



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

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102008901689659
Data Deposito	22/12/2008
Data Pubblicazione	22/06/2010

Classifiche IPC

Titolo

ANTICORPO MONOCLONALE ANTI-HCV COME MEDICAMENTO PER IL TRATTAMENTO TERAPEUTICO E LA PREVENZIONE DI INFEZIONI DA HCV
--

DESCRIZIONE dell'invenzione industriale dal titolo:

"Anticorpo monoclonale anti-HCV come medicamento per il trattamento terapeutico e la prevenzione di infezioni da HCV"

Di: Natimab Therapeutics S.r.l., nazionalità italiana, via Ribes 5, Colletterto Giacosa 10010 Torino, Italia.

Inventori designati: Roberto BURIONI, Massimo CLEMENTI.

Depositata il: 22 Dicembre 2008

DESCRIZIONE

La presente invenzione riguarda un anticorpo monoclonale diretto contro la glicoproteina E2 del virus dell'epatite C (HCV) come medicamento per il trattamento terapeutico e la prevenzione di infezioni da HCV.

L'HCV è un virus dotato di pericapside e RNA a filamento singolo, appartenente alla famiglia dei Flavivirus. In base alle differenze genetiche riscontrate fra i diversi isolati di HCV, questa specie virale è classificata in 6 genotipi differenti, ciascuno dei quali è contrassegnato con un numero. Ciascun genotipo comprende a sua volta un certo numero di sottotipi, ciascuno dei quali è indicato con

una lettera. La preponderanza e la distribuzione dei diversi genotipi di HCV varia nel mondo. In Europa il genotipo predominante è 1b, mentre nel Nord America predomina il genotipo 1a. La determinazione del genotipo è importante da un punto di vista clinico, poiché tale caratteristica contribuisce a determinare la potenziale risposta alla terapia basata sull'associazione di interferone alfa e ribavirina, che è il trattamento attualmente più utilizzato. I genotipi 1 e 4, infatti, sono meno responsivi alla terapia a base di interferone rispetto ai genotipi 2, 3, 5 e 6.

Ad oggi non sono disponibili né un vaccino né una immunoterapia che si siano dimostrati veramente efficaci contro il virus dell'epatite C. L'elevata variabilità della struttura antigenica di HCV ha finora impedito lo sviluppo di anticorpi che siano in grado di neutralizzare il virus e che al contempo siano dotati di cross-reattività nei confronti dei diversi genotipi virali. Vi è dunque la necessità di anticorpi anti-HCV che siano dotati di tali caratteristiche e che di conseguenza siano veramente efficaci nella terapia e prevenzione di infezioni da HCV.

Anticorpi diretti contro antigeni di HCV sono

descritti nella tecnica anteriore. Ad esempio, Burioni et al., *Hepatology* Vol. 28, n. 3, 1998, descrivono il clonaggio e la caratterizzazione di sequenze codificanti cinque frammenti anticorpali (Fab) umani ricombinanti specifici per la glicoproteina E2 di HCV (HCV E2), atti a legarsi a glicoproteine di genotipi virali differenti (cross-reattività). Tra i Fab descritti in questa pubblicazione vi è il frammento anticorpale denominato e20. Burioni et al., 1998, cit. descrivono che e20 ha un'elevata attività minima nella neutralizzazione del legame di HCV E2 (attività NOB). Tuttavia, nonostante l'elevata attività NOB, nella domanda di brevetto internazionale WO 03/064473 il frammento anticorpale e20 è descritto come incapace di neutralizzare l'infezione del virus anche ad alte concentrazioni (80 µg/ml) (si veda in particolare pag. 16, righe 8-10 di WO 03/064473).

I presenti inventori hanno ora sorprendentemente trovato che, contrariamente a quanto affermato nella tecnica anteriore ed in particolare in WO 03/064473, il frammento e20 è in grado di neutralizzare efficacemente *in vitro* l'infezione di diversi genotipi di HCV. Ciò rende e20 particolarmente adatto per la neutralizzazione di HCV e l'eliminazione delle cel-

lule infettate da HCV e per l'uso come medicamento per l'immunoterapia e l'immunoprevenzione di infezioni da HCV.

L'ottenimento di tale risultato ha richiesto un lavoro sperimentale lungo e complesso, che viene illustrato in dettaglio nella parte sperimentale che segue.

In estrema sintesi, il lavoro sperimentale condotto dai presenti inventori ha permesso di dimostrare che il frammento anticorpale e20 presenta le seguenti caratteristiche inaspettate:

- è prodotto nel corso di una infezione naturale dovuta ad un ceppo di HCV appartenente al genotipo 1b, ma è in grado di legarsi alle glicoproteine di tutti i genotipi noti di HCV (segnatamente i genotipi 1a, 1b, 2a, 2b, 3, 4, 5 e 6) ed è quindi ampiamente cross-reattivo;
- possiede capacità di neutralizzazione particolarmente intensa nei confronti dei genotipi 1a, 1b, 2a e 4 di HCV, misurata mediante saggio di neutralizzazione basato su pseudoparticelle di HCV (HCVpp);
- alcuni residui aminoacidici cruciali per il legame di e20 alla glicoproteina E2 di HCV sono anche cruciali nell'infezione da HCV, il che suggerisce che mutanti capaci di sottrarsi al legame di e20 siano

al contempo dotati di una ridotta capacità di replicazione.

