

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102011901990324A1

Publication Date

20130425

Applicant

DOMINICI MASSIMO

Title

UNA CELLULA EFFETTRICE MODIFICATA PER IL TRATTAMENTO DI
NEOPLASIE ESPRIMENTI IL DISIALONGANGLIOSIDE GD2

DESCRIZIONE

Campo di applicazione

5 La presente invenzione riguarda la modificazione genetica di cellule-effettrici (EC) con un recettore chimerico, brevemente CR, anti-G_{D2}-BB- ζ eseguita ex-vivo, ossia all'esterno del corpo del paziente, ed in grado di riconoscere il disialoganglioside G_{D2} espresso da cellule tumorali..

10 Stato della Tecnica

La comprensione della funzione immunitaria cellulare e della biologia del tumore hanno fatto emergere che un sistema immunitario competente svolge un ruolo chiave nella prevenzione e nel trattamento del cancro.

15 Eventi genetici ed epigenetici sono responsabili di una anomala generazione di un grande numero di nuovi antigeni (Ag) che vengono costantemente prodotti dai tumori mentre essi si sviluppano e progrediscono.

I componenti del sistema immunitario possono in teoria rilevare questi Ag e attuare risposte tumorali e cellulari dirette contro le cellule trasformate, inibendone così lo sviluppo.

20 La risposta immune anti-cancro si articola in diverse fasi (si veda la Fig. A), che richiedono la presenza di specifiche citochine e/o chemochine, di cellule di supporto quali le cellule presentanti l'antigene e di effettori cellulari capaci di aggredire specificatamente il bersaglio tumorale, grazie al riconoscimento dell' Ag che ne attiva le funzioni effettrici. Tuttavia, sebbene si verifichi una risposta immune , le cellule immunitarie sono incapaci di eliminare la totalità delle cellule tumorali presenti, in quanto queste adottano molteplici

25 meccanismi di "fuga" (si veda la Tab.A).

30 Questo determina una sorta di tolleranza immunitaria nei confronti

della crescita tumorale.

Per contrastare tali eventi sono state quindi considerate diverse strategie terapeutiche nelle quali gli effettori cellulari vengono ad essere potenziati al fine di un più efficace e persistente attività.

5 Tra queste strategie terapeutiche , le metodiche più in uso prevedono la vaccino terapia anti-cancro, l'immunoterapia cellulare adottiva e la terapia genica.

10 Nel primo caso, gli effettori cellulari vengono ad essere messi a contatto con antigeni specificatamente espressi dal tumore forzandone la loro risposta.

Nell'immunoterapia adottiva, la metodica prevede l'infusione di effettori cellulari, previa la loro moltiplicazione e purificazione ex-vivo sulla base di una selettiva attività anti-tumorale.

15 Infine, con la metodica della terapia genica si modificano gli effettori cellulari al fine di ottenere un più specifico riconoscimento degli antigeni seguito da una maggiore e possibilmente più persistente risposta anti-tumorale.

20 L'efficacia di questo tipo di terapia genica è stata testata nei confronti di patologie quali il melanoma, i carcinomi intestinali, i linfomi, nel cancro prostatico, nel tumore del rene ed anche nelle leucemie linfatiche acute e croniche (Tab.B). Partendo da questi positivi risultati ci siamo posti l'obbiettivo di studiare un approccio di terapia genica con cellule immunitarie che si focalizzi sulle linee tumorali esprimenti sulla loro membrana cellulare un particolare antigene detto G_{D2} .

25

Terapia genica con cellule immunitarie esprimenti recettori chimerici anti- G_{D2}

30 Il disialoganglioside G_{D2} , è una molecola ubiquitaria della membrana plasmatica delle cellule di origine neuro-ectodermica, ed

interviene nella crescita e differenziamento cellulare, oltre che nel mantenimento dell'adesione cellulare alla matrice.

Il G_{D2} è stato dettagliatamente studiato negli ultimi 30 anni, in quanto è risultato un interessante epitopo di superficie caratterizzante diversi tipi di tumori di origine neuro ectodermica e mesodermica.

In particolare, viene sovra-espresso dalla maggior parte delle cellule di neuroblastoma (NB) e di melanoma, ma è assente o espresso a bassi livelli nei tessuti normali.

In ambito pediatrico, il neuroblastoma, in breve di seguito NB, è uno tra i tumori più studiati in quanto presenta un'incidenza annuale di 7-10 casi/milione, ed è terzo in incidenza tra i tumori maligni pediatrici dopo la leucemia ed i tumori del sistema nervoso centrale. Sebbene il tasso di sopravvivenza per i casi di NB a basso e medio rischio sia appurato, la prognosi per i casi di NB ad alto rischio rimane scarsa (<15%). Malgrado lo spettro di terapie contro il NB abbia aumentato i tassi di risposta iniziale, risulta ad oggi difficile ottenere una remissione duratura dei pazienti con malattia disseminata.

Recenti esperienze di immunoterapia nei confronti del NB hanno dimostrato la sua suscettibilità all'azione delle cellule effettrici, rendendo queste procedure un nuovo interessante approccio terapeutico a supporto delle terapie già esistenti e con scopo di prevenire le recidive e garantire un controllo della malattia a lungo termine.

Sulla base di tali esperienze diverse strategie terapeutiche atte potenziare gli effettori cellulari sono state implementate per la cura del NB.

I primi approcci di immunoterapia sono stati introdotti mediante l'infusione nei pazienti di anticorpi monoclonali (in breve MoAb) anti G_{D2} tumore-specifici, di citochine immuno-modulatorie quali IL-2 e

di cellule immunitarie attivate ex-vivo, come descritto per l'immunoterapia adottiva.

Per quanto riguarda gli MoAb, essi sono in grado, una volta riconosciuto lo specifico antigene tumorale, di agire su più livelli, precisamente da un lato innescando un blocco per azione diretta, 5 qualora l'antigene sia un recettore funzionale, dall'altro esercitando azione indiretta, attraverso un processo di citotossicità Ab-dipendente (ADCC) che prevede l'attivazione di effettori cellulari.

Inoltre, gli MoAb sono stati coniugati a molecole radioattive, farmaci 10 chemioterapici o tossine, fungendo così da veicoli per trasportare il composto attivo in maniera altamente specifica verso la sede tumorale.

Anche per l'NB sono stati avviati diversi trial clinici con MoAb anti- G_{D2} (si veda la Fig. B) allo scopo di attivare una risposta 15 immunitaria, tuttavia i primi risultati ottenuti hanno evidenziato uno scarso successo nel trattamento delle recidive da NB così come una elevata tossicità.

Per superare questi limiti, è stata intrapresa la strada della immunoterapia cellulare adottiva, sfruttando come antigene target 20 proprio il disialoganglioside G_{D2} .

Cellule immunitarie sono state così modificate per consentire il riconoscimento e l'eliminazione dei tumori G_{D2} positivi, aprendo 25 nuove speranze terapeutiche non solo ai bambini affetti da questo tumore, ma anche verso i pazienti che presentano tumori associati ad elevata espressione dell'antigene G_{D2} , quali: i carcinomi a piccole cellule del polmone, i melanomi, e di altri tumori

Nel 1998, un gruppo di New York guidato da Sadelain M., ha osservato che la maggior parte delle cellule tumorali utilizza come 30 meccanismo di "fuga", la diminuita presentazione di molecole coinvolte nel processo di co-stimolazione all'attivazione del sistema immunitario, quali B7-1 e B7-2.

Queste molecole, infatti, sono necessarie alle cellule effettrici sia per completare il riconoscimento della cellula tumorale sia per mantenere lo stimolo proliferativo stabilitosi. Partendo da questo presupposto, è stato deciso di modificare dei linfociti T munendoli di un CR in grado di riconoscere le cellule G_{D2}-positive, e costituito dalla scFv di un MoAb G_{D2}-specifico (3G6) associata alla molecola co-stimolatoria CD28, necessaria per attivare in modo efficace l'azione anti-tumorale dei linfociti.

Lo stesso recettore chimerico è stato prodotto in una forma troncata, ovvero mancante della regione intra-citoplasmatica, ed è stato utilizzato come controllo per validare il ruolo della molecola CD28 nella persistenza dello stimolo di attivazione linfocitaria.

Con i primi risultati in vitro, è stato osservato che il CR 3G6-CD28 era in grado non solo di garantire ai linfociti T uno specifico riconoscimento delle cellule G_{D2}-positive ma anche di salvaguardarli dalla morte indotta dagli stimoli del microambiente tumorale, ottenendo una selettiva espansione dei linfociti modificati, al contrario di ciò che si è osservato per le EC esprimenti il CR nella forma troncata.

Nonostante questo studio abbia fornito una delle prime prove a favore dell'importanza del ruolo delle molecole di co-stimolazione nel garantire la proliferazione e la sopravvivenza a lungo termine delle cellule immunitarie, non ha analizzato la capacità dei linfociti modificati di agire nei confronti delle cellule tumorali e quindi non ha valutato la loro efficacia in termini di azione immunologica antitumorale.

Anche il gruppo di Brenner M.K. e Rossig C. del Baylor College of Medicine di Huston nel 2001 ha svolto uno studio in cui linfociti T venivano geneticamente modificati e utilizzati nel trattamento del NB.

In questo caso però sono stati generati CR presentanti nel dominio

intra-citoplasmatico la sola molecola di attivazione del segnale linfocitario CD3 ζ (senza segnali co-stimolatori), fusa con un dominio extra-citoplasmatico composto dalla scFv dell' anticorpo monoclonale anti-G_{D2} (sc14.G2a).

- 5 Le cellule linfocitarie ottenute dopo trasduzione, erano in grado di esprimere stabilmente il CR con un'efficienza inferiore al 30%, ma tale acquisizione, anche se non estesa alla totalità dei linfociti, ha garantito il selettivo riconoscimento e attivazione di tali linfociti modificati nei confronti delle cellule di NB G_{D2}-positive.
- 10 Nonostante questo, è stato osservato che in assenza di un segnale di co-stimolazione appropriato, la loro funzionalità diminuiva nel tempo in quanto la stimolazione antigenica del CR, da sola non è risultata in grado di sostenere sufficientemente la proliferazione cellulare.
- 15 Questi risultati supportano la fattibilità del re-indirizzamento dei linfociti T umani per il trattamento di un tumore G_{D2} associato, ma sottolineano che il successo della immunoterapia adottiva mediata da CR richiede ulteriori strategie che supportino il mantenimento dell'attivazione delle EC.
- 20 Studi più recenti hanno infatti dimostrato che le molecole co-stimolatorie, sono necessarie alle cellule immunitarie non solo per completare l'attivazione dell'azione citolitica una volta riconosciuto il bersaglio (segnale primario e secondario), ma sono essenziali per garantire tale azione nel tempo.
- 25 Da queste osservazioni si deduce che una modifica genica di EC presentanti un CR in associazione ad un segnale co-stimolatore possa rappresentare una chiave per l'ottenimento di risposte immunitarie specifiche e durature.
- 30 Partendo da tali presupposti, Brenner M e colleghi nel 2008 dimostravano che i linfociti T citotossici CD8⁺ (CTL) diretti contro antigeni non-virali associati a tumore, non sopravvivono a lungo nel

microambiente tumorale e mostravano una limitata l'attività antitumorale in-vivo, pertanto hanno deciso di sfruttare la loro reattività anti-virale per sopperire a questa mancanza.

