

DOMANDA DI PARTECIPAZIONE

1 TITOLO DEL PROGETTO

PEPTIDI CHE MIMANO L'ANTIGENE CD20: POTENZIALITÀ TERAPEUTICHE NEL LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO

1.1 RESPONSABILE SCIENTIFICO

VITO RACANELLI

Ricercatore presso l'unità operativa di Medicina Interna

Università degli Studi di BARI ALDO MORO

Dipartimento di SCIENZE BIOMEDICHE ED ONCOLOGIA UMANA, sezione di Medicina Interna

0805478050

(Prefisso e telefono)

0805478050

(Numero fax)

v.racanelli@dimo.uniba.it

1.2 ELENCO DEI COLLABORATORI ALLE UNITÀ DI RICERCA

PEROSA Federico, Professore Ordinario, Unità di Reumatologia

PRETE Marcella, Ricercatore confermato, Unità di Medicina Interna

FAVOINO Elvira, Assegnista di ricerca, Unità di Reumatologia

LEONE Patrizia, Assegnista di ricerca, Unità di Medicina Interna

DIGIGLIO Liboria, Dottoranda di ricerca, Unità di Reumatologia

Ruolo di ciascuna unità operativa in funzione degli obiettivi previsti e relative modalità di integrazione e collaborazione

Il progetto sarà svolto dall'unità operativa di Medicina Interna (Racanelli, Prete e Leone) e dall'unità di Reumatologia (Perosa, Favoino, Digiglio) entrambe afferenti al dipartimento di Scienze Biomediche, che elaboreranno una strategia di immunoterapia in un modello murino di lupus eritematoso sistemico (LES) mediante immunizzazione con peptidi. Le unità cercheranno di valutare tale ipotesi con la caratterizzazione dell'immunogenicità di 11 peptidi ciclici che esprimono il motif antigenico Rituximab-specifico, ma che differiscono per gli aminoacidi al di fuori del motif.

I ruoli dei singoli componenti di queste unità di ricerca sono elencati qui di seguito, in funzione degli obiettivi previsti:

- Identificazione di uno o più peptidi in grado di indurre una risposta CD20-specifica mediante: 1. preparazione degli immunogeni; 2. immunizzazione degli animali; 3. raccolta dei sieri e analisi degli stessi (*Favoino, Digiglio, Prete, Racanelli, Perosa*).
- Identificazione di criteri predittivi di una maggiore o minore immunogenicità degli aminoacidi del peptide che fiancheggiano il motif: 1. analisi degli anticorpi peptide-indotti con librerie fagiche (*Digiglio, Favoino, Prete, Perosa*).

- Identificazione e caratterizzazione funzionale di linfociti T CD4+ peptide/tetrameri-specifici: 1. analisi della risposta cellulo-mediata peptide-indotta mediante isolamento di linfociti CD4+ peptide/tetrameri specifici (*Leone, Favoino, Prete, Racanelli*).
- Identificazione di uno o più peptidi efficaci nel ritardare l'evoluzione di malattia in topi lupici: 1. immunizzazione degli animali; 2. monitoraggio del titolo degli anticorpi anti-DNA; 3. monitoraggio della proteinuria; 4. esame istopatologico; 5. valutazione statistica della sopravvivenza (*Favoino, Digiglio, Leone, Racanelli, Perosa*).
- Raccolta dei dati, interpretazione dei risultati e preparazione dei manoscritti (*Favoino, Prete, Racanelli, Perosa*).

Pubblicazioni dei componenti il gruppo di ricerca

DR. VITO RACANELLI

- PEROSA F, PRETE M, **RACANELLI V**, DAMMACCO F. CD20-depleting therapy in autoimmune diseases: from basic research to the clinic. JOURNAL OF INTERNAL MEDICINE, vol. 267(3); p. 260-277, ISSN: 0954-6820, (2010).
- PEROSA F, FAVOINO E, VICENTI C, GUARNERA A, **RACANELLI V**, DE PINTO V, DAMMACCO F. Two structurally different rituximab-specific CD20 mimotope peptides reveal that rituximab recognizes two different CD20-associated epitopes. JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 182; p. 416-423, ISSN: 0022-1767, (2009).
- **RACANELLI V**, PRETE M, MINOIA C, FAVOINO E, PEROSA F. Rheumatic disorders as paraneoplastic syndromes. AUTOIMMUNITY REVIEWS, vol. 7; p. 352-358, ISSN: 1568-9972, (2008).
- **RACANELLI V**, REHERMANN B. The liver as an immunological organ. HEPATOLOGY, vol. 43 (2 Suppl 1); p. S54-S62, ISSN: 0270-9139, (2006).
- **RACANELLI V**, BEHRENS SE, ALIBERTI J, REHERMANN B. Dendritic cells transfected with cytopathic self-replicating RNA induce cross-priming of CD8+ T cells and antiviral immunity. IMMUNITY, vol. 20; p. 47-58, ISSN: 1074-7613, (2004).
- DAMMACCO F, DELLA CASA ALBERIGHI O, FERRACCIOLI G, **RACANELLI V**, CASATTA L, BARTOLI E. Cyclosporine-A plus steroids, versus steroids alone, in the 12-month treatment of systemic lupus erythematosus. INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL & LABORATORY RESEARCH, vol. 30; p. 67-73, ISSN: 0940-5437, (2000).
- DAMMACCO F, GATTI P, **RACANELLI V**. Vasculiti polmonari. In: DAMMACCO F, BAFFI F, OLIVIERI D. Il Punto su Malattie interstiziali del polmone: patologia d'organo e sistemica. p. 133-160, FIRENZE: Scientific Press, (2000).

