la presenza del virus in fluidi corporei.

Ulteriori forme di realizzazione si riferiscono ad un metodo di selezione di aptameri per la terapia, prevenzione e diagnosi del Papillomavirus aventi specifiche caratteristiche che soddisfano, oltre al requisito del legame all'intero capside virale, contemporaneamente anche le seguenti condizioni:

i) legame con il capside ad alta affinità definito mediante tecnica SELEX;

ii) legame con potere inibitorio definito (saggio funzionale);

iii) stabilità in fluidi corporei e/o iv) stabilità in prodotti per applicazione od uso topico su pelle o mucose, ad esempio, creme, gel ed oli;

Gli aspetti iii) e iv) possono essere entrambi presenti o alternativi, ad esempio a seconda che gli aptameri siano previsti per uso diagnostico in un campione biologico (aspetto iii), oppure per uso nell'applicazione topica su pelle e/o mucose (aspetto iv).

Il metodo di selezione sviluppato dalla Richiedente prevede la selezione di aptameri in grado di legare con alta affinità gli pseudovirioni di Papillomavirus i quali:

1) contengono sia L1 che L2 e sono le entità biologiche attive più simili ai Papillomavirus; al contrario le *Virus Like Particles* (VLPs) contengono solo L1: il metodo in accordo con la presente descrizione permettono la selezione di aptameri che riconoscono anche L2;

2) gli pseudovirioni sono stati prodotti in cellule eucariotiche, quindi

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

contengono schemi di modifiche proteiche post-traduzionali simili a quelle dei Papillomavirus presenti in natura: ciò permette la selezione di aptameri che riconoscono epitopi con modifiche post-traduzionali precedentemente elencate;

3) gli pseudovirioni non sono singole proteine inerti, ma sono entità biologicamente attive sotto il profilo dell'infettività: ciò permette la selezione di aptameri che riconoscono siti importanti per l'infettività virale;

4) gli pseudovirioni hanno una conformazione, che rispetto alle proteine denaturate, permette di selezionare aptameri aventi affinità per epitopi conformazionali, i quali sono presenti nel virus naturale: ciò permette la selezione di aptameri che riconoscono siti conformazionali del capside virale.

Inoltre, va notato che il metodo di selezione in accordo con la presente descrizione non è basato solo sull'affinità aptamero-antigene, ma sulla capacità di tale aptamero di inibire l'entrata virale nella cellula e quindi limitare l'infettività virale. Ciò è vantaggioso perché consente di utilizzare gli aptameri anche in un saggio funzionale.

Come sopra descritto, tale metodo di selezione funzionale viene operato in un mezzo a pH fisiologico, un terreno con caratteristiche affini ai fluidi biologici (terreno di coltura cellulare), a temperatura controllata di 37°C, quindi temperatura fisiologica.

Inoltre, è possibile affinare la selezione, poiché gli aptameri candidati migliori vengono ulteriormente selezionati in base alla modifica chimica e/o ad una possibile modifica nucleotidica più idonea che consente

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

all'aptamero di essere stabile ed efficace nel limitare l'infezione del Papillomavirus anche in prodotti per l'applicazione topica sulla pelle o mucose, come creme, oli e gel.

È chiaro che all'uso di aptameri per la terapia, prevenzione, diagnosi e rilevamento del Papillomavirus fin qui descritti possono essere apportate modifiche e/o aggiunte di parti e/o fasi, senza per questo uscire dall'ambito del presente trovato come definito dalle rivendicazioni.

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

RIVENDICAZIONI

1. Aptameri per l'uso nella terapia e/o prevenzione del Papillomavirus, detti aptameri essendo configurati per legare specificamente con alta affinità epitopi conformazionali e con modifiche post-traduzionali appartenenti all'intero capside del Papillomavirus.