5 E' stato quindi modificato geneticamente CTL Epstein-Barr (EBV)-specifici per far loro esprimere un CR diretto contro G_{D2} ed in questo modo, questi linfociti geneticamente modificati ricevono il segnale co-stimolatorio dai loro recettori nativi attivati dal virus di EBV, mentre l'attività antitumorale specifica viene contemporaneamente mediata dal CR.

10 Lo studio, eseguito su individui affetti da NB , ha dimostrato che i CTL EBV-specifici esprimenti il CR anti- G_{D2} sopravvivono più a lungo sia rispetto agli stessi linfociti modificati per il CR ma mancanti della specificità per il virus EBV, sia rispetto i linfociti CTL forniti di un CR anti- G_{D2} che però presenta come solo segnale di

15 stimolazione intra-citoplasmatico, la catena $CD3\zeta$.

L'infusione dei CTL EBV-specifici modificati con il CR anti- G_{D2} si è dimostrata sicura ed è stata associata alla regressione del tumore nella metà dei soggetti testati divenendo un interessante approccio di l'immunoterapia adottiva cellulare , tuttavia, in questo caso la co-

20 stimolazione non viene supportata da una proprietà intrinseca del CR ma piuttosto dalla pregressa sensibilizzazione delle EC dal virus di EBV, limitando il campo di azione a soggetti che hanno avuto uno specifico contatto con il suddetto virus. Inoltre, soggetti con pregressa esposizione al virus possono avere all'interno delle

25 cellule T il virus stesso quale condizione in se predisponente allo sviluppo di neoplasie linfoidi.

Negli anni sono state quindi studiate e ricercate diverse molecole co-stimolatorie, al fine di poterle associare al CR e potenziarne l'efficacia. Tra esse degna di nota è la molecola 4-1BB detta anche

30 CD137 e membro della famiglia dei recettori TNF, cruciale per attività antitumorale delle cellule T.

Nel 2009, Campana D. e colleghi, hanno pubblicato uno studio in cui modificavano linfociti T con un CR anti-CD19 (importante marcatore per la leucemia linfatica acuta), presentante a livello intra-citoplasmatico il dominio di segnalazione della molecola co-stimolatoria 4-1BB.

I linfociti T modificati geneticamente per esprimere questo CR hanno dimostrato una potente e specifica attività citolitica nei confronti delle cellule leucemiche CD19-positive e tale efficacia è risultata superiore a quella ottenuta con i linfociti modificati con lo stesso CR mancante però della porzione di 4-1BB. Grazie a questo ed altri precedenti studi, Campana D. e collaboratori hanno descritto, con il brevetto US2005/0113564 che riguarda "Recettori Chimerici con 4-1BB come dominio co-stimolatorio di segnalazione", la possibilità di modificare genericamente EC fornendole di specifici CR anti CD-19 dotati di una molecola di co-stimolazione altamente efficiente, ottimizzando così il l'attivazione ed il mantenimento dello stimolo citolitico antitumorale nel tempo.

L'esperienza accumulata con tutti questi studi permette quindi di affermare che il tipo di trattamento con elevati numeri di cellule effettrici geneticamente modificate possa essere utilizzato per la sua scarsa pericolosità nella pratica clinica, tuttavia, la difficoltà di applicare con successo tale terapia può risiedere nella bassa persistenza di queste cellule a lungo termine, come pure nell'avanzato stato della malattia tumorale.

Questi dati sottolineano la necessità di migliorare l'azione immunologica dopo trapianto modificando la struttura recettoriale al fine di ottimizzare sia la sua capacità di attivare, in prima istanza, il processo citolitico antitumorale; sia di consentire una più performante persistenza a lungo termine delle cellule effettrici nella sede tumorale, al fine di consentire una reale e duratura remissione della malattia.

Presentazione dell'invenzione

Uno scopo dell'invenzione è migliorare lo stato della tecnica nota.

5 Un altro scopo dell'invenzione è mettere a punto una cellula, detta recettore chimerico, anti- G_{D2} , che sia in grado di riconoscere con elevata affinità il disialoganglioside (G_{D2}) espresso a livelli elevati in molti tumori umani di origine neuro-ectodermica, ma assente o espresso a bassi livelli nei tessuti normali.

10 Un altro scopo dell'invenzione è di fornire al recettore chimerico anti- G_{D2} una porzione contenente la molecola di co-stimolazione 4-1BB, creando due distinte porzioni fuse reciprocamente: una porzione intra-citoplasmatica ed una porzione extra-citoplasmatica. Tale molecola composita detta anti- G_{D2} -BB- ζ ha un ruolo
15 determinante per l'attività antitumorale della cellula.

Un altro scopo dell'invenzione è fornire una molecola CR anti- G_{D2} -BB- ζ a cellule effettrici per renderle in grado di attivare un'azione citotossica nei confronti di cellule esprimenti G_{D2} .

20 Un altro scopo dell'invenzione, è realizzare un metodo per la produzione ex-vivo di EC dotate del recettore anti- G_{D2} -BB- ζ altamente specifico che sostenga le terapie antitumorali.

Secondo un aspetto dell'invenzione è prevista una cellula effettrice modificata, detta anche recettore chimerico, per il trattamento di tumori esprimenti anti- G_{D2} -BB- ζ per il trattamento del tumore G_{D2} -
25 positivo, in accordo con la rivendicazione 1.

Secondo un ulteriore aspetto dell'invenzione è previsto un metodo per la produzione di una cellula effettrice modificata per il trattamento di tumori esprimenti il disialoganglioside G_{D2} secondo le caratteristiche della rivendicazione 10.

30 Il metodo per la produzione della cellula effettrice modificata (o recettore chimerico) anti- G_{D2} -BB- ζ e la cellula effettrice consentono

pertanto di:

- ottenere una popolazione cellulare che presenta un fenotipo riconducibile a cellula effettrice;

5 - ottenere che la popolazione cellulare riconducibile a cellule effettrici esprima sulla sua superficie una molecole detta recettore chimerico anti- G_{D2} -BB- ζ in modo tale da ottenere un'azione antitumorale specifica nei confronti di cellule esprimenti il disialoganglioside G_{D2} ;

10 - di agire da terapia di supporto ai trattamenti già esistenti, con scopo di prevenire le recidive e garantire un controllo della malattia a lungo termine.

Rispetto alle già esistenti formulazione per la creazione di un CR anti- G_{D2} , il recettore anti- G_{D2} -BB- ζ oggetto della presente invenzione è composto dalle seguenti due porzioni: da una
15 porzione extra-citoplasmica, costituita dalla regione scFv derivante dal MoAb IgM anti- G_{D2} (clone 126), in grado di riconoscere specifico con una elevata efficienza un disialoganglioside (G_{D2}) e da una porzione intra-citoplasmica, costituita dalla regione transmembrana della molecola CD8 α linfocitaria; da un dominio di co-
20 stimolazione della molecola 4-1BB e da un dominio di attivazione della molecola CD3 ζ come rappresentato nella Fig.1.

L'invenzione consente pertanto di ottenere i seguenti vantaggi:

25 - elevata affinità di legame con l'antigene tumorale in base alla proprietà intrinseca della regione scFV dell'anticorpo alla base del CR anti- G_{D2} ;

- immediata attivazione delle funzioni effettrici anti-tumorali delle cellule modificate con l' anti- G_{D2} -BB- ζ a seguito del legame antigenico;

30 - il mantenimento di tale effetto anti-tumorale grazie alla persistenza dello stimolo legato alla coesistenza nella struttura del CR della molecola di co-stimolo 4-1BB;

MAROSCIA & ASSOCIATI SRL

Dr. Ing. S. Bergamini - n° 430 BM

- la possibilità di avere una adeguata azione anti-tumorale con bassi rapporti tra cellule effettrici e cellule tumorali consentendo di raggiungere una eradicazione delle cellule tumorali con minori numeri di cellule effettrici;

- 5 - la possibilità di modificare varie tipologie di effettori cellulari attivandone o incrementandone una selettiva azione anti-tumorale per l'antigene G_{D2} grazie all'utilizzo di vettori modificanti un ampio spettro di cellule eucariote.

10 Breve descrizione dei disegni.

Ulteriori caratteristiche e vantaggi dell'invenzione risulteranno maggiormente evidenti dalla descrizione di una cellula effettrice modificata (detta anche recettore chimerico) per il trattamento di tumori esprimenti anti- G_{D2} -BB- ζ fornita in modo stabile a cellule effettrici per il trattamento di cellule anomale esprimenti G_{D2} , descritta a titolo indicativo e non limitativo nella seguente descrizione e con riferimento alle figure allegate in cui:

15 **Figura 1.** è una rappresentazione dettagliata dei diversi domini funzionali del costrutto codificante per il recettore chimerico anti- G_{D2} -BB- ζ (e della sua versione troncata anti- G_{D2} -TM) di cui:

La porzione del costrutto codificante per la regione extra-citoplasmatica del CR è costituita da:

- 25 - un peptide segnale contenente una sequenza intronica;
- la sequenza codificante per la regione variabile delle catena leggera dell'anticorpo IgM anti- G_{D2} (clone 126);
- un linker di 18 amminoacidi che permette il corretto ripiegamento della regione di riconoscimento dell'antigene G_{D2} ;
- 30 - la sequenza codificante per la regione variabile della catena pesante dell'anticorpo IgM anti- G_{D2} (clone 126);

La porzione del costrutto che codifica per la regione trans-

membrana e la regione intracellulare della molecola CR anti-G_{D2}-BB- ζ di interesse è composta da:

- la porzione trans-membrana del recettore TRC dei linfociti T citotossici (CD8+);
- 5 - la porzione intracellulare della molecola di co-stimolazione 4-1BB (CD137);
- la porzione intracellulare della molecola CD3 ζ linfocitaria umana.

Figura 2. È una sequenza di DNA codificante per la molecola detta recettore chimerico anti-G_{D2}-BB- ζ nella sua forma completa
 10 costituita da 1612 paia di basi. La porzione del scFv è evidenziata con il carattere in grassetto, la STM invece mediante il carattere
 15 italo. La forma troncata del CR, detta CR anti-G_{D2}-TM, mancante del dominio di attivazione intra-citoplasmatico, indicato mediante
 carattere sottolineato, è composta quindi da una sequenza di DNA della lunghezza complessiva di 1087 paia di basi.