Le caratteristiche sopra menzionate sono evidentemente vantaggiose ai fini dell'uso del frammento anticorpale e20 come medicamento per l'immunoterapia e l'immunoprevenzione di infezioni da HCV.

Un primo oggetto dell'invenzione è quindi un anticorpo monoclonale o frammento da esso derivato, atto a legare la glicoproteina HCV E2 di una pluralità di differenti genotipi di HCV, come medicamento per il trattamento terapeutico o la prevenzione di infezioni da HCV, caratterizzato dal fatto che l'anticorpo monoclonale o il frammento da esso derivato comprende almeno una regione variabile di catena pesante comprendete la sequenza aminoacidica SEQ ID NO:1 o una sequenza almeno il 90% identica a SEQ ID NO:1 e almeno una regione variabile di catena leggera comprendete la sequenza aminoacidica SEQ ID NO:2 o una sequenza almeno il 90% identica a SEQ ID NO:2.

Ulteriori percentuali preferite di identità di sequenza sono almeno il 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%, in cui l'espressione "almeno" è riferita a ciascuna delle percentuali indicate.

In una forma di realizzazione dell'invenzione,

la regione variabile di catena pesante è codificata dalla sequenza nucleotidica SEQ ID NO:3 e la regione variabile di catena leggera è codificata dal SEQ ID NO:4.

Con il termine "anticorpo" si intende indicare qualsiasi classe di immunoglobuline intere e qualsiasi frammento da esse derivato comprendente una regione variabile di catena leggera e una regione variabile di catena pesante, quale ad esempio Fab, un F(ab')₂, un CDR (regione determinate la complementarità), o un anticorpo a catena singola comprendente regioni variabili di catena pesante e di catena leggera o CDR, o *scaffold* comprendenti una o più copie di frammenti CDR derivati da regioni variabili di catene immunoglobuliniche pesanti e leggere. Ciò include frammenti anticorpali funzionali descritti come ScFvs, *diabodies*, VHHs o catene leggere o pesanti isolate. L'espressione "anticorpo" include inoltre anticorpi che possono essere generati usando le sequenze della regione variabile del frammento anticorpale e20 in un processo di shuffling di regione variabile di catena leggera allo scopo di determinare combinazioni VH/VL con proprietà migliorate in termini di affinità, stabilità e/o produzione ricombinante. L'espressione "anticorpo"

include inoltre qualsiasi tipo di immunoglobulina intera o frammento immunoglobulinico fuso con immunoglobuline intere o frammenti immunoglobulinici specifici che possano indirizzare il frammento anticorpale e20 o l'immunoglobulina verso tessuti, cellule o strutture proteiche solubili specifiche. L'anticorpo monoclonale dell'invenzione è preferibilmente umano.

L'anticorpo usato nell'invenzione può essere in forma libero o in forma coniugata. Una forma coniugata è un anticorpo, come definito sopra, coniugato con una molecola che può modulare la persistenza in vivo, può promuovere o limitare la distribuzione corporea, può diminuire la sensibilità ad agenti proteolitici, può diminuire l'antigenicità, può incrementare la capacità citotossica o può facilitare la rivelazione in un fluido corporeo e in tessuti. Esempi non limitativi di molecole idonee per la coniugazione includono sieralbumina umana, proteina legante il maltosio, glutatione-S-transferasi, proteine dell'involucro fagico p3 o p8, peptidi, zuccheri, PEG o molecole PEG-simili, tossine di origine animale, vegetale o microbiologica, citochine, enzimi, composti chemiluminescenti, composti bioluminescenti, atomi metallici, radioisotopi, composti

fluorescenti, gruppi etichetta o substrati per la fosforilazione, glicosilazione, ubiquitinazione, SUMOilazione o taglio endoproteolitico. Per facilitare la coniugazione, il C-terminale o N-terminale dell'anticorpo può essere modificato, per esempio, mediante inserzione di residui amminoacidici aggiuntivi, per esempio uno o più residui di cisteina che sono atti a formare ponti disolfuro. L'anticorpo usato nell'invenzione può anche essere associato a eritrociti umani o ad altri carrier cellulari, a specifiche formulazioni, o a sistemi a rilascio ritardato quali, ma senza limitazione, liposomi, dendrimeri, microsomi, nanoparticelle, microcapsule, vettori virali e simili.

Un altro oggetto dell'invenzione è una composizione farmaceutica per il trattamento terapeutico o la prevenzione di infezioni da HCV, comprendente una quantità farmaceuticamente efficace di un anticorpo monoclonale o frammento da esso derivato come definito in precedenza.