PROF. FEDERICO PEROSA

- RACANELLI V, PRETE M, MUSARAJ G, DAMMACCO F, **PEROSA F**. Autoantibodies to intracellular antigens: Generation and pathogenetic role. Autoimmun Rev 2011; 10:503-8.
- **PEROSA F.**, PRETE M, RACANELLI V, DAMMACCO F (2010). CD20-depleting therapy in autoimmune diseases: from basic research to the clinic. JOURNAL OF INTERNAL MEDICINE, vol. 267; p. 260-277, ISSN: 0954-6820
- **PEROSA F.**, FAVOINO E, VICENTI C, GUARNERA A, RACANELLI V, DE PINTO V, DAMMACCO F (2009). Two Structurally Different Rituximab-Specific CD20 Mimotope Peptides Reveal That Rituximab Recognizes Two Different CD20-

Associated Epitopes. JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 182; p. 416-423,ISSN: 0022-1767

- RACANELLI, V, PRETE M, MINOIA C, FAVOINO E, **PEROSA F.** (2008). Rheumatic disorders as paraneoplastic syndromes. AUTOIMMUNITY REVIEWS, vol. 7; p. 352-358, ISSN: 1568-9972
- **PEROSA F.**, FAVOINO E, VICENTI C, MERCHIONNE F AND DAMMACCO F (2007). Identification of an Antigenic and Immunogenic Motif Expressed by Two 7-Mer Rituximab-Specific Cyclic Peptide Mimotopes: Implication for Peptide-Based Active Immunotherapy. JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 179; p. 7967-7974, ISSN: 0022-1767
- **PEROSA F.**, F., FAVOINO, E., CARAGNANO, M.A., DAMMACCO, F. (2006). Generation of biologically active linear and cyclic peptides has revealed a unique fine specificity of rituximab and its possible cross-reactivity with acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3B precursor. BLOOD, vol. 1007; p. 1070-1077, ISSN: 0006-4971
- **PEROSA F.**, FAVOINO, E., CARAGNANO, M.A., DAMMACCO, F. (2005). CD20 mimicry by mAb Rituximab-specific linear peptide. A potential tool for active immunotherapy of autoimmune diseases. ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES, vol. 1051; p. 672-683, ISSN: 0077-8923

DR.SSA MARCELLA PRETE

- RACANELLI V, **PRETE M**, MINOIA C, FAVOINO E, PEROSA F. Rheumatic disorders as paraneoplastic syndrome. AUTOIMMUNITY REVIEWS,ISSN: 1568-9972, (2008).
- PEROSA F, FAVOINO E, CARAGNANO M, **PRETE M**, DAMMACCO F. CD20: a target antigen for immunotherapy of autoimmune diseases. AUTOIMMUNITY REVIEWS, vol. 4 (8); p. 526-531, ISSN: 1568-9972, (2005).
- **PRETE M**, PEROSA F, FAVOINO E, DAMMACCO F. Biological therapy with monoclonal antibodies: a novel approach to autoimmune disease, (2005).
- PEROSA F, LUCCARELLI G, **PRETE M**, FAVOINO E, FERRONE S, DAMMACCO F. Beta 2-microglobulin-free HLA class I heavy chain epitope mimicry by monoclonal antibody HC-10-specific peptide. JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Aug 15;171(4):1918-26, (2003).
- PEROSA F, **PRETE M**, LUCCARELLI G, DAMMACCO F. Anticorpi monoclonali nell'immunoterapia delle malattie autoimmuni. In: EMMI L.,CHIARINI F.. Strategie immunosoppressive nelle malattie autoimmuni e nel trapianto d'organo. vol. 1, p. 229-250, FIRENZE: Rosini Editrice S.r.l., (2002).
- PEROSA F, LUCCARELLI G, **PRETE M**, DAMMACCO F. Monoclonal antibodies (mAb) in the immunotherapy (IT) of autoimmune disease (AD).ANNALI ITALIANI DI MEDICINA INTERNA, vol. 16; p. 220-232, ISSN: 0393-9340, (2001).
- PEROSA F, LUCCARELLI G, **PRETE M**, INDIVERI F, DAMMACCO F. Human CD4 internal antigen anti-idiotypic monoclonal antibody. Immunochemical and sequence analysis. CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 2; p. 81-89, ISSN: 1591-8890, (2001).
- PEROSA F, **PRETE M**, LUCCARELLI G, DAMMACCO F. Anticorpi monoclonali nell'immunoterapia delle malattie autoimmuni. In: NOVARTIS. Strategie Immunosoppressive nelle malattie autoimmuni e nel trapianto d'organo. p. 229-290, BARI, (2001).
- PEROSA F, **PRETE M**, LUCCARELLI G, FAVOINO B, FERRONE S, DAMMACCO F. Serum levels of β 2-microglobulin-free heavy chain of HLA class I

antigen in healthy individuals: relationship to their class I allotype. HUMAN IMMUNOLOGY, vol. 60; p. 1058-1066, ISSN: 0198-8859, (1999).