Figura 3. E' una rappresentazione schematica dell'invenzione in cui si può osservare come la sequenza precedentemente descritta
 20 codifichi per un CR caratterizzato da una regione extra-citoplasmatica, una regione trans-membrana ed una intra-citoplasmatica. La regione extra-citoplasmatica è necessaria per il
 riconoscimento dell'antigene G_{D2} sulla superficie delle cellule tumorali target; la regione intra-citoplasmatica ha il ruolo di attivare
 25 e mantenere lo stimolo citolitico delle cellule effettrici una volta avvenuto il legame con l'antigene G_{D2}; la regione transmembrana
 lega queste due porzioni e permette la loro corretta localizzazione sulla membrana cellulare.

Figura 4. E' una analisi dell'efficienza di trasduzione delle EC con i
 30 tre diversi costrutti eseguita mediante valutazione della quantità di

fluorescenza emessa dalla proteina marker proteina fluorescente verde (GFP) codificata dal vettore da noi usato. I costrutti codificano rispettivamente per il CR anti-G_{D2}-BB- ζ (completo); il CR anti-G_{D2}-TM (troncato), e un costrutto non esprime il CR detto vettore vuoto, che esprime solo la proteina GFP., da noi usato come controllo (CN).

Figura 5. E' una rappresentazione schematica della tecnica di separazione delle cellule effettrici modificate esprimenti il CR anti-G_{D2}-BB- ζ . Il CR viene riconosciuto da anticorpi anti-idiotipo ottenuti mediante immunizzazione di topi BALB/c con metodica del Gene Gun. i topi hanno sviluppato, in seguito all'immunizzazione, anticorpi anti-idiotipo che riconoscono la regione scFv (extra-citoplasmatica) del CR anti-G_{D2}-BB- ζ . Un secondo anticorpo (IgG) di origine animale diversa (ratto), coniugato a biglie immunomagnetiche, è in grado di riconoscere e legarsi all'anticorpo anti-idiotipo. Tale sistema è stato utilizzato per purificare, mediante separazione magnetica, la popolazione di cellule effettrici efficientemente trasdotte, e quindi esprimenti il CR anti-G_{D2}-BB- ζ , da quelli non trasdotti.

Figura 6. E' una rappresentazione dell'efficienza di infezione delle cellule effettrici con i vari vettori prima e dopo sorting/separazione cellulare. La rilevazione della proteina marker GFP indica indirettamente l'efficienza di trasduzione con il vettore (barre grigie e bianche), mentre la rilevazione diretta dell' l'efficienza di trasduzione del CR sulla superficie delle cellule effettrici viene eseguita mediante l'utilizzo dell'anticorpo anti-idiotipo seguito da un anticorpo coniugato con un fluoro cromo (barre a righe e nere).

Figura 7. Mostra una serie di dati relativi alla caratterizzazione

fenotipica delle cellule effettrici eseguita sia dopo la separazione di tali cellule effettrici su gradiente del sangue periferico (giorno 0, barre grigie) sia dopo il processo di trasduzione con i vettori codificanti per il CR (giorno 15, barre nere).

5

Figura 8. Mostra una caratterizzazione, mediante analisi citofluorimetrica, del livello di espressione di membrana dell'antigene G_{D2} da parte di diverse linee cellulari tumorali. In particolare, le linee cellulari di neuroblastoma (SH-SY-5Y, SKnBE) esprimono tipicamente il disialoganglioside G_{D2} sulla membrana, mentre la linea cellulare di carcinoma della cervice uterina (Hela) non esprime il G_{D2} .

10

Figura 9. E' un particolare dell'espressione del disialoganglioside G_{D2} sulla superficie della linea tumorale di neuroblastoma SH-SY5Y, analizzata mediante metodica di immuno-fluorescenza con microscopio a fluorescenza (ingrandimento 10x). Gli anticorpi utilizzati per tale valutazione sono i seguenti: anticorpo primario anti- G_{D2} (BD); anticorpo secondario di capra, anti-topo (tutte le classi Ig) coniugato con rodamina.

15

20

Figura 10. E' una analisi della capacità citotossica delle cellule effettrici munite del recettore chimerico anti- G_{D2} -BB- ζ , o del recettore nella forma troncata anti- G_{D2} -TM, nei confronti di linee cellulari tumorali, misurata con il test di rilascio del Cromo⁻⁵¹ radioattivo dopo 4 ore di co-cultura,

25

Figura 11. E' una valutazione della riduzione del numero di cellule tumorali G_{D2} positive causata dalla condizione di co-cultura a lungo termine (6 giorni) con cellule effettrici modificate.

30

Figura 12. E' una valutazione dell'espressione della molecola recettoriale CD25 (recettore per l'interleuchina 2 IL-2) sulla superficie delle cellule effettrici attivate dal riconoscimento delle cellule tumorali.

5

Descrizione dettagliata di un esempio di realizzazione preferito.

Secondo l'invenzione, si sono combinate sia la terapia genica sia l'immunoterapia adottiva, generando una strategia terapeutica che prevede la modifica genica degli effettori precedentemente espansi ex-vivo fornendo loro molecole di superficie, dette recettori, in grado di riconoscere gli antigeni tumorali e di attivare nei loro confronti una specifica attività citolitica.

10

15 Terapia genica con cellule effettrici esprimenti recettori chimerici

Questo approccio prevede la modificazione genica di cellule effettrici mediante l'utilizzo di sequenze geniche, cosiddette "vettori", in grado di indurre l'espressione di molecole di superficie dette recettori chimerici (CR). I CR sono strutture trans-membrana costituite da una componente intra-citoplasmatica e da una extra-citoplasmatica che, fungendo da "ancora", è in grado di riconoscere e legare in maniera specifica l'antigene tumorale di interesse. La regione extra-citoplasmatica, responsabile del riconoscimento dell'Ag tumorale, è costituita dal frammento variabile di immunoglobuline (Ig) Ag-specifiche di origine murina (scFv), mentre le regione intra-citoplasmatica è costituita da parti di molecole, di origine umana, responsabili dell'attivazione della risposta immunitaria. L'unione di queste due importanti funzioni permette la creazione di una nuova molecola, appunto detta chimerica, che presenta il vantaggio di possedere una elevata specificità ed

20

25

30

efficienza by-passando i meccanismi di "fuga" tumorale. Avvenuto il legame tra il recettore chimerico e l'antigene-specifico, il CR trasmette all'interno della cellula effettrice il segnale di attivazione innescando in modo diretto ed assai specifico la risposta immune.

5

Creazione del CR anti-G_{D2}-BB-ζ

Il costrutto (catena di DNA) codificante per il CR anti-G_{D2}-BB-ζ è costituito essenzialmente da due porzioni: una componente extra-citoplasmatica in grado di riconoscere in modo specifico la sequenza antigenica di interesse (disialoganglioside G_{D2}) e una intra-citoplasmatica in grado di trasmettere in modo efficace il segnale di attivazione delle cellule effettrici.

10

Le sequenze delle due porzioni della molecola detta CR anti-G_{D2}-BB-ζ sono state poi assemblate tramite la tecnica del Splicing by Overlap Extension by PCR (SOE-PCR), già nota alla comunità scientifica. Il cDNA codificante la regione scFv dell'anticorpo monoclonale IgM anti-G_{D2}, derivato dall'ibridoma 126, è stato ottenuto mediante amplificazione di questa regione dalla molecola pcDNA3- G_{D2}-hεSIP.

15

20

La regione intra-citoplasmatica invece è composta da diverse parti tra cui: la porzione trans-membrana del recettore TRC dei linfociti T citotossici (CD8α); la porzione intracellulare della molecola di co-stimolazione 4-1BB e la porzione intracellulare attivatoria della molecola CD3-ζ linfocitaria che insieme costituiscono la "Signal Transduction Machinery (STM)".

25

Le due componenti di detto recettore chimerico sono state assemblate utilizzando la tecnica dello Splicing by Overlap Extension (SOE-PCR). Tale processo ha permesso di ottenere il costrutto codificante il CR anti-G_{D2}-BB-ζ. E' stata inoltre generata una versione troncata dello stesso CR. Tale versione troncata

30

manca della regione intra-citoplasmatica comprendente le molecole 4-1BB e CD3- ζ , e presenta solamente la porzione trans membrana della molecola CD8 del TRC dei linfociti T citotossici (CD8 α).

5 La versione troncata del CR, detta CR anti-G_{D2}TM, è stata generate amplificando il cDNA del costrutto codificante per il CR anti-G_{D2}-BB- ζ , utilizzando però diverso reverse-primer (5'-GCCTTAAGGCTTAGCAGTAAAGGGTGATAACCAAGTGACAG-3') che contiene nella sua regione 5' un sito di restrizione per l'enzima EcoRI. Il costrutto così costituito viene rappresentato nella Fig.1, 10 mentre la sequenza di DNA completa codificante i CR viene descritta nella Fig.2.

Creazione del vettore virale per creare la cellula effettrice esprimente il CR anti-GD2

15

La creazione di una popolazione di cellule-veicolo in grado di produrre stabilmente un pool di particelle retro virali capaci di infettare la popolazione di cellule-effettore di interesse, è stata articolata attraverso due fasi.

20

La prima fase basata sull'ottenimento di una linea cellulare produttrice il retrovirus in modalità transiente e la seconda fase finalizzata ad ottenere la generazione di una Producer Cell Line (PCL) capace di dar vita in modo stabile ad una progenie retrovirale. Per la fase transiente fibroblasti renali embrionali (cellule 25 293 T), ad una confluenza del 70% circa, sono state transfettate con una soluzione di 5 μ g (in fiasca da 25cm²) di DNA plasmidico totale e l'ausilio di policationi.

30

In seguito, il surnatante retrovirale ottenuto dalla transfezione transiente delle 293T è stato raccolto ed utilizzato per infettare la linea cellulare PCL, derivante da una linea di fibrosarcoma umano; 24 h dopo l'infezione le cellule sono state analizzate al cito-

fluorimetro per verificare la percentuale di positività per proteina fluorescente verde (GFP), marcatore dell'efficienza di infezione.

Il surnatante virale raccolto dalle PCL, è stato utilizzato per infettare le cellule effettrici.

5

La trasformazione delle cellule effettrici.

10 Le cellule effettrici (di seguito brevemente EC) sono state separate dal resto dei componenti cellulari del sangue periferico, mediante centrifugazione su gradiente di densità (Ficoll) e sono state successivamente pre-stimolate per 48 ore con interleuchina 2 (IL-2) e fitoematoagglutinina (PHA-M), in quanto i retrovirus mostrano un elevato potere infettante unicamente nelle cellule che si presentano in fase di attiva replicazione.