La composizione dell'invenzione può essere somministrata ad un soggetto affetto da una infezione da HCV o ad un soggetto a rischio di contrarre una infezione da HCV. Può essere utilizzata qualsiasi via di somministrazione adatta, ivi inclusa la som-

ministrazione parenterale, orale, oculare, topica, loco-regionale, clisma o aerosol. La somministrazione parenterale include l'iniezione intramuscolare, l'iniezione intravenosa, l'iniezione intralinfatica, l'iniezione subcutanea o intradermica e l'infusione.

La composizione dell'invenzione può essere preparata in qualsiasi forma farmaceutica che sia adatta alla via di somministrazione selezionata, ad esempio in forma di una soluzione o sospensione iniettabile, un'infusione, una compressa, una capsula, una crema, un unguento, una lozione o una supposta.

La composizione dell'invenzione comprende l'anticorpo o frammento da esso derivato come definito sopra quale principio attivo, nonché adatti eccipienti, veicoli o diluenti farmaceutici noti alla persona esperta del settore.

Un ulteriore oggetto dell'invenzione è un anticorpo anti-idiotipo atto a legarsi specificamente all'idiotipo dell'anticorpo o frammento da esso derivato come definito in precedenza. L'anticorpo anti-idiotipo dell'invenzione può essere ottenuto mediante procedimenti convenzionali per l'ottenimento di anticorpi anti-idiotipo, che sono di per sé noti al tecnico del ramo.

L'invenzione è ulteriormente descritta in dettaglio nella sezione sperimentale che segue, fornita a puro titolo illustrativo, facendo riferimento ai disegni annessi in cui:

La figura 1 mostra il legame di e20 su glicoproteina E2 di HCV derivata da differenti genotipi. I dati sono presentati come percentuale di cellule fluorescenti positive.

La figura 2 mostra l'attività di neutralizzazione del Fab e20 usando pseudoparticelle virali che presentano glicoproteine E1-E2 del genotipo **1a**: UKN1A20.8 (a); E1E2 genotipo **1b**: UKN1B5.23 (b); E1E2 genotipo **2a**: UKN2A1.2 (c); E1E2 genotipo **2b**: UKN2B1.1 (d); E1E2 genotipo **4**: UKN4.21.16 (e). (f) Attività neutralizzante del Fab e20 a 15µg/ml usando pseudoparticelle virali che presentano E1-E2 di differenti genotipi (UKN1A20.8, UKN1B5.23, UKN2A1.2, UKN2B1.1; UKN3A13.6, UKN4.21.16, UKN5.15.11, UKN6.5.8).

La figura 3 l'attività di neutralizzazione di e20 e altri anticorpi anti-HCV (e137, AP33) usando il sistema HCVcc (genotipo 2a). L'infettività di JFH-1 in presenza di e20 e del controllo negativo Fab (c33-3) è presentata come quantità di RNA virale normalizzata contro RNA di gliceraldeide-3-fosfato

deidrogenasi, come determinata mediante PCR quantitativa in trascrizione inversa.

PARTE SPERIMENTALE

Strategia di clonaggio

La preparazione di librerie combinatoriali casuali (*random combinatorial libraries*) esposte sulla superficie di fagi filamentosi rappresenta uno strumento molto potente per la selezione anticorpi monoclonali umani ad alta affinità. La procedura di selezione basata sul *phage display* è infatti estremamente versatile e può essere ottimizzata in modo da selezionare anticorpi cross-reattivi. In particolare, e20 è stato clonato come frammento Fab IgG1 dal repertorio di linfociti B di una donna di 58 anni che era infettata in modo persistente con un ceppo di HCV appartenente al genotipo 1b. Per selezionare i cloni cross-reattivi, la *library* derivata dalla paziente è stata sottoposta a *panning* su una glicoproteina E2 di HCV ricombinante derivata da un isolato virale appartenente a un genotipo differente, ossia 1a. In breve, con questo approccio è stato possibile ottenere anticorpi che vengono prodotti nel corso di un'infezione naturale ma che sono lo stesso in grado di legarsi a differenti glicoproteine mai incontrate dal sistema immunitario del pa-

ziente scelto per lo studio.

Studio delle sequenze della catena pesante e della
catena leggera

Il sequenziamento dei geni della catena pesante e della catena leggera di e20 e lo studio del loro pattern di mutazione (tabella 1) ha mostrato che questo anticorpo deriva da un processo di mutazione somatica, cioè un processo stimolato in un clone anticorpale dal contatto continuo con lo specifico antigene, allo scopo di migliorare l'affinità dell'anticorpo stesso per l'antigene.

Per ciò che concerne la catena pesante, e20 presenta una omologia della sequenza nucleotidica minore dell'85% con il gene della linea germinale. Il pattern di mutazione presenta una tipica distribuzione di un clone mutato somaticamente, con una polarizzazione specifica nelle regioni determinanti la complementarietà (CDR). Lo studio della regione di collegamento di e20 (cioè la regione di collegamento che dà origine a CDR3) mostra che questa è formata da un gene V appartenente alla sottofamiglia VH1-69 (un gene molto rappresentato in una risposta umorale umana anti-HCV), un gene D appartenente alla sottofamiglia D2-21 e un gene JH appartenente alla sottofamiglia JH4.