- DAMMACCO F, PEROSA F, RIZZI R, SANSONNO D, SILVESTRIS F, VACCA A, con la collaborazione di BRUNO S, FRASSANITO A, GATTI P, IURLARO M, LAULETTA G, LUCCARELLI G, MINISCHETTI M, PELLEGRINO A, **PRETE M**, RACANELLI V, RIA R, SILVESTRIS N, TUCCI M. Vasculiti primarie sistemiche. ATTI DELLA SOCIETA' ITALIANA DI MEDICINA INTERNA, BARI, vol. 105, p. 523-539, (1998).

ELVIRA FAVOINO

- PEROSA F, **FAVOINO E**, VICENTI C, GUARNERA A, RACANELLI V, DE PINTO V, DAMMACCO F. Two structurally different rituximab-specific CD20 mimotope peptides reveal that rituximab recognizes two different CD20-associated epitopes. JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Jan 1;182(1):416-23, (2009).
- RACANELLI V, PRETE M., MINOIA C, **FAVOINO E**, PEROSA F. Rheumatic disorders as paraneoplastic syndrome. AUTOIMMUNITY REVIEWS,ISSN: 1568-9972, (2008).
- PEROSA F, **FAVOINO E**, VICENTI C, MERCHIONNE F, DAMMACCO F. Identification of an antigenic and immunogenic motif expressed by two 7-mer rituximab-specific cyclic peptide mimotopes: implication for peptide-based active immunotherapy. JOURNAL OF IMMUNOLOGY Dec 1;179(11):7967-74, (2007).
- D'AMORE M, MINENNA G, **FAVOINO E**, D'AMORE S. J IMMUNOL. Phlegmonous abscess associated with etanercept therapy. JOURNAL OF IMMUNOLOGY. Sep;48(3):199-200, (2006).
- PRETE M., PEROSA F, **FAVOINO E**, DAMMACCO F. Biological therapy with monoclonal antibodies: a novel approach to autoimmune disease. CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE,5: 141-160, (2005).
- PEROSA F, **FAVOINO E**, CARAGNANO MA, DAMMACCO F. J IMMUNOL. Generation of biologically active linear and cyclic peptides has revealed a unique fine specificity of rituximab and its possible cross-reactivity with acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3b precursor. BLOOD Feb 1;107(3):1070-7. Epub 2005 Oct 13, (2006).
- PEROSA F, **FAVOINO E**, CARAGNANO M, PRETE M., DAMMACCO F. CD20: a target antigen for immunotherapy of autoimmune diseases. AUTOIMMUNITY REVIEWS, vol. 4 (8); p. 526-531, ISSN: 1568-9972, (2005).
- PEROSA F, **FAVOINO E**, CARAGNANO MA, DAMMACCO F. CD20 mimicry by a mAb rituximab-specific linear peptide: a potential tool for active immunotherapy of autoimmune diseases. ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES. Jun;1051:672-83, (2005).
- PEROSA F, **FAVOINO E**, CARAGNANO MA, DAMMACCO F. Human CD4 mimicry by anti-idiotypic monoclonal antibody 16D7 is based on a conformational epitope. IMMUNOLOGY LETTERS. Sep;95(2):145-53, (2004).
- PEROSA F, LUCCARELLI G, PRETE M, **FAVOINO E**, FERRONE S, DAMMACCO F. Beta 2-microglobulin-free HLA class I heavy chain epitope mimicry by monoclonal antibody HC-10-specific peptide. JOURNAL OF IMMUNOLOGY. Aug 15;171(4):1918-26, (2003).

LEONE PATRIZIA

- RACANELLI V, FRASSANITO MA, **LEONE P**, BRUNETTI C, RUGGIERI S, DAMMACCO F. Bone Marrow of persistently hepatitis C virus-infected individuals accumulates memory CD8+ T cells specific for current and historical viral antigens: a

study in patients with benign hematological disorders. JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 179(8); p. 5387-5398, ISSN: 0022-1767, (2007).

- RACANELLI V, FRASSANITO MA, **LEONE P**, GALIANO M, DE RE V, SILVESTRIS F, DAMMACCO F. Antibody production and in vitro behavior of CD27-defined B-cell subsets: persistent hepatitis C virus infection changes the rules. JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 80(8); p. 3923-3934, ISSN: 0022-538X, (2006).

LIBORIA DIGIGLIO

- PRETE, M., V. RACANELLI, **L. DIGIGLIO**, A. VACCA, F. DAMMACCO, AND F. PEROSA. Extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis: An update. **Autoimmun. Rev.** doi:10.1016/j.autrev.2011.09.001:2011. **IF: 6.5.**

1.3 CONSENSO AL TRATTAMENTO DEI PROPRI DATI

Si fornisce il consenso al trattamento dei propri dati personali, ai sensi della legge n. 196/2003, per tutto quanto connesso alla gestione del presente bando.