15 Le EC, fatte aderire ad un supporto di plastica mediante l'utilizzo di retronectina, hanno sostenuto tre hit di infezione, a distanza di 24h, con il surnatante virale proveniente dalle PCL mostrando successivamente una elevata capacità di esprimere il CR in superficie (efficienza di infezione media del 48%).

20 Lo stesso processo è stato eseguito al fine di produrre anche EC esprimenti il CR nella sua versione troncata; pertanto sono state create tre tipologie di EC modificate:

- EC trasdotte con il vettore vuoto dette "EC-CN" (non riconoscono G_{D2} ma esprimono la GFP);
- 25 - EC esprimenti il CR anti- G_{D2} TM (riconoscono G_{D2} ma non reagiscono nei confronti della cellule questo antigene);
- EC esprimenti il CR anti- G_{D2} -BB- ζ , (in grado sia di riconoscere cellule G_{D2} -positive, sia di avere mostrare verso esse un'azione citocida).

30 Alla fine della fase di trasduzione, le EC sono state mantenute nel loro terreno standard di coltura per alcuni giorni prima di essere

analizzate al citofluorimetro per verificare l'espressione della proteina marker GFP (Fig.4) e successivamente del CR sulla superficie cellulare.

5 L'espressione del CR è stata determinata utilizzando in modo sequenziale due anticorpi. Il primo un anticorpo anti-idiotipo di origine murina in grado di riconoscere la regione extra-

10 citoplasmatica del CR (in particolare la frazione variabile dell'anticorpo anti- G_{D2}). Successivamente sono stati utilizzati anticorpi policlonali di ratto, marcati con un fluorocromo, in grado di associarsi agli anticorpi IgG diretti verso il CR e di consentire la visualizzazione al citofluorimetro.

15 Questo anti-idiotipo è stato ottenuto mediante immunizzazione di topi BALB/c che, con tecnica del Gene Gun, hanno ricevuto a livello della cute micro-particelle di oro alle quali era stata precedentemente fissata una quota di DNA codificante per il CR.

20 Le particelle d'oro promuovono lo svilupparsi di una reazione immunitaria locale mediata dalle cellule dendritiche della cute che, fagocitando queste particelle e processando il DNA ad esso legato, lo "prestano" ai linfociti di tipo B che attivano una risposta anticorpale specifica. I topi immunizzati hanno prodotto, nel siero, discrete quantità di anticorpi policlonali anti-idiotipo, in grado quindi di riconoscere la porzione scFv del CR espressa sulle EC.

25 Purificazione della popolazione linfocitaria esprime il recettore chimerico di membrana attraverso metodica immuno-magnetica.

30 Al fine di implementare la purezza della popolazione di EC esprimenti il recettore chimerico, e quindi di superare la soglia del 50% che si ottiene mediamente attraverso l'infezione degli stessi per mezzo dei retrovirus, si è ricorsi all'utilizzo di una metodica in

grado di separare le cellule trasformate dalla restante popolazione cellulare.

La separazione della popolazione cellulare chimerica dalla totale avviene attraverso l'utilizzo di colonne di separazione immuno-

5 magnetica MACS LD per deplezione .

Il funzionamento prevede la marcatura delle EC esprimenti il CR con un anticorpo primario che viene successivamente riconosciuto da un anticorpo secondario legato ad una biglia che viene

10 trattenuta, per carica magnetica, all'interno della colonnina.

Il legame che si crea è dato dal CR presente sulle EC con un anticorpo anti-idiotipo (mouse anti-human) e un anticorpo finale che è coniugato alle biglie immuno-magnetiche (rat anti-mouse IgG1

15 MicroBeads) le quali trattengono le cellule modificate all'interno della colonna inserita nel supporto magnetico, mentre le cellule non modificate oltrepassano la colonna nella sua lunghezza e possono essere così separate (Fig.5).

La semplice rimozione della colonna del supporto magnetico porta al distacco delle EC esprimenti il CR, ed esse vengono raccolte e mantenute in coltura. Grazie a tale procedura si ottiene

20 un arricchimento della popolazione dei linfociti chimerici che va dal 50% al 70-80% (quindi del 20% circa) (Fig.6).

Analisi di espressione del disialoganglioside G_{D2} su linee tumorali si neuroblastoma:

25

Il laboratorio dispone di due linee cellulari tumorali di neuroblastoma (Fig.8):

SH-SY-5Y: clone isolato nel 1970 da bimba di 4 anni (massa metastizzata a livello osseo) 3° subclone proveniente della linea

30 cellulare di neuroblastoma SK-N-SH.

SK-n-BE: clone isolato nel 1972; bimbo di 2 anni con

neuroblastoma disseminato (biopsia midollo osseo) anche dopo ripetuti cicli di chemioterapia. Le linee SK-N-BE(1) e (2) provengono dallo stesso paziente ma derivano da biopsie effettuate a 5 mesi di distanza

5 Come linea target di controllo è stata prese in considerazione la linea umana di carcinoma della cervice uterina (Hela) che non presenza l'antigene target espresso in superficie.

La detection per l'antigene G_{D2} di interesse è stata eseguita mediante la metodica cito-fluorimetrica. In particolare le cellule
 10 tumorali sono state messe a contatto inizialmente con un anticorpo in grado di riconoscere l'antigene G_{D2} espresso in membrana (Purified mouse anti-human disialoganglioside G_{D2} monoclonal antibody -BD), e successivamente è stato aggiunto un anticorpo, definito secondario, in grado di emettere fluorescenza dopo il
 15 legame con l'anticorpo primario (APC Goat Anti-Mouse Ig polyclonal - multiple adsorption, BD).

Da questa analisi si è potuto osservare che tutte le linee di NB da noi analizzate esprimono discrete quantità G_{D2} in membrana: rispettivamente del 99% per le SH-SY5Y e del 33% per le SK-n-BE,
 20 mentre la linea cellulare Hela conferma la già ipotizzata assenza di G_{D2} sulla superficie cellulare.

Questa osservazione rende le linee tumorali prese in considerazione, ottimi target per il tipo di terapia ipotizzata per questa invenzione.

25

Studio dell'azione del linfocita trasformato su linee cellulari tumorali e/o su cellule tumorali primarie.

L'ultima fase di attuazione dell'invenzione è caratterizzata dallo
 30 studio dell'azione delle cellule effettrici geneticamente modificate su linee cellulari tumorali e/o su cellule tumorali primarie, attraverso la

messa a punto di una serie di test volti a valutare la citotossicità, la specificità e le capacità proliferative delle stesse.

In accordo con l'invenzione, sono state eseguite in laboratorio differenti studi:

- 5 studio dell'azione delle EC modificate nei confronti di linee cellulari tumorali in un test che valuta la citotossicità a breve termine (4h);
 studio dell'azione delle EC modificate nei confronti di linee cellulari tumorali in un test che valuta la citotossicità a lungo termine (6 giorni);
- 10 valutazione dell'effettiva attivazione delle EC modificate dopo contatto con linee cellulari tumorali a breve termine (24h).
1. Studio dell'azione delle EC modificate nei confronti di linee cellulari tumorali in un test che valuta la citotossicità a breve
 15 termine (4h).
 Studio volto a valutare l'azione citolitica delle EC nei confronti di linee cellulari tumorali G_{D2}-positive a breve termine mediante il test in-vitro di citotossicità con Cromo-⁵¹ (Cr⁵¹) eseguito dopo 4 ore di cocultura.
- 20 Le cellule target sono state marcate con un'adatta quantità di Cr⁵¹, e successivamente sono state aggiunte le cellule effettrici nel rapporto voluto.
 Il surnatante cellulare, raccolto al termine delle 4h di cocultura, conteneva quantità di Cr⁵¹ libero direttamente correlate alla quantità
 25 di cellule tumorali lisate dalle EC.
 I surnatanti cellulari sono stati analizzati con un MicroBeta® Trilux, ed il rilascio percentuale di Cr⁵¹ specifico è stato calcolato secondo l'opportuna formula.
- 30 Attraverso i dati ottenuti con il test del Cr⁵¹ è stata osservata una diversa attività citotossica delle EC con CR anti-G_{D2}-BB-ζ, rispetto quelle modificate con il vettore vuoto (CN), nei confronti della linea

SH-SY-5Y, in particolare, dopo 4h di cocultura, con un rapporto cellula Target: cellula Effettrice (T:E) di 1:20, le EC-CR anti-G_{D2}-BB-ζ hanno dimostrato un significativo effetto citotossico, pari al 42,7%, contro il 11,7% ottenuto con le EC-CN (p= 0,05) (Fig.10).

5 Allo stesso modo, la reazione citotossica nei confronti della linea SKnBE da parte delle EC con CR anti-G_{D2}-BB-ζ, rispetto quelle modificate con il vettore vuoto (CN), o con il costruito troncato CR anti-G_{D2}-TM, si è dimostrata decisamente specifica ed elevata. Le EC-CR anti-G_{D2}-BB-ζ manifestano un elevato effetto citotossico a
10 breve termine (88±25%) statisticamente significativo se confrontato con l'effetto citotossico ottenuto con le altre due tipologie di cellule effettrici; in particolare con una significatività p<0,01 se paragonata con le EC-CR anti-G_{D2}-TM; e una significatività p=0,05 nei confronti delle EC-CN).

15 Il mancato effetto citotossico delle EC nei confronti della linea tumorale G_{D2}-negativa (Hela) indica l'elevata specificità dell'azione citolitica delle EC da noi modificate per l'espressione del CR anti-G_{D2}-BB-ζ.

20 2. Per confermare questo dato, sono state caratterizzate, mediante citofluorimetria, le popolazioni cellulari al termine di co-culture della durata di 6 giorni con un basso rapporto E:T =5:1. E' stata infatti osservata una diminuzione significativa (dal 92% al 23±9%, p <0,004) dell'espressione di G_{D2} sulla superficie delle cellule di NB
25 della linea SH-SY-5Y, in presenza delle EC-CR anti-G_{D2}-BB-ζ; mentre con le EC con CR anti-G_{D2}-TM questa quota è rimasta pressoché invariata (dal 92% al 63,8±20%) (Fig.11).

Anche nei confronti della linea tumorale G_{D2}-positiva SKnBE si è osservata una diminuzione significativa (dal 37% al 9,02±4,4%)
30 dell'espressione di G_{D2} in presenza delle EC-CR anti-G_{D2}-BB-ζ; mentre con le cellule di controllo CN, questa quota è diminuita in

modo non significativo (dal 37% al $29,48 \pm 17\%$).

3. Studio dell'attivazione del linfocita trasformato nei confronti di linee cellulari tumorali.

5 La risposta attivatoria delle cellule effettrici è normalmente caratterizzata anche dall' up-regolazione del recettore IL-2 (CD25) sulla superficie cellulare.