2. Aptameri in accordo con la rivendicazione 1, in cui detti aptameri sono configurati, inoltre, per legare detti epitopi per limitare l'infettività del Papillomavirus attraverso un meccanismo di inibizione dell'entrata del Papillomavirus nelle cellule e di inibizione del traffico endocellulare del Papillomavirus.

3. Aptameri in accordo con la rivendicazione 1 o 2, in cui detti aptameri sono configurati con lunghezza da 15 a 100 nucleotidi.

4. Aptameri in accordo con la rivendicazione 3, in cui detti aptameri sono, inoltre, configurati stabili in fluidi corporei e/o in prodotti per l'applicazione topica su pelle o mucose.

5. Aptameri in accordo con la rivendicazione 4, in cui detti aptameri sono configurati per avere specifiche caratteristiche che soddisfano, oltre al requisito del riconoscimento di epitopi propri solamente dell'intero capside virale, contemporaneamente anche le seguenti condizioni:

i) legame con detti epitopi ad alta affinità definito mediante tecnica SELEX;

ii) legame con detti epitopi, avente funzione inibitoria definita (saggio funzionale);

iii) stabilità in fluidi corporei e/o iv) stabilità in prodotti per applicazione od uso topico su pelle o mucose, ad esempio, creme, gel ed oli;

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

in cui le condizioni iii) e iv) possono essere entrambe soddisfatte oppure alternative, a seconda che detti aptameri siano previsti rispettivamente per uso diagnostico in un campione biologico oppure per uso nell'applicazione topica su pelle e/o mucose.

6. Aptameri in accordo con una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 5, in cui detti aptameri sono modificati con una o più delle seguenti modifiche: inversioni internucleotidiche 3'-3 'e 5'-5' del DNA, biotinilazione al 3' del DNA, modifiche al gruppo ribosio, 2'-fluoro (2'-F) e/o 2'-ammino (2'-NH2) sui residui pirimidinici, 2 '-O-metil (2'-OMe), Locked Nucleic Acid, Unlocked Nucleic Acid, acido 2'-desossi-2'-fluoro-d-arabinonucleico (2'-F ANA), modifiche ai link fosfodiesterici (Metilfosfonato, fosforotioato, oligonucleotidi tiofosforilati), modifica con triazolo, DNA speculare chirale (I-DNA), aggiunta di colesterolo al 5' del DNA, Polyethylene glycol (PEG) linkage.

7. Aptameri in accordo con una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6, in cui detti aptameri comprendono una miscela di aptameri per la terapia e/o la prevenzione di Papillomavirus umani, in particolare specificamente di uno o più fra:

- Papillomavirus umani (HPV) tipo 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73;
- Papillomavirus umani (HPV) tipo 6, 11, 40, 42, 43, e 44;
- Papillomavirus umani (HPV) tipo 27, 57, 2 ,4, 5, 1 ,65.

8. Aptameri in accordo con una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 5, in cui detti aptameri comprendono una miscela di aptameri per la terapia e/o la prevenzione Papillomavirus non umani, in particolare