2 TITOLO DEL PROGETTO

PEPTIDI CHE MIMANO L'ANTIGENE CD20: POTENZIALITA' TERAPEUTICHE NEL LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO

2.1 PREMESSE ED OBIETTIVI DELLO STUDIO

Il lupus eritematoso sistemico (LES) è la malattia autoimmune per eccellenza ed è caratterizzato dalla presenza di autoanticorpi che possono essere potenzialmente diretti contro ogni organo o apparato, sebbene la cute, i reni, le sierose, i vasi ed il sistema nervoso centrale siano i bersagli elettivi di tale autoaggressione. Il decorso della malattia è spesso imprevedibile e, sebbene diversi farmaci (corticosteroidi e immunosoppressori) siano disponibili per il suo trattamento, nessuno di essi è in grado di *curare* il LES. Infatti, la malattia è ancora associata ad un' elevata morbilità e può talora avere esito fatale. Inoltre, nonostante la recente introduzione dell' anticorpo monoclonale Belimumab nell' armamentario terapeutico di questa malattia, non è nota la sua efficacia nelle forme più gravi di LES (nefrite lupica, neuro-LES), poiché gli studi clinici controllati che hanno portato alla sua approvazione da parte della Food and Drug Administration (FDA) non comprendevano pazienti con nefrite attiva o con manifestazioni cerebrali.

Pertanto, l'identificazione di nuove e più efficaci forme di terapia rappresenta un obiettivo di ovvia importanza ed altamente auspicabile. L' anticorpo monoclonale (AcMo) chimerico anti-CD20, denominato Rituximab, è stato approvato dalla FDA per il trattamento dei linfomi (1) e dell' artrite reumatoide (2).

L'attenzione degli immunologi clinici si è incentrata su tale anticorpo anche per i promettenti risultati ottenuti nel trattamento di patologie autoimmuni diverse dall' artrite reumatoide (3), tra le quali il LES, in studi clinici non controllati (4). Sebbene uno studio clinico controllato, conclusosi di recente (studio LUNAR), abbia dimostrato la non superiorità di Rituximab più Micofenolato mofetile contro il solo Micofenilato mofetile, tale studio ha comunque indotto la convinzione che la terapia anti-CD20 debba essere ancora considerata in studi di seconda generazione che tengano conto di alcune variabili, quali il polimorfismo dei recettori FcγRIII e l'etnia. Infatti, nello studio LUNAR i pazienti non caucasici sono risultati percentualmente molto più responsivi al Rituximab rispetto ai pazienti caucasici. Queste osservazioni, insieme alla descrizione aneddotica di un' efficace azione di Rituximab in pazienti con nefrite refrattaria, sottolineano come la terapia anti-CD20 possa ancora svolgere un ruolo non trascurabile in tale settore di patologia.

Tuttavia, da tali studi è emerso che, per garantire la remissione clinica di malattia, sono necessarie periodiche infusioni di Rituximab, che espongono il paziente al rischio di reazioni di ipersensibilità e/o anafilassi. Infatti, uno studio su pazienti affetti da artrite reumatoide ha mostrato che il 40% circa dei pazienti, che inizialmente aveva risposto al Rituximab, è stato costretto ad interrompere il trattamento per le suddette ragioni (5).

Un approccio alternativo alla immunoterapia passiva (IP) con Rituximab è l' immunoterapia attiva (IA), che consiste in una stimolazione del sistema immune del paziente inducendolo a sviluppare una risposta anti-CD20. L'IA potrebbe rappresentare un metodo più agevole e affidabile per controllare la malattia, risparmiando al paziente la somministrazione cronica di AcMo. Tuttavia, l'IA è stata inizialmente limitata dalla difficoltà pratica di ottenere antigeni purificati e dalla tolleranza del sistema immune verso la maggior parte delle molecole considerate come bersaglio dell' IP. Inoltre, il rischio di una risposta immune più difficilmente controllabile rispetto a quella associata occasionalmente all' IP ha in qualche

modo scoraggiato lo sviluppo di ulteriori e più adeguati studi clinici. In passato, le strategie di IA adottate hanno previsto l'uso di molecole denominate 'mimotopi' (peptidi o anticorpi anti-idiotipo), che mimano antigeni utilizzati con successo nell'IP (6-9).

Partendo da queste osservazioni relative al sistema CD20, è evidente come un vaccino contenente un peptide che mima l'epitopo del dominio extracellulare del CD20 sia in grado di indurre una risposta attiva con effetti biologici simili a quelli osservati dopo somministrazione passiva di anticorpi anti-CD20, ma con tre indubbi vantaggi: a) è richiesta una minore quantità di immunogeno; b) è consentito un più lungo intervallo temporale fra un'iniezione e l'altra; c) a differenza dell'IP, è indispensabile una risposta immune cellulare e umorale per ottenere l'effetto terapeutico e, in quanto policlonale, tale risposta è efficace nel reclutamento delle cellule effettrici più di quanto lo sia un AcMo in corso di IP.