Questo segnale infatti favorisce la proliferazione delle cellule, così come la produzione di citochine e la secrezione di granuli ad azione citolitica, con conseguente effetto citotossico nei confronti delle
10 cellule bersaglio.

Per confrontare la diversa capacità dei due CR di indurre una risposte anti-tumorali, abbiamo analizzato questi parametri in risposta alla interazione tra le EC con le linee di neuroblastoma
15 G_{D2} -positive.

La valutazione dell'attivazione delle EC a breve termine è stata realizzata dopo 24h di cocultura attraverso l'analisi citofluorimetrica. Le EC sono state distinte dalle cellula target per la loro espressione delle proteina GFP.

20 Già dopo 24 ore di cocultura con un bassi rapporti E:T (qui mostrati il rapporto E:T=3:1) abbiamo osservato una significativa up-regolazione della molecola CD25 sulla superficie delle EC con CR anti- G_{D2} -BB- ζ sia rispetto quelle modificate per il CR anti- G_{D2} -TM sia rispetto le EC-CN (Fig. 12).

25 In particolare, dopo cocultura con cellule SH-SY5Y, le EC modificate con il CR anti- G_{D2} -BB- ζ mostrato un'elevata espressione di CD25 ($55 \pm 1,3\%$) se confrontata con quella rilevata CR anti- G_{D2} -TM ($44 \pm 1,1\%$) rispetto alle cellule di controllo CN ($19,4 \pm 0,9\%$).

30 Queste differenze risultano inoltre statisticamente significative ($p < 0,01$).

Le stesse considerazioni possono essere fatte per ciò che riguarda

l'attivazione delle EC determinata dal riconoscimento della linea tumorale G_{D2}-positiva SKnBE mentre non si osserva alcuna specifica attivazione da parte delle EC modificate nei confronti della linea tumorale G_{D2}-negativa Hela e confermare che l'attivazione di tali CR sono in grado di selezionare specificatamente le cellule tumorali G_{D2}-positive ottimizzando l'attivazione della risposta citolitica da parte delle cellule effettrici modificate con il CR anti-G_{D2}-BB-ζ.

Si è constatato come l'invenzione raggiunga gli scopi prefissati.

L'invenzione è suscettibile di modifiche e varianti, tutte rientranti nel concetto inventivo.

Inoltre, tutti i dettagli sono sostituibili con altri elementi tecnicamente equivalenti a seconda delle esigenze, senza per questo uscire dall'ambito di protezione delle seguenti rivendicazioni.

RIVENDICAZIONI

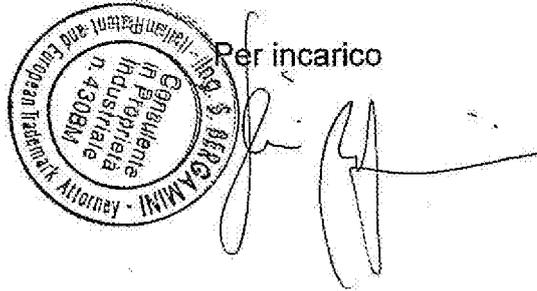
1. Una cellula effettrice modificata (o recettore chimerico) per il trattamento di neoplasie esprimenti il disialoganglioside G_{D2} comprendente:
- 5 Un citoplasma nel quale è presente un nucleo e che è racchiuso da una membrana plasmatica;
- Un recettore chimerico;
- caratterizzata dal fatto che detto recettore chimerico comprende una porzione intra-citoplasmatica, ed una porzione extra-citoplasmatica che è fusa con detta porzione
- 10 intra-citoplasmatica.
2. Una cellula secondo la rivendicazione 1, in cui detta porzione intra-citoplasmatica comprende una molecola di co-stimolazione.
3. Una cellula secondo la rivendicazione 2, in cui detta molecola di co-stimolazione è di origine umana.
- 15 4. Una cellula secondo la rivendicazione 2, in cui detta molecola di co-stimolazione comprende una proteina 41BB.
5. Una cellula secondo la rivendicazione 1, in cui detta porzione extra-citoplasmatica comprende una frazione di una proteina.
6. Una cellula secondo la rivendicazione 5, in cui detta frazione di una proteina
- 20 comprende una frazione di proteina scFv.
7. Una cellula secondo la rivendicazione 6, in cui detta frazione di proteina scFv è di origine murina.
8. Una cellula secondo la rivendicazione 7, in cui detta frazione di scFv comprende una immunoglobulina individuante un antigene Disialoganglioside.
- 25 9. Una cellula secondo la rivendicazione 8, in cui detta immunoglobulina comprende una immunoglobulina di riconoscimento di un Disialoganglioside di classe 2.
10. Un metodo per ottenere una cellula effettrice modificata per il trattamento di neoplasie esprimenti il disialoganglioside G_{D2} caratterizzato dal fatto che comprende :
- inserire un recettore chimerico anti- G_{D2} -BB- ζ codificato da un vettore prodotto in
- 30 maniera non reversibile, in una cellula-effettrice ottenendo una cellula-effettrice che produce il recettore chimerico anti- G_{D2} -BB- ζ in modo stabile, detto recettore chimerico

anti-G_{D2}-BB-ζ comprendendo due distinte porzioni fuse reciprocamente: una porzione intra-citoplasmatica ed una porzione extra-citoplasmatica.

11 . Un farmaco caratterizzato dal fatto che comprende una cellula effettrice modificata secondo una o più delle rivendicazioni da 1 a 9.

5

Per incarico



A circular stamp is positioned to the left of a handwritten signature. The stamp contains the text: 'Consulente Industriale n. 430 BM' in the center, and 'Ing. S. BERGAMINI - Attorney' around the perimeter. The signature is written in black ink over the stamp and extends to the right.

10

15

20

25

30

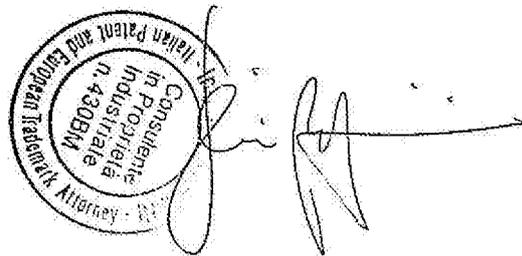
CLAIMS

1. A modified effector cell (or chimeric receptor) for treating disialoganglioside G_{D2} -expressing neoplasia, comprising:
- 5 a cytoplasm with a nucleus therein, which is enclosed in a plasma membrane;
- a chimeric receptor;
- 10 characterized in that said chimeric receptor comprises an intracytoplasmic portion and an extracytoplasmic portion which is fused to said intracytoplasmic portion.
2. A cell as claimed in claim 1, wherein said intracytoplasmic portion comprises a co-stimulatory
- 15 molecule.
3. A cell as claimed in claim 2, wherein said co-stimulatory molecule is of human origin.
4. A cell as claimed in claim 2, wherein said co-stimulatory molecule comprises a 4-1BB protein.
- 20 5. A cell as claimed in claim 1, wherein said extracytoplasmic portion comprises a fraction of a protein.
6. A cell as claimed in claim 5, wherein said fraction of a protein comprises a fraction of scFv
- 25 protein.
7. A cell as claimed in claim 6, wherein said fraction of scFv protein is of murine origin.
8. A cell as claimed in claim 7, wherein said fraction of scFv comprises a disialoganglioside antigen-recognizing immunoglobulin.
- 30 9. A cell as claimed in claim 8, wherein said immunoglobulin comprises a disialoganglioside class II-recognizing immunoglobulin.

10. A method of obtaining a modified effector cell for treating disialoganglioside G_{D2} -expressing neoplasia, characterized in that it comprises:

inserting a non-reversibly produced vector-encoded anti- G_{D2} -BB- ζ chimeric receptor into an effector cell, thereby obtaining an effector cell that stably produces the anti- G_{D2} -BB- ζ chimeric receptor, said anti- G_{D2} -BB- ζ chimeric receptor comprising two distinct mutually fused portions: an intracytoplasmic portion and an extracytoplasmic portion.

11 . A drug characterized in that it comprises a modified effector cell as claimed in one or more of claims 1 to 9.



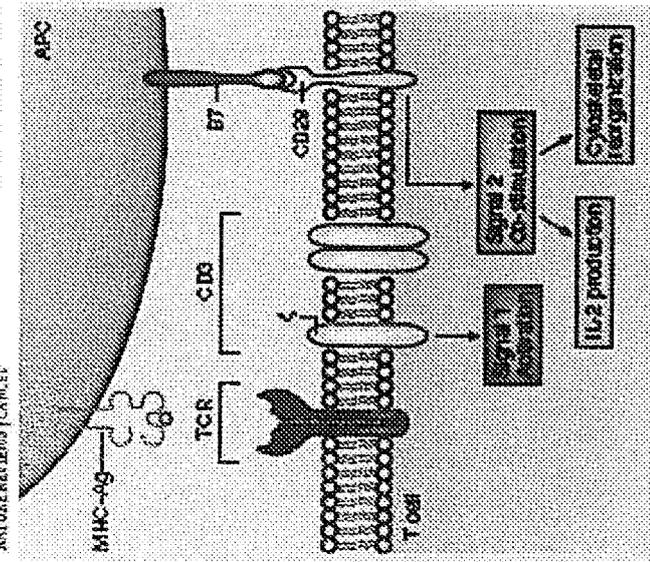
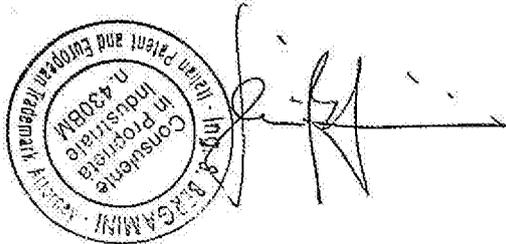


Fig. A



Tab. A

Tab. A meccanismi tumorali di evasione dal sistema immunitario.

| Difetti nella presentazione dell'antigene | Anomaliie nel microambiente tumorale | Difetti del LT |
|--|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Deficit delle molecole di adesione (ICAM-1, ICAM-3) • Deficit delle molecole HLA • Difetti nella presentazione degli antigeni • Difetto/assenza delle molecole costimolatorie (B7-1, B7-2) • Presenza di ligandi peptidici (antigeni) alibrati | <ul style="list-style-type: none"> • Produzione di citochine inibitorie (TGF-beta, IL-10, VEGF) • Fattori di crescita tumorale, neo-angiogenesi | <ul style="list-style-type: none"> • Assenza o delezione di precursori del LT • Anergia • Delezione o difetti del LT CD4 helper • Assenza di LT memoria • Presenza di inibitori della funzione del LT |

LT: Linfociti T; ICAM-1 -3: Intercellular Adhesion Molecules-1 and 3; HLA: Human Leucocyte Antigens; TGF-beta: Transforming growth factor beta; IL-10: Interleukin-10; VEGF: Vascular endothelial growth factor.