In modo analogo, la catena leggera di e20 (isotipo κ) mostra una percentuale di mutazione compatibile con un processo di mutazione somatica, come mostrato dalla polarizzazione nelle CDR. Lo studio della regione di collegamento evidenzia che CDR3 della catena leggera di e20 origina dall'unione di un gene κV appartenente alla sottofamiglia $\kappa V3-15$, e un gene κJ appartenente alla sottofamiglia $\kappa J5$.

I dati di sequenza permettono di concludere che e20 non è un anticorpo artificiale, ma che al contrario esso è veramente presente nel repertorio anticorpale del paziente scelto per lo studio.

Tabella 1

a)

gene V	gene D	gene J	lunghezza CDR 3	% di nucleotidi mutati		% di aminoacidi mutati		mutazioni R:S	
				FR	CDR	FR	CDR	FR	CDR
V1-69	D2- 21	J4	18	9.4	16.9	19	38	13: 2	5:1

b)

gene V	gene J	lunghezza CDR 3	% di nucleotidi mutati		% di aminoacidi mutati		mutazioni R:S	
			FRs	CDRs	FRs	CDRs	FRs	CDRs
KV 3-15	KJ5	9	1.5	10.4	1.5	11.5	1:2	3:5

La tabella 1 qui sopra i pattern di mutazione delle linee germinali e del gene V in e20 catena pesante a) e catena leggera b). La percentuale di mutazioni aminoacidiche e nucleotidiche è stata calcolata secondo il metodo di allineamento di Kabat e Wu, prendendo in considerazione FR1, FR2 e FR3 per le catene leggere e pesanti, CDR1 e CDR2 per le catene pesanti, e CDR1, CDR2 e CDR3 per le catene leggere. Il rapporto fra mutazioni di sostituzione (R) e mutazioni silenti (S) è anche riportato.

Valutazione del legame di e20 su E2 derivata da HCV di differenti genotipi

Il frammento e20 in forma di Fab è stato testato per la capacità di riconoscere la glicoproteina E2 di HCV di genotipi diversi a 1b (ossia il genotipo del ceppo che aveva infettato il paziente da cui è stato ottenuto e20) e da 1a (ossia il genotipo usato per il clonaggio del Fab). Le difficoltà incontrate

nell'ottenimento di forme solubili di E2 di HCV di diversi genotipi hanno reso necessario seguire un approccio alternativo basato su FACS.

In breve, cellule epiteliali di rene umano (HEK) 293T sono state fatte crescere in mezzo di Eagle modificato da Dulbecco (DMEM), supplementato con 10% siero fetale di vitello, 5% di aminoacidi non essenziali, 200 mM glutammina, streptomicina (100µg/ml) e penicillina (100 U/ml). Quando è stata raggiunta una confluenza dell'80%, 2×10^6 cellule HEK sono state seminate in piastre da 10 cm e dopo 24 ore sono state transfettate con 3 µg di pCMV-7, un vettore di espressione codificante per le glicoproteine E1E2 di differenti genotipi di HCV, usando un protocollo di transfezione con calcio fosfato. Il mezzo è stato sostituito 16 ore dopo la transfezione e le cellule sono state poi incubate a 37°C per 24 ore. Il mezzo è stato scartato e il monostrato cellulare è stato lavato due volte con PBS. Sono stati aggiunti 5 ml di tampone di dissociazione e le cellule sono state incubate a 37° C per 5 minuti. Le cellule sono state lavate due volte con PBS e centrifugate a 1000 rpm per 5 minuti; 1,2 ml di reagente fissativo sono stati aggiunti al pellet ottenuto da ciascuna piastra. Le cellule sono state incubate per 15 minuti a tem-

peratura ambiente. I campioni sono stati lavati in 5 ml di PBS supplementato con 2% di siero fetale di vitello (FPBS), poi centrifugati a 1000 rpm per 5 minuti.

100 μ l di reagente di permeabilizzazione sono stati aggiunti al pellet con 50 μ l di Fab e20 alla concentrazione finale di 10 μ g/ml. Un protocollo simile è stato seguito anche per le cellule non transfettate, usate come controllo. Dopo una incubazione di 40 minuti a temperatura ambiente, i campioni sono stati lavati in 5 ml di FPBS e 50 μ l di anticorpo secondario coniugato con FITC sono stati aggiunti al pellet. Le cellule sono state incubate per 20 minuti a temperatura ambiente e sono state lavate due volte in 5 ml di FPBS. Infine il surnatante è stato rimosso, il pellet è stato risospeso in 300 μ l di FPBS e le cellule sono state analizzate mediante FACS. L'attività di legame è stata espressa in termini di percentuale di cellule fluorescenti positive ottenute dalla percentuale di cellule con un livello di fluorescenza maggiore rispetto alle cellule senza Fab e20. Un Fab ricombinante umano (c33-3) specifico per un antigene non strutturale di HCV (NS3) è stato incluso come controllo negativo in ciascun esperimento.