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

specificamente di uno o più fra: AaPV1 (EEPV), BgPV1, BPV1, BPV2,BPV3, BPV4, BPV5, BPV6, BPV7, BPV8, BPV9, BPV10, BPV11,BPV12, BPV13, CdPV1,CdPV2,ChPV1,CcaPV1, (RdPV1,CcPV1), OvPV1 (DPV), OaPV1 (OvPV1), OaPV2 (OvPV2), OaPV3,RtPV1 (RPV),SsPV1,Canis familiaris oral Papillomavirus, CPV2 (CfPV2), CPV3, CPV4, CPV5, CPV6, CPV7, CPV8, CPV9, CPV10, CPV11, CPV12, CPV13, CPV14, CPV15, CcrPV1, FcaPV1 (FdPV1), FcaPV2 (FdPV2), LrPV1, PlpPV1, PlPV1, PcPV1, UuPV1,UmPV1, ZcPV1, Delphinus delphis Papillomavirus 1, PphPV1, PphPV2, PphPV4, PsPV1, TtPV1, TtPV2, TtPV3, TtPV4, TtPV5, TtPV6, TtPV7, Miniopterus schreibersii Papillomavirus 1, MscPV1, TT20F, MrPV1, RaPV1,Bettongia penicillata Papillomavirus 1, Erinaceus europaeus Papillomavirus 1, Francolinus leucoscepus Papillomavirus 1, Oryctolagus cuniculus Papillomavirus 1, SfPV1 (CRPV, SPV), Fringilla coelebs Papillomavirus 1, Equus caballus Papillomavirus 1, EcPV2 (EqPV2), EcPV3, EcPV4, EcPV5, EcPV6, EcPV7, Colobus guereza Papillomavirus 1, CgPV2, MfPV1, MfPV2, MfPV3 (RhPV-d), MfPV4, MfPV5 (MfPV-a, MfPV6, MfPV7, MfPV8 (RhPV-a), MfPV9, MfPV10, MfPV11 (RhPV-b), MmPV1 (RhPV1), PpPV1 (PCPV), PtPV1 (CCPV), PhPV1, Psittacus erithacus Papillomavirus 1, Apodemus sylvaticus Papillomavirus 1, EdPV1, MnPV1 (MrPV, MmPV), McPV2, MaPV1 (HaOPV), MmiPV1 (MmPV1), MmuPV1, PmPV1, RnPV1, RnPV2, Trichechus manatus latirostris Papillomavirus 1, TmPV2,Morelia spilota Papillomavirus 1, Caretta caretta Papillomavirus 1, CmPV1.

9. Aptameri in accordo con una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 5, in

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.R.L.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

cui detti aptameri sono per la terapia e/o la prevenzione di Papillomavirus umano e comprendono almeno una delle seguenti sequenze di aptameri:

SEQ ID No.: 1, SEQ ID No.: 2, SEQ ID No.: 3, SEQ ID No.: 4, SEQ ID No.: 5, SEQ ID No.: 6, SEQ ID No.: 7, SEQ ID No.: 8, SEQ ID No.: 9, SEQ ID No.: 10, SEQ ID No.: 11, SEQ ID No.: 12, SEQ ID No.: 13, SEQ ID No.: 14, SEQ ID No.: 15, SEQ ID No.: 16, SEQ ID No.: 17, SEQ ID No.: 18, SEQ ID No.: 19, SEQ ID No.: 20, SEQ ID No.: 21, SEQ ID No.: 22, SEQ ID No.: 23, SEQ ID No.: 24, SEQ ID No.: 25, SEQ ID No.: 26, SEQ ID No.: 27, SEQ ID No.: 28, SEQ ID No.: 29, SEQ ID No.: 30, SEQ ID No.: 31, SEQ ID No.: 32, SEQ ID No.: 33, SEQ ID No.: 34, SEQ ID No.: 35, SEQ ID No.: 36, SEQ ID No.: 37, SEQ ID No.: 38, SEQ ID No.: 39, SEQ ID No.: 40, SEQ ID No.: 41, SEQ ID No.: 42, SEQ ID No.: 43, SEQ ID No.: 44, SEQ ID No.: 45, SEQ ID No.: 46, SEQ ID No.: 47, SEQ ID No.: 48, SEQ ID No.: 49, SEQ ID No.: 50, SEQ ID No.: 51, SEQ ID No.: 52, SEQ ID No.: 53, SEQ ID No.: 54, SEQ ID No.: 55, SEQ ID No.: 56, SEQ ID No.: 57, SEQ ID No.: 58, SEQ ID No.: 59, SEQ ID No.: 60, SEQ ID No.: 61, SEQ ID No.: 62, SEQ ID No.: 63, SEQ ID No.: 64, SEQ ID No.: 65, SEQ ID No.: 66, SEQ ID No.: 67, SEQ ID No.: 68, SEQ ID No.: 69, SEQ ID No.: 70, SEQ ID No.: 71, SEQ ID No.: 72, SEQ ID No.: 73, SEQ ID No.: 74, SEQ ID No.: 75, SEQ ID No.: 76, SEQ ID No.: 77, SEQ ID No.: 78, SEQ ID No.: 79, SEQ ID No.: 80, SEQ ID No.: 81, SEQ ID No.: 82, SEQ ID No.: 83, SEQ ID No.: 84, SEQ ID No.: 85, SEQ ID No.: 86, SEQ ID No.: 87.