Tab. B

Table 1 | Tumour antigens targeted by genetically modified primary T cells

| Target antigen | Associated malignancy | Receptor type | <i>In vivo</i> studies | References |
|-----------------|-----------------------------|--|------------------------|------------------------------|
| MDM2 | Multiple malignancies | $\alpha\beta$ TCR | - | 15 |
| MART1 | Melanoma | $\alpha\beta$ TCR | - | 14 |
| MAGE-A1 | Melanoma | $\alpha\beta$ TCR | - | 21 |
| LMP2 | Type II EBV* tumours | $\alpha\beta$ TCR | - | 16 |
| CD30 | Lymphomas | scFv-Fc α R γ | - | 48 |
| ERBB2,3,4 | Breast and others | Heregulin-CD3 ζ scFv-CD3 ζ | - + | 24,26 30 |
| CEA | Colorectal cancer | scFv-CD3 ζ scFv-Fc α R γ scFv-CD3e | + + - | 46,47,119,120 31,46 44 |
| EGP40 | Colorectal cancer | scFv-Fc α R γ | - | 121 |
| TAG-72 | Adenocarcinomas | scFv-CD3 ζ | + | 33,122 |
| GD3 | Melanoma | scFv-CD3 ζ scFv-CD3e | - - | 123 123 |
| PSMA | Prostate cancer | scFv-CD3 ζ | - | 64 |
| FBP | Ovarian cancer | scFv-Fc α R γ | + | 34,35,124 |
| G250 | Renal-cell carcinoma | scFv-Fc α R γ | - | 125-127 |
| EGP2 | Multiple malignancies | scFv-CD3 ζ scFv-Fc α R γ | - - | 42 42,128 |
| GD ₂ | Neuroblastoma | scFv-CD3 ζ | - | 41 |
| CD19 | B-cell malignancies | scFv-CD3 ζ | + | 36 |
| PSMA | Tumour neovasculature | scFv-CD3 ζ | - | 64 |
| KDR | Tumour neovasculature | scFv-Fc α R γ | - | 129 |
| VEGF-R2 | Tumour neovasculature | scFv-CD3 ζ | - | 130 |
| GD ₂ | Neuroblastoma | scFv-CD28 | - | 40 |
| CEA | Colorectal cancer | scFv-CD28-CD3 ζ | - | 38 |
| PSMA | Prostate/tumour vasculature | scFv-CD28-CD3 ζ | - | 65 |
| ERBB2 | Breast and others | scFv-CD28-CD3 ζ | + | 32 |



Fig. B

Table 1. CLINICAL TRIALS OF MONOCLONAL ANTIBODY-BASED IMMUNOTHERAPY IN PATIENTS WITH RELAPSED OR REFRACTORY NEUROBLASTOMA

| Study | Monoclonal Antibody (mg/m ² /course) | Cytokines | No. of Patients Evaluable for Response | Responses |
|------------------------------------|---|---------------|--|------------------------------|
| <i>Phase I studies</i> | | | | |
| Cheung (1987) ^{10,11} | 3F8 (5-100) | — | 6 | 1 PR, 2 SD, 3 PD |
| Huang (1992) ¹² | 14G2a (25-500) | — | 15 | 1 CR, 3 MR, 1 SD |
| Handgretinger (1992) ¹³ | 14G2a (100-400) | — | 6 | 2 CR, 2 PR, 2 PD |
| Murray (1994) ¹⁴ | 14G2a (50-200) | — | 5 | 2 PR, 1 SD, 2 PD |
| Frost (1997) ¹⁵ | 14G2a (10-100) | IL-2 + GM-CSF | 31* | 1 PR, 7 SD |
| Handgretinger (1998) ¹⁶ | ch14.18 (150-250) | — | 9 | 2 CR, 2 PR, 1 MR, 1 SD, 3 PD |
| Yu (1998) ¹⁷ | ch14.18 (10-200) | — | 9 | 1 CR, 4 MR, 1 SD, 3 PD |
| <i>Phase II studies</i> | | | | |
| Yu (1997) ¹⁸ | ch14.18 (200) | GM-CSF | 27 | 1 CR, 3 PR, 1 MR, 2 SD |
| Cheung (1998) ¹⁹ | 3F8 (50) | — | 16 | 1 CR, 1 MR, 1 SD |
| Kushner (2001) ²⁰ | 3F8 (100) | GM-CSF | 43 | 11 CR/VGPR†, 4 MR, 8 SD |

*Seven patients of 33 in entire study (31 neuroblastoma patients, 2 patients with osteogenic sarcoma) did not complete (AI) in patients with stable/refractory (not progressive) disease at time of immunotherapy.

†IL = Interleukin-2; GM-CSF = granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; PR = partial response; SD = stable disease; CR = complete response; MR = mixed response; VGPR = very good partial response; PD = progressive disease.

Monoclonal antibody-based therapy for neuroblastoma (Current Oncology reports 2000, 2:547-553)



Handwritten signature and initials.

Fig.1

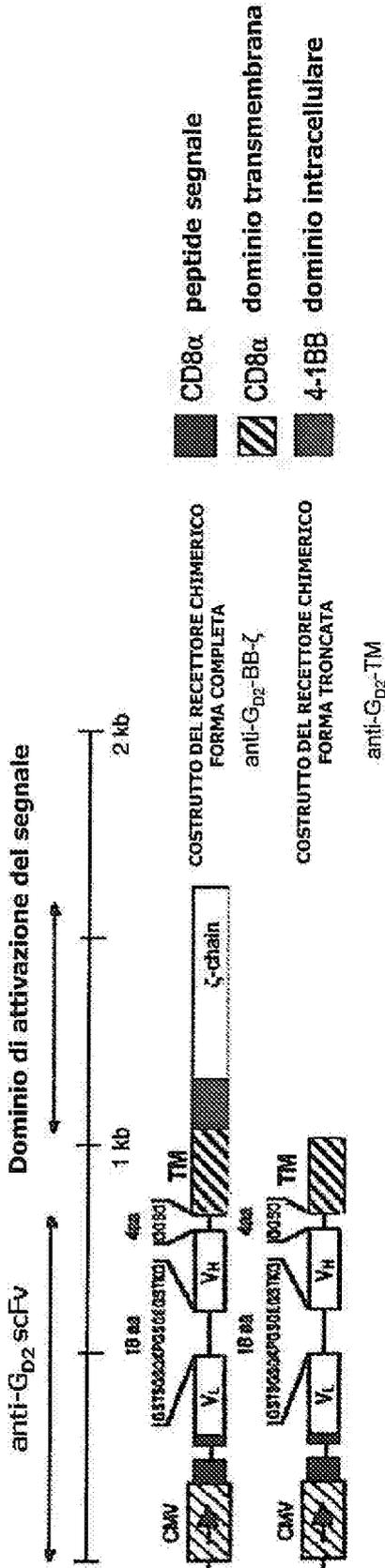
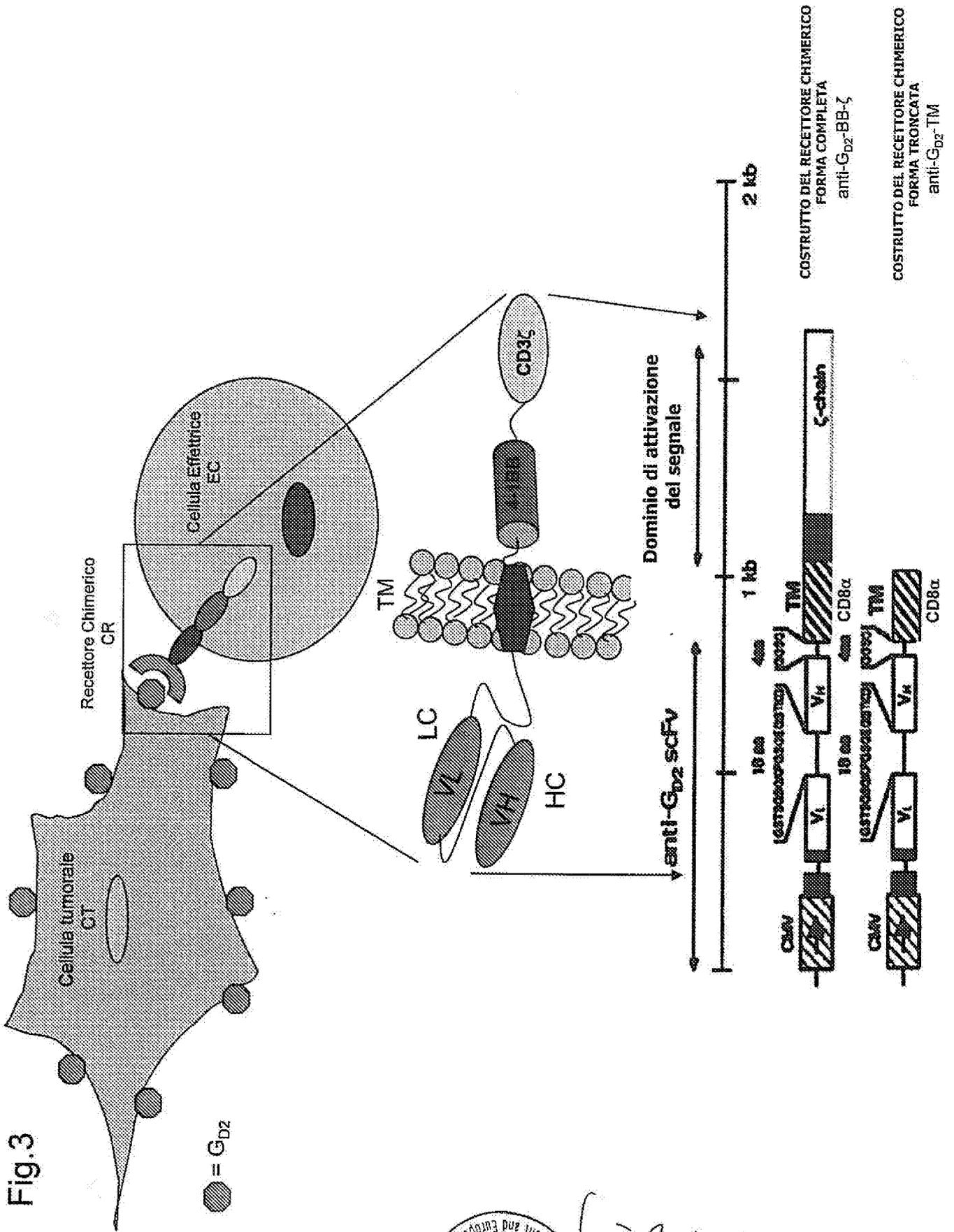