Questo approccio mostra che il Fab e20 era in grado di riconoscere tutti i genotipi di E2 di HCV espressi (1a; 1b; 2a; 2b; 3; 4; 5; 6), con una percentuale di cellule fluorescenti superiore di quella ottenuta con il Fab di controllo. I risultati sono riportati in figura 1.

Valutazione del legame di e20 su glicoproteine E2 di HCV 1a mutanti in regioni leganti CD81

Il Fab e20 è anche stato testato su un pannello di E1E2 derivate da H77 (genotipo 1a) mutanti in regioni conservate, descritte per essere cruciali per il legame a CD81 e per l'infettività delle pseudoparticelle di HCV (HCVpp). Ogni posizione conservata in questa regione è stata mutata in alanina. Tutte queste sostituzioni causavano la perdita di infettività nel saggio con HCVpp descritto sotto. Il legame alla glicoproteina E2 di HCV del Fab e20 è abrogato da qualcuna di queste mutazioni cruciali (tabella 2).

I dati descritti in tabella 2 suggeriscono che e20 si leghi a una regione di E2 essenziale per l'infezione virale. Questi dati confermano anche che e20 si lega a una regione critica per il legame di AP33, l'anticorpo anti-HCV neutralizzante avente la cross-reattività più ampia, ma meno adatto come

stampo per la progettazione di un medicamento per la vaccinazione e per l'utilizzo in immunoterapia, considerando che l'immunoterapia con anticorpi eterologhi non è fattibile e che la presenza di anticorpi simili nel repertorio umano è estremamente rara (Tarr et al. *J Gen Virol.* 88:2991. 2007). In maniera ancora più interessante, questa analisi ha mostrato chiaramente che tutti i mutanti non riconosciuti da e20 non consentono una infezione delle cellule bersaglio in un modello di pseudovirus.

Tabella 2

		Q412A	I413A	T414A	N415A	T416A	N417A	G418A	S419A	W420A	H421A	I422A	N423A	R483A
Attività di legame di e20		100	100	95	98	96	97	100	100	97	100	100	100	100
infettività HCVpp	di	5	0	0	0	0	12	0	100	0	0	0	0	0

		P484A	Y486A	W487A	H488A	Y527A	W529A	G530A	N532A	D533A	T534A	D535A	N540A	R543A
Attività di legame di e20		100	95	100	100	92	0	3	100	100	100	10	70	68
infettività HCVpp	di	100	5	0	0	5	0	0	25	30	25	0	40	0

	P544A	P545A	G547A	W549A	P550A
Attività di legame di e20	72	97	98	96	94
infettività di HCVpp	35	80	0	0	5

La tabella 2 qui sopra mostra il legame di e20 su E1E2 derivate da H77 mutanti (genotipo 1a). L'attività di legame è espressa come percentuale di quella misurata sulla proteina H77 selvatica.

Valutazione dell'attività neutralizzante di e20 su pseudoparticelle di HCV derivate da differenti genotipi

L'attività neutralizzante del Fab e20 è stata poi verificata in un saggio di neutralizzazione basato su pseudoparticelle di HCV (HCVpp).

In breve, cellule epiteliali di rene umano (HEK) 293T e cellule di epatoma umano Huh-7 sono state fatte crescere in DMEM, supplementato con 10% siero fetale di vitello, 5% amino acidi non essenziali, 200 mM glutammina, streptomicina (100µg/ml) e penicillina (100 U/ml). Quando è stata raggiunta una confluenza dell'80%, 2×10^6 cellule HEK sono state seminate in piastre da 10 cm e dopo 24 ore sono state co-transfettate con 8µg di vettore virus murino della leucemia (MLV) Gag-Pol, 8µg di vettore di trasferimento MLV codificante per la luciferasi e 3 µg di vettore di espressione pHCMV-7a codificante per gli-

coproteine E1E2 di lunghezza intera di differenti genotipi di HCV. un giorno dopo, il mezzo di transfezione è stato sostituito con 5 ml di mezzo fresco contenente 10 mM HEPES. Le cellule sono state incubate per 24 ore a 37°. le cellule bersaglio (Huh-7) sono state seminate in piastre a 24pozzetti ad una densità di $2,5 \times 10^4$ per pozzetto e incubate overnight a 37°C. Le pseudoparticelle HCV (HCV pp) sono state raccolte 24 ore dopo la sostituzione del mezzo, centrifugate a 2000 rpm per 10 minuti e filtrate attraverso membrane con pori delle dimensioni di 0,45 μm e usate in un saggio di neutralizzazione.