Robert et al. (12) hanno dimostrato che è possibile contrastare la tolleranza verso il CD20 usando peptidi di 42 aminoacidi (AA), coniugati con keyhole limpet hemocyanin (KLH), corrispondenti a tutto il dominio extracellulare di CD20 murino e umano (AA 142-182). Tuttavia, tale strategia è stata limitata dall'abnorme lunghezza del peptide usato, che può verosimilmente assumere una configurazione tridimensionale diversa da quella che assume la proteina nativa, con conseguente smascheramento o esposizione di nuovi epitopi. Infatti, i sieri ottenuti da topi immunizzati legavano debolmente il CD20 nativo, nonostante fossero molto reattivi verso il peptide usato per l'immunizzazione. L'eterogeneità della specificità della popolazione anticorpale era anche supportata dalla reattività crociata degli anticorpi anti-CD20 umano con il peptide derivato dal CD20 murino. A simili conclusioni sono giunti Huang e collaboratori (13) con i risultati ottenuti nei topi. Questi autori hanno usato una proteina di fusione contenente tutto il dominio extracellulare del CD20 murino unito al frammento Fc di immunoglobulina (Ig) di specie diversa.

Per superare tali limiti e per indirizzare la risposta anti-peptide verso l'antigene nominale, il nostro gruppo ha recentemente caratterizzato 11 peptidi ciclici di 7 AA ciascuno, specifici per Rituximab. Tutti i peptidi esprimono il motif A/SNPS Rituximab-specifico. Tale motif è omologo alla porzione 170ANPS173 del dominio extracellulare del CD20 (12). In particolare, Rp15-C (uno degli undici peptidi) può indurre anticorpi anti-CD20 con specifici effetti citotossici, simili a quelli osservati con Rituximab (12). Tuttavia, anche usando un peptide più piccolo, come in questo caso, si osservava che il titolo di anticorpi anti-peptide era molto più elevato del titolo degli anticorpi anti-CD20, suggerendo che solo una piccola parte di anticorpi anti-peptide reagiva con il CD20 (12). Una successiva caratterizzazione della fine specificità degli anticorpi anti-Rp15-C ha infatti dimostrato che solo una piccola parte di tali anticorpi anti-peptide riconosceva il motif ANPS (CD20), mentre i rimanenti anticorpi erano specifici per gli AA posti fuori dal motif antigenico (15).

La disponibilità di un pannello di 11 peptidi specifici, dotati di una stessa proprietà antigenica (tutti reattivi verso Rituximab) ma diversi per la sequenza aminoacidica che circonda il motif, rappresenta una opportunità unica per studiare i dettagli biologici e molecolari della risposta immune indotta dagli stessi, nonché delle modalità con le quali le proprietà chimiche degli AA che fiancheggiano il motif possono influenzare il grado di specificità degli anticorpi verso A/SNPS. Inoltre, la comprensione dei meccanismi biologici che sottendono la risposta anti-CD20 peptide-indotta è indispensabile quando si vogliono stabilire nuove strategie per una più efficace IT in tutti i settori clinici interessati dalla vaccinoterapia con peptidi. L'obiettivo principale di questo progetto è pertanto quello di definire una strategia di vaccinoterapia finalizzata ad indurre una risposta immune specifica verso il motif ANPS del peptide, utilizzando tale protocollo per ritardare l'insorgenza o la progressione del LES in modelli murini.

Per saggiare tale ipotesi, si useranno i peptidi in singolo, in combinazione o sequenzialmente con differenti protocolli. Una volta identificata la strategia più efficace, e

con la finalità di valutarne l'utilità in un modello murino di patologia lupica, la prolina del motif A/SNPS del peptide/i selezionato sarà sostituita con la serina, in modo da avere peptidi (mCD20) che esprimono il motif A/SNSS (controparte murina dell'epitopo umano di CD20 riconosciuto da Rituximab).

Le fasi specifiche del presente progetto sono le seguenti:

- Identificare il/i peptide/i più efficace/i nello stimolare una risposta anti-CD20 umano (A/SNPS).
- Disegnare e sintetizzare il peptide mCD20 corrispondente e valutare la sua capacità di indurre una risposta specifica anti-mCD20 in topi BALB/c.
- Valutare l'efficacia del mCD20 nel controllare la malattia simil-lupica in topi BWF1 predisposti a sviluppare tale patologia.

Se portato a termine con successo, tale approccio potrà essere traslato al trattamento della patologia lupica umana, utilizzando il o i peptidi che esprimono il motif hCD20 A/SNPS.