Fig.2

5'-
 ATGGGCTGGAGCCTGATCCTCCTGTTCCCTCGTGGCTACAGGTAAGGGGCTCACAGTAGCAGGGCTTGAGGCTGGACATATATATGGGT
 GACAAATGACATCCACTTTGGCTTTCCTCCACAGGTGGCAGTGGATATTGATGACCCAGTCTCCATCCCTCCCTGGCTGTGCAGCAGGAGA
 GAAGGTCACTATGAACAGTGCAGATCCAGTCCAGAGTCTCCTCAGCAGTAGAACCCGAAAGAACTACTTGGCTTGGTACCCAGCAGAAACCAGGGCA
 GTCTCCTAAACTGCTGATCTACTGGGCATCTATTAGGGAATCTGGGTCCTGATCGCTTACAGGCACTGGATCTGGACAGATTTCACCTCTCA
 CCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTATTACTGCAAGCAATCTTAATCTTCCGACGTTCCGGTGGAGCCACCAAGCTGGAAAT
 CAAAGGCAGCACTAGTGGTAGCCGCAACCAGGTTCCGGCGAAGGCTCGAGCAAGGTGAGGTGCAGCTGAGGAGTCTGGACCTGGCCCTGGGCTGG
 TGGCGCCTCACAGAGCCTGCCATGCATGGCAGTCTCTGGGTTTTTCAATACCAGCTATGGTGTTCACCTGGTTCGCCAGCTCCAGGAAAG
 GGTCTGGAGTGGCTGGGAGTATCTGGGCTGGTGGAAATCACAATTAATACTCGGCTCTCATGTCCAGACTGACCATCAGCAAGACAACTCCA
 AGAGCCAAAGTTTTCTTAAATGAACAGTCTTCAACTGATGACACAGCCATATACTACTGTGCCAGAGGGGCTGTGATTACGACGGCTTTGGT
 TACTGGGCCCAGGGACTCTGGTCACTGCTTACCACGAGCCAGCCGCGGACCAACACCGGGCCACCATCCGCTCCAGCCCTTGGT
 CCCTGGCCCCAGAGCCGTGCCGGCCAGCGGGGGCCAGTGCACACGAGGGGCTGGACTTCGCTGTGATATCTACATCTGGCCGCTT
 TGGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCCCTGCTACTGCTTACCTCAACCGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCACTT
 TATGAGACCAGTACAACACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTCAGAGAGAGAGGAGGATGTGAAGTGAAGTTCAG
 CAGGAGCCAGACGCCCCCGGTACCAGGAGGGCCAGAACCAAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAAGAGGAGTACGATGTTGGACA
 AGAGACGTGGCCGGACCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAGGAGCCCTGACAAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGC
 GGAGCCCTACAGTGGATGGGATGAAAGCCAGCCCGGAGGGCCAGTGGCTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGAC
 ACCTACGAGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCTTACACAGCCAGGGGATTCACCACCTCAAAGGCCAGACCTGCAGACGCCCATATG
 AGACACA - 3'

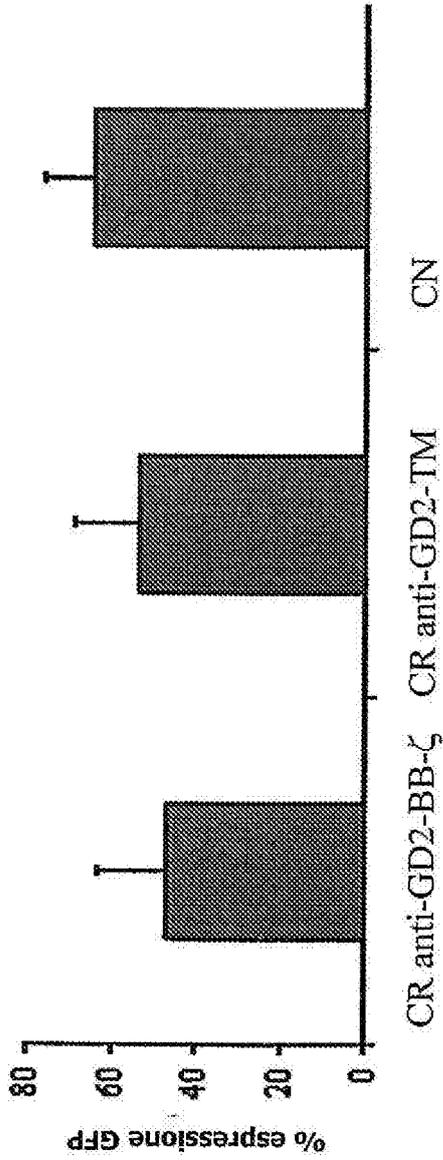
Consulente in Proprietà Industriale n. 4308M
 Esperto Attribuito
 BERGAMINI - Ing. S.

Fig.3



[Handwritten signature]

Fig.4



[Handwritten signature]

Fig.5

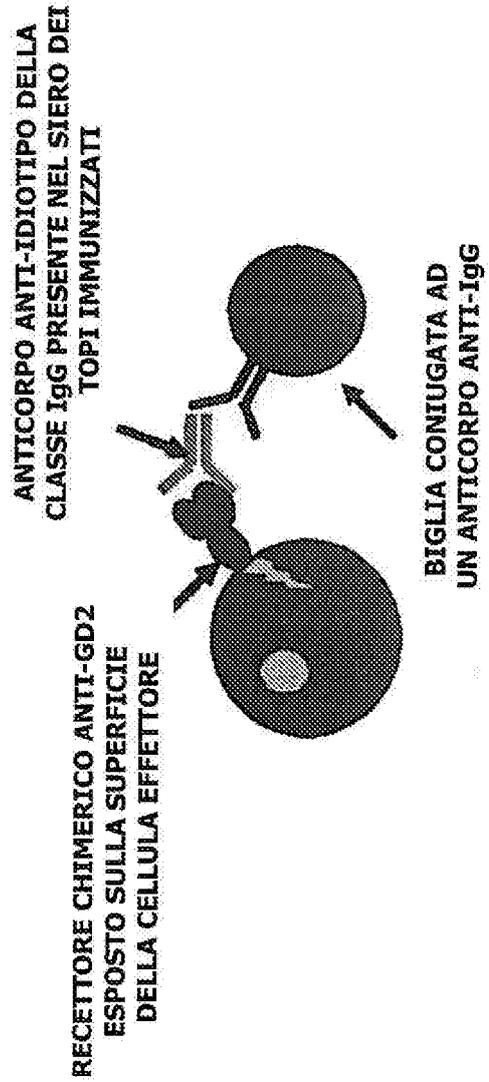


Fig.6

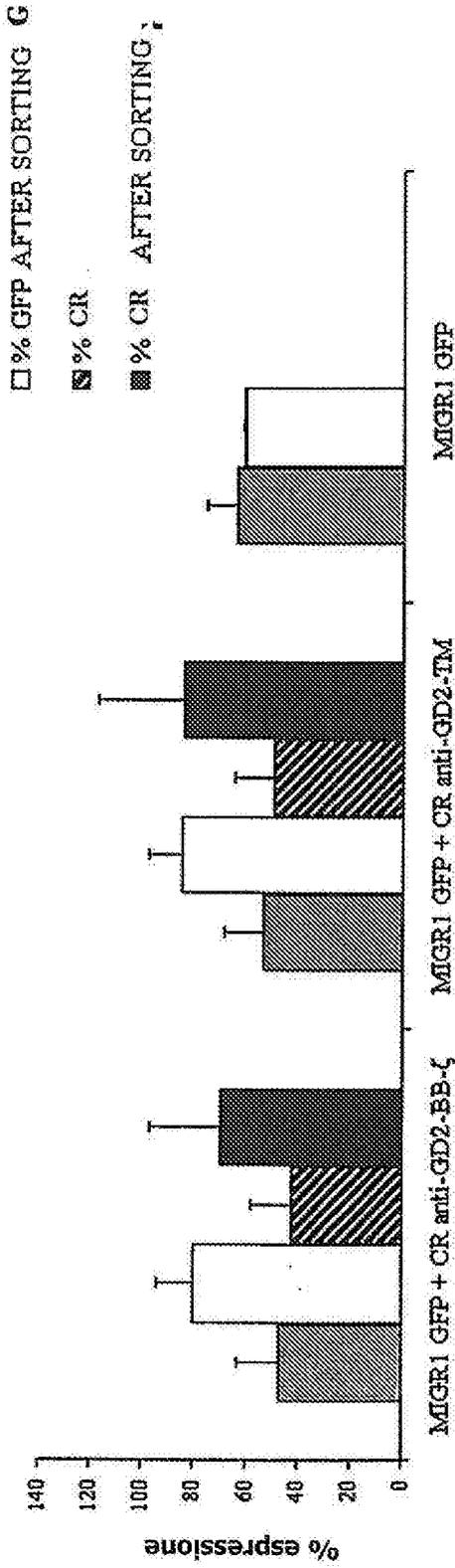
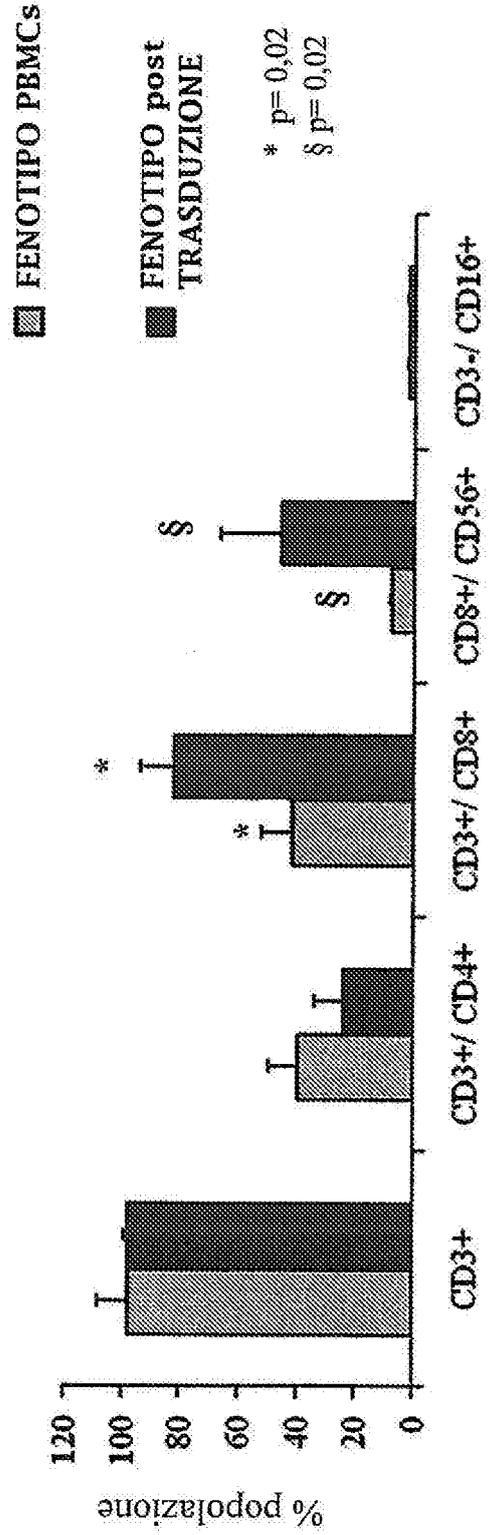