In particolare, 60 μl di mezzo contenente HCVpp sono stati mescolati con 90 μl di differenti concentrazioni di Fab e20 e incubate per 1 ora a 37°C. Questa miscela è stata aggiunta alle cellule bersaglio Huh-7 e le cellule sono state incubate per 3 ore a 37°C. Infine l'inoculo è stato rimosso, 1ml di mezzo fresco è stato aggiunto a ciascun pozzetto, e le cellule sono state incubate a 37°C per 4 giorni. le cellule sono state lavate due volte con PBS e poi lisate con 100 μl di tampone di lisi (Promega), seguendo le istruzioni del produttore. il lisato cellulare è stato trasferito in piastre a 96 pozzetti e 100 μl di substrato/tampone (Promega) sono stati aggiunti a

ciascun pozzetto. L'infezione delle cellule è stata analizzata misurando l'attività luminescente (lettore di piastre Chameleon, Hidex), data in unità di luce relative (RLU). L'attività di neutralizzazione è stata determinata come percentuale di infezione, confrontando la luminescenza ottenuta con quella rivelata nei pozzetti con HCVpp in assenza di qualsivoglia anticorpo atto a dare competizione (neg). un Fab umano ricombinante (c33-3) specifico per un antigene non strutturale di HCV (NS3) è stato incluso come controllo negativo in ciascun esperimento.

Questo approccio ha mostrato che e20 è un forte neutralizzatore di HCV genotipo 1a e 4. E20 mostra un'attività di neutralizzazione al 50% sul genotipo 1a a concentrazioni di 7,5 µg/ml e una inibizione del 75% sul genotipo 4 a 15µg/ml (figure 2a, 2e e 2f). Tuttavia questo anticorpo è anche in grado di neutralizzare fortemente i genotipi 1b e 2a di HCV. Più in dettaglio, a 15 µg/ml e20 dà una neutralizzazione del 40% e del 75% dell'infettività dei genotipi 1b e 2a rispettivamente (figure 2b, 2c e 2f). Infine, e20 è in grado di neutralizzare in misura minore delle HCVpp aventi glicoproteine E1E2 del genotipo 2b, mostrando una inibizione del 20% a 15 µg/ml (figure 2d e 2f).

Attività di neutralizzazione di e20 di un ceppo di HCV cresciuto in coltura cellulare (genotipo 2a, ceppo JFH1)

L'attività di neutralizzazione di HVC di e20 è stata anche testata usando un sistema modello HCVcc (HCV coltura cellulare), utilizzando una linea cellulare stabile di epatoma umano contenente un cDNA, integrato in un cromosoma, di HCV genotipo 2a (JFH1) e produttore in maniera sostenuta virus infettivo (figura 3). Questo sistema permette la valutazione dell'attività di neutralizzazione usando un ceppo di virus dell'epatite C infettivo. In questo set di esperimenti differenti concentrazioni di Fab e20 sono state incubate con il mezzo contenente il virus vgenерato nel saggio HCVcc. Dopo 3 ore la miscela è stata aggiunta a cellule bersaglio (HuH7.5). L'infettività è stata valutata misurando i livelli di RNA di HCV a filamento positivo. Il Fab e20 ha mostrato una forte attività neutralizzante, poiché a una concentrazione di 1µg/ml, che è molto bassa, esso è in grado di abrogare completamente l'infettività di HCV genotipo 2a. L'attività di neutralizzazione del Fab e20 è confrontabile con l'anticorpo monoclonale murino IgG AP33, uno dei più potenti anticorpi cross-neutralizzanti finora descritti.

SEQUENCE LISTING

<110> Natimab Therapeutics S.r.l

<120> An anti-HCV monoclonal antibody as a medicament for the therapeutic treatment and prevention of HCV infections

<130> I0134359-EC

<160> 4

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Leu Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val
1 5 10 15

Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Asp His Tyr Gly Ile Asn Trp Val
20 25 30

Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro
35 40 45

Val Phe Gly Thr Thr Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Ala Thr
50 55 60

Ile Thr Ala Asp Asp Ser Thr Gly Thr Ala Phe Leu Glu Leu Thr Arg
65 70 75 80

Leu Thr Phe Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Thr Pro His Gln
85 90 95

Leu His Val Leu Arg Gly Gly Lys Ala Leu Ser Pro Trp Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr
115

<210> 2

<211> 102

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly

1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Arg Gly Gln Ala Pro Ser Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Thr Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asp Trp Pro Ser
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr
 100

<210> 3
 <211> 348
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 3
 ctgctcgagc agtcaggggc tgaggtgaag aagccagggt cctcggtgaa ggtctcctgc 60
 aaggctctcg gagaccacta tggatcaac tgggtgcgac aggccctcgg acaagggctg 120
 gagtggatgg gcggtatcat cctgtcttt gccacaacta cctacgcaca gaagttccag 180
 ggcagagcca ccattaccgc ggacgactcc acggggacgg ccttttggg gctgaccaga 240
 ctgacatttg acgacacggc cgtctatttc tgtgcgacac ctacccaact gcattgtctc 300
 cggggcggta aagccctctc cccctgggac tactggggcc aggggaacc 348