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

10. Aptameri in accordo con una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 9, in cui detti aptameri sono scelti tra: aptameri a DNA, aptameri a RNA, aptameri a PNA, aptameri a XNA, aptameri a LNA, somameri, spiegelmeri.

11. Prodotto per l'applicazione topica su pelle e/o mucose comprendente aptameri come in una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 10.

12. Prodotto in accordo con la rivendicazione 11, in cui detto prodotto può essere scelto tra creme, unguenti, gels, contracettivi meccanici e lozioni corporee applicabili su pelle e mucose, o lozioni e soluzioni per il cavo orale.

13. Farmaco o dispositivo medicale comprendente aptameri come in una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 10.

14. Metodo per la diagnosi di Papillomavirus, detto metodo prevedendo l'uso, in un campione biologico di fluido corporeo, di aptameri come in una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 10, in cui detti aptameri alternativamente:

- sono legati con un marcatore adatto la cui attività viene monitorata al fine di rilevare la presenza del Papillomavirus in fluidi corporei, in cui detto marcatore è un reporter a fluorescenza, oppure un enzima, la cui attività può essere rilevabile elettrochimicamente, in assorbanza o luminescenza;
- fungono da anticorpo primario in tecniche immunochimiche;
- si legano ad un nanointerruttore per la rilevazione di analiti proteici;
- si utilizzano in tecniche biosensoristiche che comprendono misure in amperometria, impedenza, voltammetria, capacità,

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

elettrochemiluminescenza, chemiluminescenza.

15. Kit per la diagnosi di Papillomavirus, detto kit comprendendo aptameri come in una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 10.

16. Metodo di selezione di aptameri per la terapia, prevenzione, diagnosi e rilevamento del Papillomavirus, detto metodo prevedendo di generare aptameri che, oltre ad essere configurati per legare specificamente con alta affinità epitopi conformazionali e con modifiche post-traduzionali appartenenti all'intero capside del Papillomavirus, hanno specifiche caratteristiche che soddisfano contemporaneamente anche le seguenti condizioni:

i) legame con detti epitopi ad alta affinità definito mediante tecnica SELEX;

ii) legame con detti epitopi, avente funzione inibitoria definita;

iii) stabilità in fluidi corporei e/o iv) stabilità in prodotti per applicazione od uso topico su pelle o mucose, ad esempio, creme, gel ed oli;

in cui le condizioni iii) e iv) possono essere entrambe soddisfatte oppure alternative, a seconda che detti aptameri siano previsti rispettivamente per uso diagnostico in un campione biologico oppure per uso nell'applicazione topica su pelle e/o mucose.

17. Metodo di identificazione di nuovi epitopi responsabili dell'infettività dei Papillomavirus, detto metodo prevedendo di utilizzare aptameri selezionati mediante un metodo in accordo con la rivendicazione 16 per ottenere una dimostrazione iniziale di un sito rilevante per l'infettività che, una volta identificato, può essere utilizzato come bersaglio di farmaci o anticorpi monoclonali.

p. ULISSE BIOMED S.R.L.