Bibliografia

1. Leget GA, Czuczman MS: Use of rituximab, the new FDA-approved antibody. *Curr Opin Oncol* 10:548, 1998.
2. Edwards JC, Szczepanski L, Szechinski J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, Close DR, Stevens RM, Shaw T: Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 350:2572, 2004.
3. Weide R, Heymanns J, Pandorf A, Koppler H: Successful long-term treatment of systemic lupus erythematosus with rituximab maintenance therapy. *Lupus* 12:779, 2003.
4. Looney RJ, Anolik J, Sanz I: Treatment of SLE with anti-CD20 monoclonal antibody. *Curr Dir Autoimmun* 8:193, 2005.
5. Perosa F, Favoino E, Caragnano MA, Prete M, Dammacco F: CD20: A target antigen for immunotherapy of autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 4:526, 2005.
6. St Clair EW, Cohen SB, Lee ML, Fleischmann RM, Lee SH, Moreland LW, Olsen NJ, Pratt PW, Yocum DE, Heck L, Winkelhake J, Holcenberg JS, Shulman MJ: Treatment of rheumatoid arthritis with a DR4/1 peptide. *J Rheumatol* 27:1855, 2000.
7. Perosa F, Luccarelli G, Scudeletti M, Cutolo M, Indiveri F, Dammacco F: Assessment of safety and the immune response to the CD4 "internal antigen" mouse anti-idiotypic Mab 16D7 in four patients with SLE. *J Clin Immunol* 22:13, 2002.
8. Anolik JH, Barnard J, Owen T, Zheng B, Kemshetti S, Looney RJ, Sanz I: Delayed memory B cell recovery in peripheral blood and lymphoid tissue in systemic lupus erythematosus after B cell depletion therapy. *Arthritis Rheum* 56:3044, 2007.
9. Popa C, Leandro MJ, Cambridge G, Edwards JC: Repeated B lymphocyte depletion with rituximab in rheumatoid arthritis over 7 yrs. *Rheumatology (Oxford)* 46:626, 2007.
10. Moreland LW, Morgan EE, Adamson TC, III, Fronek Z, Calabrese LH, Cash JM, Markenson JA, Matsumoto AK, Bathon J, Matteson EL, Uramoto KM, Weyand CM, Koopman WJ, Heck LW, Strand V, Diveley JP, Carlo DJ, Nardo CJ, Richieri SP, Brostoff SW: T cell receptor peptide vaccination in rheumatoid arthritis: a placebo-controlled trial using a combination of Vbeta3, Vbeta14, and Vbeta17 peptides. *Arthritis Rheum* 41:1919, 1998.
11. Bynoe MS, Evans JT, Viret C, Janeway CA, Jr.: Epicutaneous immunization with autoantigenic peptides induces T suppressor cells that prevent experimental allergic encephalomyelitis. *Immunity* 19:317, 2003.
12. Roberts WK, Livingston PO, Agus DB, Pinilla-Ibarz J, Zelenetz A, Scheinberg DA: Vaccination with CD20 peptides induces a biologically active, specific immune response in mice. *Blood* 99:3748, 2002.

13. Huang J, Sheu JJ, Wu SC, Chang TW: Down regulation of B cells by immunization with a fusion protein of a self CD20 peptide and a foreign IgG Fc fragment. *Immunol Lett* 81:49, 2002.
14. Perosa F, Favoino E, Caragnano MA, Dammacco F: Generation of biologically active linear and cyclic peptides has revealed a unique fine specificity of rituximab and its possible cross-reactivity with acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3b precursor. *Blood* 107:1070, 2006.
15. Perosa F, Favoino E, Vicenti C, Merchionne F, Dammacco F: Identification of an antigenic and immunogenic motif expressed by two 7-mer rituximab-specific cyclic peptide mimotopes: implication for peptide-based active immunotherapy. *J Immunol* 179:7967, 2007.

2.2 RICADUTE CLINICHE

Il LES rappresenta indiscutibilmente il prototipo di malattia autoimmune. Come abbiamo già ricordato, ancora oggi la malattia ha un'elevata morbilità e mortalità e, nonostante la disponibilità di farmaci che controllano i sintomi, ritardano la progressione e/o migliorano la qualità di vita, essi non hanno effetti curativi. L'obiettivo a medio-lungo termine del nostro programma di ricerca è di sviluppare un'immunoterapia attiva per il LES, consistente nell'induzione di una risposta immune anti-CD20 mediante somministrazione di peptidi. Tale vaccino dovrebbe essere in grado di prevenire o almeno ritardare la progressione del LES nel modello murino. Le informazioni ottenute da questo studio potrebbero suggerire nuovi approcci terapeutici nei pazienti con LES.

2.3 METODOLOGIE

2.3.1 ANIMALI e MATERIALI

2.3.1.1 - Animali. Topi BALB/c di 8-12 settimane e NZB/NZW (BWF1) saranno acquistati da Charles River (Como, Italia).

2.3.1.2 - Peptidi. *Le sequenze degli 11 peptidi ciclici di 7 amino acidi (AA) che mimano l'epitopo CD20 riconosciuto da Rituximab sono state precedentemente descritte (1).*

Questi peptidi saranno denominati hCD20 perché esprimono l'epitopo del CD20 umano riconosciuto da Rituximab (A/SNSS). Per saggiarne l'efficacia in modelli murini di malattia lupica, i peptidi saranno sintetizzati sostituendo la prolina con la serina nella sequenza A/SNPN, in modo da avere il motif A/SNSS, controparte murina del CD20 umano riconosciuto da Rituximab. Tali peptidi saranno denominati mCD20.