<210> 4
 <211> 306
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 4
 atggccgagc tcacccagtc tccagccacc ctgtcttgt ctcaggga aagagccacc 60
 ctctctcgca gggccagta gagtgttagc agtaacttag cctggtaacca gcagaacgt 120
 gggcaggctc ccagttcct catctacga acatctacca gggccactgg tatccagcc 180
 aggttcagtg gcagtggttc tgggacagag ttactctca ccatcagcag cctgcagict 240

gaagatttg cagttatta ctgtcagcag tataatgatt ggccctccac ctctggccaa 300

gggaca

306

RIVENDICAZIONI

1. Anticorpo monoclonale o frammento da esso derivato, atto a legare la glicoproteina HCV E2 di una pluralità di differenti genotipi di HCV, come medicamento per il trattamento terapeutico o la prevenzione di infezioni da HCV, caratterizzato dal fatto che l'anticorpo monoclonale o il frammento da esso derivato comprende almeno una regione variabile di catena pesante comprendete la sequenza aminoacidica SEQ ID NO:1 o una sequenza almeno il 90% identica a SEQ ID NO:1 e almeno una regione variabile di catena leggera comprendete la sequenza aminoacidica SEQ ID NO:2 o una sequenza almeno il 90% identica a SEQ ID NO:2.
2. Anticorpo monoclonale o frammento da esso derivato secondo la rivendicazione 1, atto a legare la glicoproteina HCV E2 dei genotipi 1a, 1b, 2a, 2b, 3, 4, 5 e 6.
3. Anticorpo monoclonale o frammento da esso derivato secondo la rivendicazione 1 o 2, che è una immunoglobulina intera o un frammento immunoglobulinico comprendente almeno una regione variabile di catena pesante e una regione variabile di catena leggera.
4. Anticorpo monoclonale o frammento da esso deri-

vato secondo la rivendicazione 3, in cui il frammento è scelto tra un Fab, un $F(ab')_2$, un CDR (regione determinante la complementarità), o un anticorpo a singola catena comprendente regioni variabili di catena pesante e catena leggera o CDR, o scaffold comprendenti una o più copie di frammenti CDR derivati da regioni variabili di catena pesante e di catena leggera.

5. Anticorpo monoclonale o frammento da esso derivato secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 4, che è in forma libera.

6. Anticorpo monoclonale o frammento da esso derivato secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 4, che è coniugato con una molecola atta a modulare la persistenza in vivo, promuovere o limitare la distribuzione corporea, diminuire la sensibilità ad agenti proteolitici, diminuire l'antigenicità, incrementare la capacità citotossica e/o facilitare la rivelazione in fluidi corporei e tessuti.

7. Anticorpo monoclonale o frammento da esso derivato secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 6, che è fuso con una specifica immunoglobulina intera o uno specifico frammento immunoglobulinico capace di indirizzare l'anticorpo verso tessuti, cellule o strutture proteiche solubili specifiche.

8. Composizione farmaceutica per il trattamento terapeutico o la prevenzione di infezioni da HCV, comprendente una quantità farmaceuticamente efficace di un anticorpo monoclonale o frammento da esso derivato come definito in una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 7.

9. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 8, in una forma farmaceutica di dosaggio idonea per la somministrazione parenterale, orale, oculare, topica, loco-regionale, clisma o aerosol.

10. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 8 o 9, in forma di soluzione, sospensione iniettabile, infusione, compressa, capsula, crema, unguento, lozione o supposta.

11. Uso di un anticorpo monoclonale o frammento da esso derivato come definito in una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 7, per la preparazione di un medicamento per il trattamento terapeutico o la prevenzione di infezioni da HCV.

12. Anticorpo anti-idiotipo atto a legarsi specificamente all'idiotipo dell'anticorpo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 7 o frammento da esso derivato.