LF 06.07.2018

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

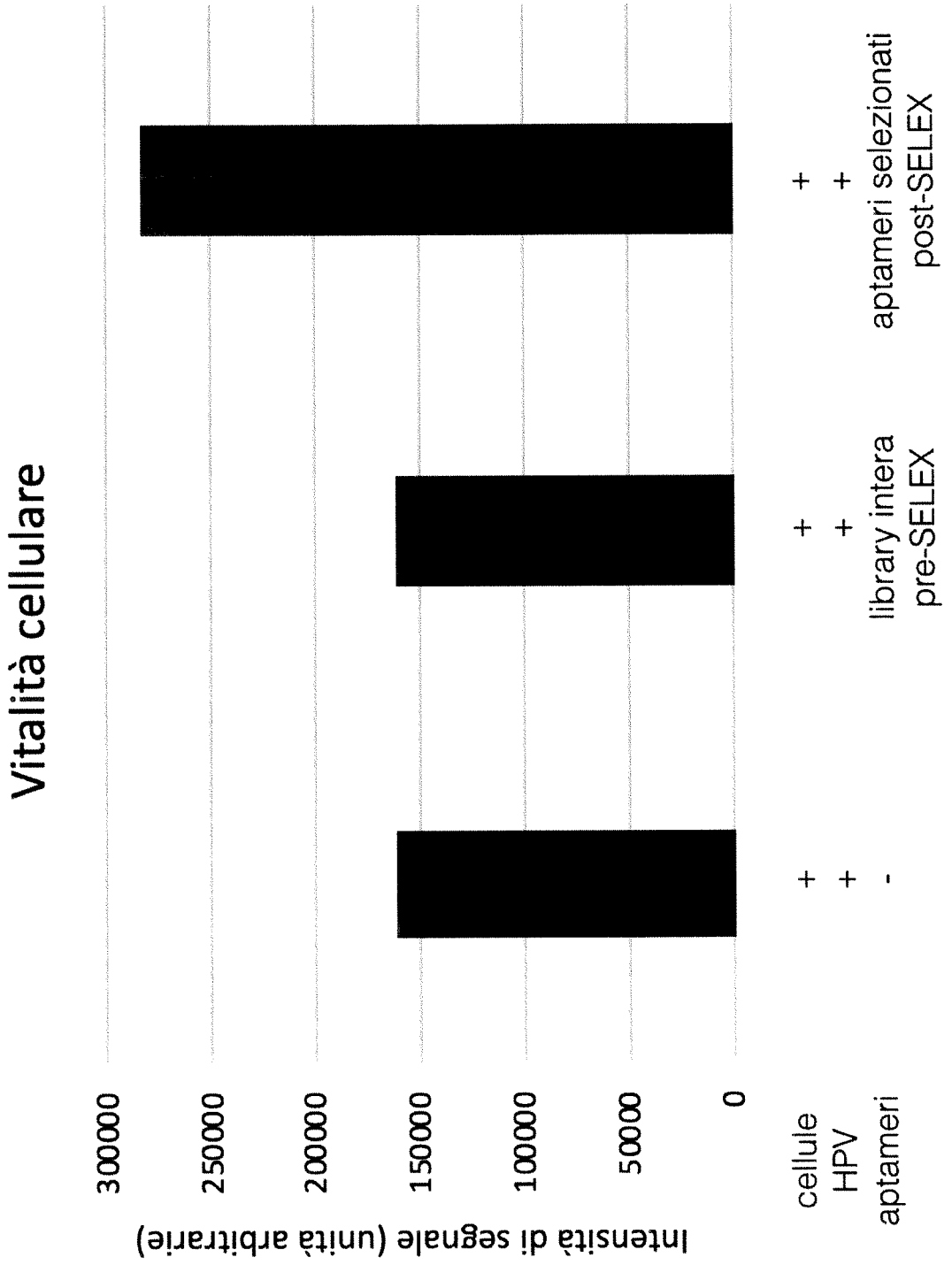


fig. 1

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE

fig. 2

Il mandatario
LORENZO FABRO
(per sé e per gli altri)
STUDIO GLP S.r.l.
Viale Europa Unita, 171 - 33100 UDINE