2.3.2 IDENTIFICAZIONE DI PEPTIDI hCD20 PIÙ EFFICACI NELL'INDURRE LA RISPOSTA ANTI-CD20 (A/SNPS).

Abbiamo dimostrato che anche su un peptide di soli 7 AA, gli AA che fiancheggiano il motif possono risultare più immunogenici di quelli posti all'interno (2). In questo caso, la risposta immune anti-peptide non sarà diretta contro il motif A/SNPS e quindi verso l'epitopo di CD20 riconosciuto da Rituximab. Ci proponiamo di verificare l'ipotesi secondo la quale è possibile espandere la popolazione anticorpale specifica per il motif antigenico A/SNPS del peptide mediante l'analisi della loro immunogenicità in topi BALB/c. I peptidi saranno usati per l'immunizzazione singolarmente, in sequenza ovvero miscelati. La specificità dei sieri anti-peptide si valuterà con test sierologici in fase solida, su cellule e a livello molecolare. Per quest'ultima analisi, le immunoglobuline (Ig) purificate dal siero saranno saggiate con una libreria fagica. La percentuale di sequenze dei cloni fagici Ig-specifici che esprimono A/SNPS

darà una stima della proporzione di anticorpi anti-peptide che riconoscono CD20. Dai topi immunizzati con il singolo peptide sarà possibile ottenere ulteriori informazioni relative alle modalità con le quali le proprietà chimiche degli AA che fiancheggiano il motif influenzano la specificità degli Ac anti-A/SNPS.

2.3.2.1 - Immunizzazione. Senza carriers, i peptidi non sono immunogenici. Pertanto, essi saranno coniugati con KLH in presenza di glutaraldeide, come precedentemente descritto (1). Si utilizzerà una procedura simile per coniugare i peptidi ad albumina sierica bovina (BSA). I peptidi coniugati a BSA saranno utilizzati in test in fase solida.

Un gruppo di 4 topi Balb/c sarà usato per ciascun peptide o per combinazioni di peptidi. La prima immunizzazione e tre richiami saranno eseguiti a distanza di una settimana ciascuna, mediante iniezione intraperitoneale di 1 µg di peptide-KLH in adiuvante di Freund incompleto. Le dosi di peptide e i tempi di immunizzazione sono stati selezionati in precedenti esperimenti (3) perché ritenuti soddisfacenti per indurre anticorpi anti-CD20. Si eseguirà il prelievo ematico prima della seconda e terza immunizzazione e ogni settimana sino all'ottava. In seguito, gli animali saranno sacrificati per il prelievo degli splenociti.

2.3.2.2 - Immunizzazione con singolo peptide per selezionare quello/quelli capace/i di indurre la più efficace risposta anti-A/NPS (hCD20). Undici gruppi di topi (4 topi per gruppo) saranno immunizzati ciascuno con un singolo peptide. Un ulteriore gruppo di topi riceverà un peptide irrilevante di controllo Qp1-a (4). I sieri ottenuti con ciascun prelievo saranno valutati per la presenza di anticorpi anti-peptide e anti-CD20. I peptidi che indurranno più consistentemente anticorpi anti-CD20 ovvero che indurranno anticorpi anti-CD20 nella più elevata percentuale di topi in ogni gruppo saranno selezionati per essere utilizzati in altre procedure di immunizzazione.

2.3.2.3 - Immunizzazione sequenziale ovvero con miscele di peptidi. Al fine di poter espandere la popolazione anticorpale specifica per il motif antigenico A/SNPS, si utilizzeranno i peptidi risultati più efficaci in sequenza: peptide 1 il giorno 0, peptide 2 il giorno 7, peptide 3 il giorno 14 e peptide 4 il giorno 21. Se i peptidi selezionati fossero 2, allora l'immunizzazione dei giorni 14 e 21 sarà eseguita con il peptide 1 (giorno 14) e 2 (giorno 21). Se il titolo della risposta anti-CD20 fosse simile a quello ottenuto utilizzando i singoli peptidi, si considererà una strategia immunologica alternativa, consistente nell'inoculare una miscela di peptidi tra quelli selezionati alla dose finale di 1 µg per inoculo. Il tempo di inoculazione e di prelievo saranno gli stessi descritti precedentemente.

2.3.2.4 - Valutazione degli anticorpi anti-peptide e degli anticorpi anti-CD20. La metodologia per l'analisi della risposta umorale è stata descritta in maniera esaustiva precedentemente (2,3). Il titolo degli anticorpi anti-peptide sarà valutato in test ELISA in piastre da microtitolazione sensibilizzate con peptide hCD20 (utilizzato per l'immunizzazione), coniugato a BSA. In questo test si eviterà di sensibilizzare le piastre con peptidi-KLH per eliminare il segnale aspecifico degli anticorpi anti-KLH. Gli anticorpi anti-peptide nel siero saranno successivamente rilevati mediante etero-antisiero anti-IgG di topo coniugato a perossidasi. I controlli negativi saranno costituiti dal segnale generato dal legame dei sieri anti-peptide nei pozzetti sensibilizzati con peptide irrilevante (Qp1-a) coniugato a BSA ovvero dal segnale di un siero anti-Qp1-a con il peptide hCD20. La presenza di anticorpi anti-hCD20 sarà evidenziata come precedentemente descritto (1) in citofluorimetria, incubando i sieri con cellule umane Raji CD20+ o cellule CEM CD20- (controllo negativo). Il Rituximab (controllo positivo) e l'AcMo chimerico anti-TNF-alfa Infliximab (controllo negativo) saranno usati come ulteriori controlli di specificità. Gli anticorpi legati alle cellule saranno evidenziati usando etero-antisieri coniugati a fluoresceina (FITC) specifici per la porzione Fc delle IgG murine (o umane per Rituximab e Infliximab). Ci aspettiamo che uno o più peptidi siano in grado di indurre una efficace risposta anticorpale anti-hCD20