FIGURA 1

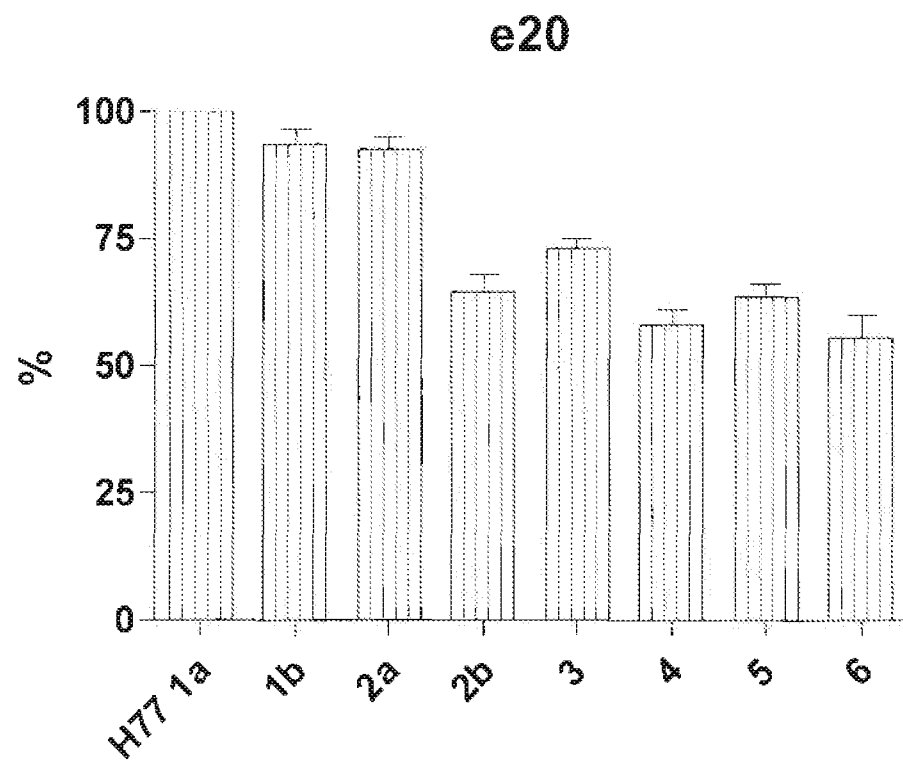


FIGURA 2

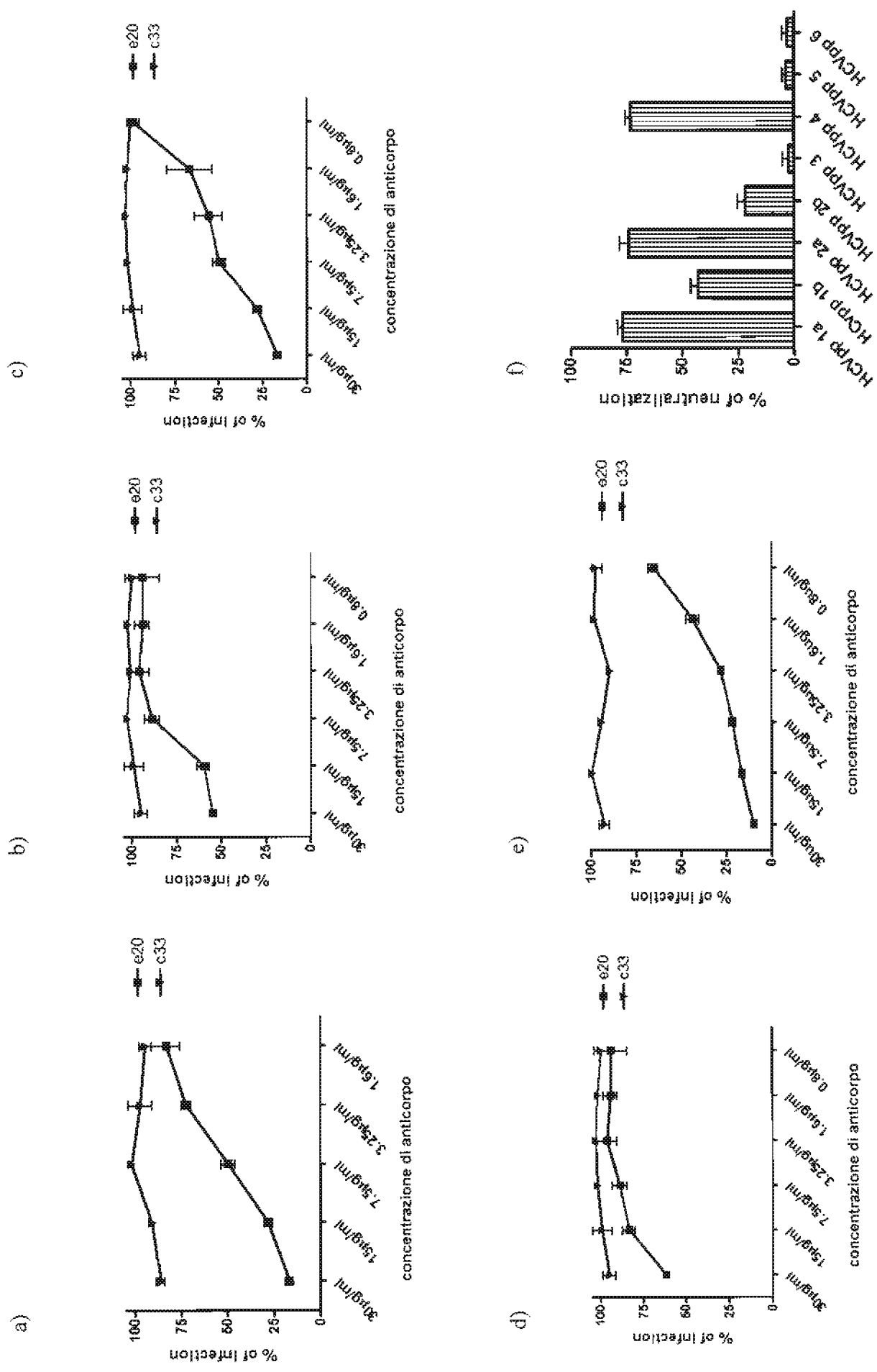


FIGURA 3