Fig.7



FENOTIPO CELLULE EFFETTRICI



[Handwritten signature]

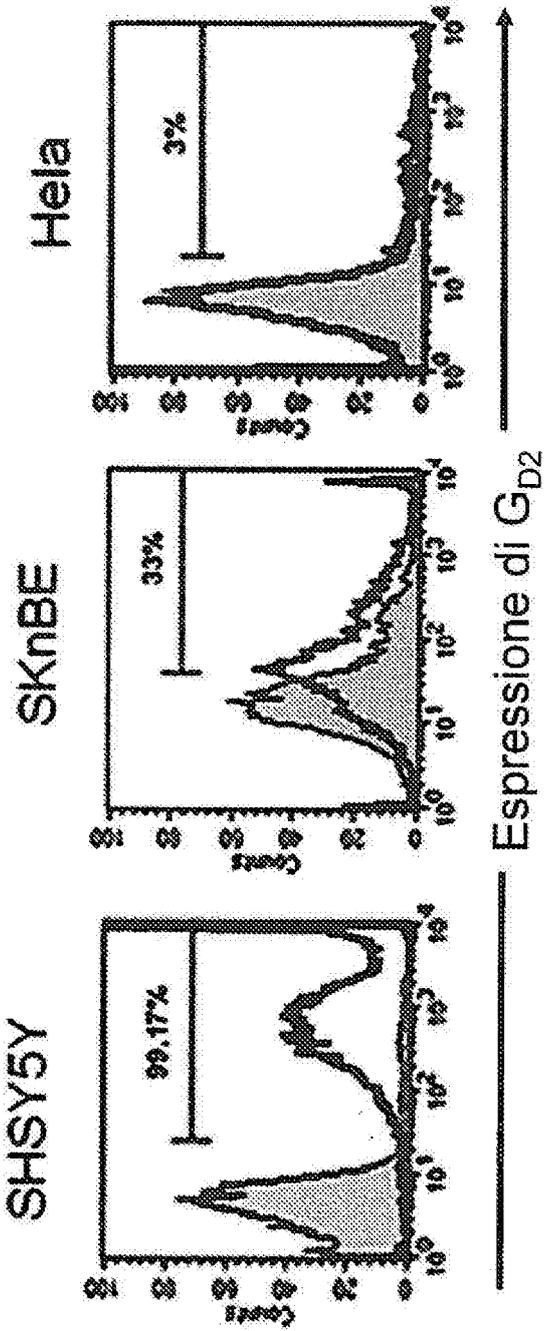


Fig.8

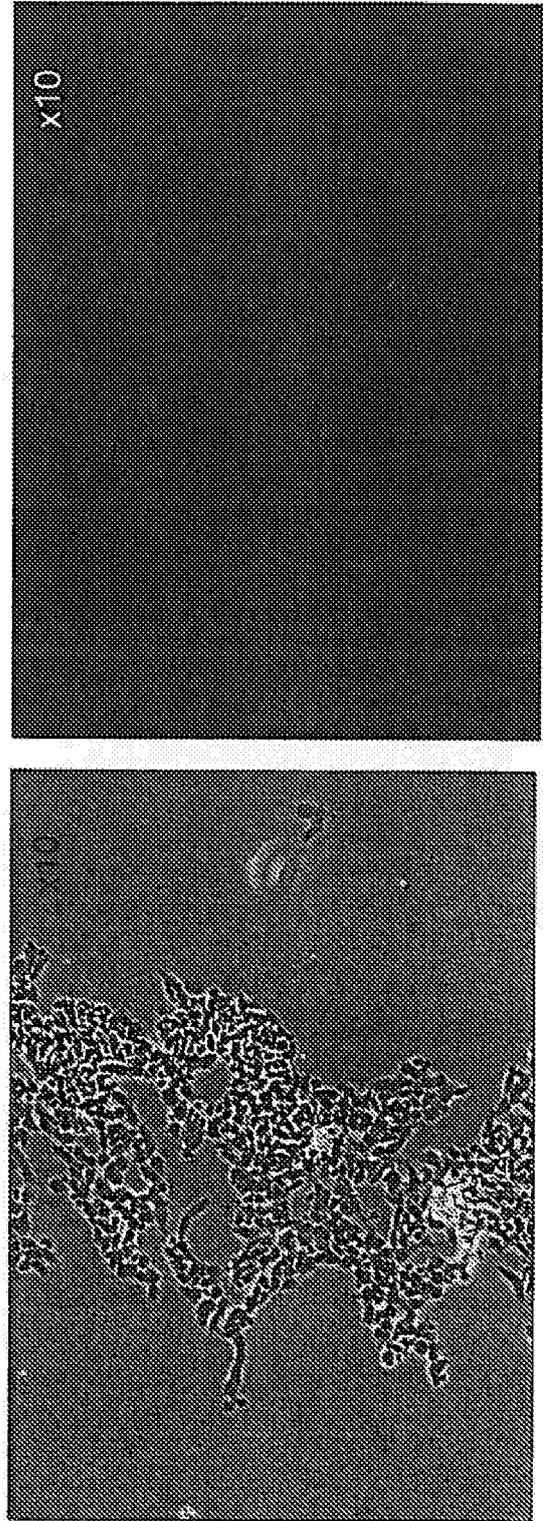


Fig.9



[Handwritten signature]

TEST DI CITOSSICITA' ESEGUITO CON IL Cr-51
CO-CULTURE CON RAPPORTO E:T= 20:1 (4h)

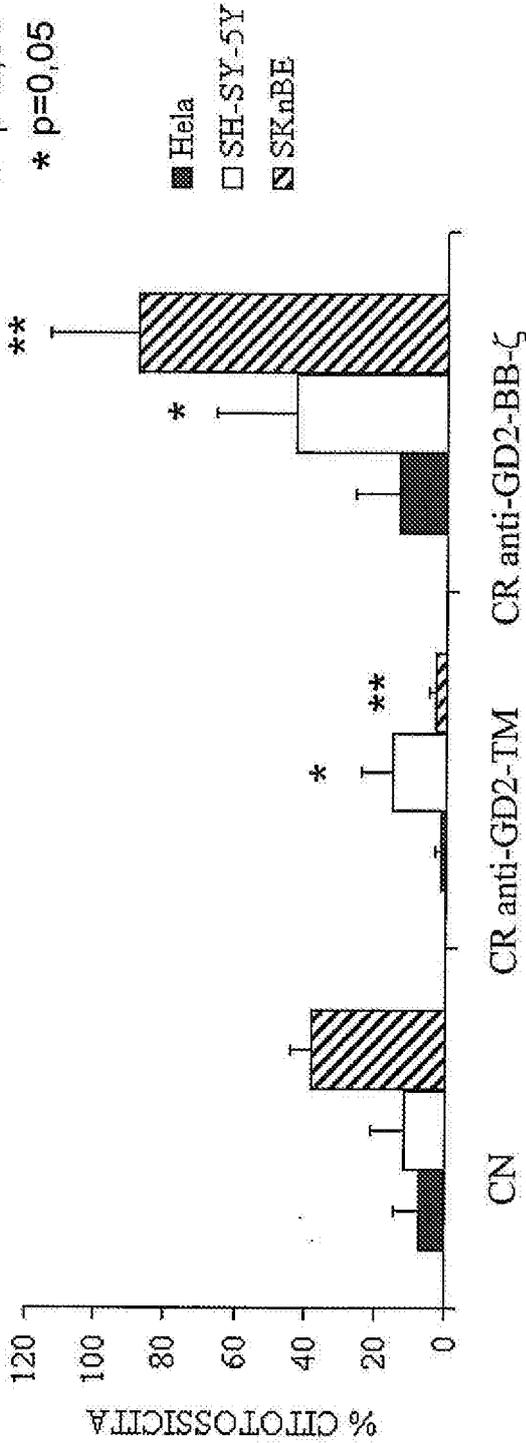


Fig.10

ESPRESSIONE DI GD2 DOPO CO-CULTURA A LUNGO TERMINE (6 GIORNI)
RAPPORTO EFFETTORE TARGET E:T= 5:1

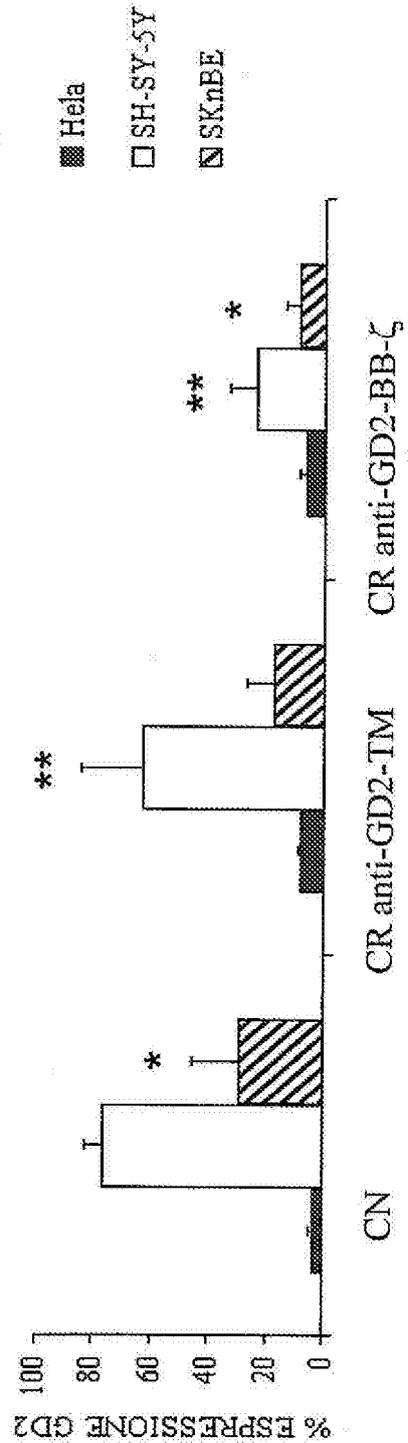


Fig.11



[Handwritten signature]

Fig.12



Consorzio Industriale in Proprietà n. 4308M
S. BERGAMINI - FARMACIA
Management and European Treatment