2.3.2.5 - Analisi molecolare della specificità degli anticorpi anti-peptide e valutazione della proporzione di anticorpi anti-peptide che riconoscono il motif A/SNPS. Per analizzare a livello molecolare gli AA del peptide riconosciuto dagli anticorpi corrispondenti, le Ig purificate anti-peptide saranno processate con una libreria fagica, come precedentemente descritto (2). I sieri raccolti da ciascun topo nei giorni 35, 42, 49 e 56 saranno raccolti in un unico pool per la purificazione di Ig peptide-specifiche. La purificazione delle Ig anti-peptide (5), la rimozione delle Ig anti-KLH, la valutazione della specificità antigenica saranno eseguite secondo procedure precedentemente descritte (4,5). Lo screening, mediante ELISA, dei cloni fagici e l'analisi delle sequenze nucleotidiche degli inserti fagici saranno eseguiti come precedentemente descritto (1,2). La percentuale di cloni fagici che esprimeranno il motif A/SNPS rifletterà la proporzione di anticorpi che in quel topo riconoscerà l'epitopo di Rituximab. Il motif ottenuto dall'allineamento di tutte le sequenze dei fagi rappresenterà una stima della specificità di tutta la popolazione anticorpale. Dai topi immunizzati con singolo peptide sarà possibile valutare come le proprietà chimiche degli AA che fiancheggiano il motif influenzino il grado di specificità degli anticorpi contro A/SNPS. Sulla base delle nostre precedenti esperienze con le librerie fagiche, ci aspettiamo di non incontrare difficoltà in tale procedura. Ci aspettiamo di trovare: a) uno o più peptidi nei quali gli AA che fiancheggiano il motif abbiano bassa immunogenicità; in alternativa, b) una combinazione di peptidi che, per la loro diversità negli AA che fiancheggiano il motif, siano in grado amplificare quasi esclusivamente la popolazione anticorpale anti A/SNPS.

2.3.2.6 - Valutare se gli anticorpi anti-peptide CD20 specifici possano indurre un effetto biologico simile a quello osservato con Rituximab. Per rispondere a tale quesito, si eseguirà un test di citotossicità con il siero dell'animale immunizzato come descritto (1). In breve, il siero anti-peptide, trattato con DTT e scomplementato, sarà incubato con cellule linfoidi CD20+ e CD20- (controllo negativo) prima dell'aggiunta di complemento di coniglio. La lisi si valuterà mediante il colorante trypan blue con emocitometro, come descritto (1). L'AcMo Infliximab e i sieri anti-KLH o anti-Qp1-a-KLH saranno usati come controllo negativo e Rituximab come controllo positivo.

2.3.3 SINTESI DEL PEPTIDE mCD20 E VALUTAZIONE DELLA SUA CAPACITÀ DI INDURRE UNA RISPOSTA IMMUNE CD20-SPECIFICA IN TOPI BALB/C.

Il peptide o i peptidi hCD20 risultati più efficaci nell'indurre anticorpi anti-hCD20 saranno usati come stampo per sintetizzare i corrispondenti mCD20 (sostituendo la prolina del motif antigenico con serina). Basandoci su precedenti osservazioni (6), ci aspettiamo che mCD20 sia immunogenico. Il vantaggio di usare un peptide molto più corto, nel presente programma di ricerca, è di indurre, verosimilmente, una risposta immune più focalizzata verso il motif A/SNSS. Le procedure di coniugazione del peptide a proteine carriers, nonché il protocollo di immunizzazione sono simili a quelli usati nella precedente sezione con i peptidi hCD20. Si valuterà la presenza nel siero di anticorpi anti-mCD20, utilizzando la linea murina di linfoma B CD20+ A20 e la linea di ibridoma murino Px3-Ag8-653 rispettivamente come controlli positivo e negativo. Poiché gli anticorpi anti-mCD20 possono legare il CD20 dei linfociti B autologhi, ci aspettiamo di riscontrare bassi livelli serici di anticorpi anti-CD20. Pertanto, la loro presenza sarà valutata indirettamente, monitorando la deplezione dei linfociti B CD20+ sia durante l'immunizzazione (nel sangue periferico) che al termine di questa (sugli splenociti). In analogia con quanto osservato dopo somministrazione di Rituximab, ci aspettiamo di osservare una deplezione di linfociti B nei topi trattati con mCD20 e non in quelli con hCD20.

2.3.3.1 - Valutare se il vaccino sia in grado di indurre cellule T CD4+ effettrici specifiche per il motif A/SNSS del peptide mCD20. Oltre che fornire un aiuto alle cellule B, una sottopopolazione di linfociti T CD4+ può esercitare funzioni effettrici citotossiche

peptide-ristrette (8). In questo modo, il risultato di ogni strategia di vaccinoterapia rifletterà la specificità della risposta linfocitaria CD4⁺ anti-peptide. Saggeremo l'ipotesi di isolare, da topi immunizzati con peptide mCD20, linfociti T CD4⁺ A/SNSS-specifici che siano capaci di proliferare se stimolati dal peptide, ovvero capaci di azione citotossica nei confronti di cellule target mCD20⁺. La percentuale di linfociti T peptide-specifici sarà valutata mediante l'uso di tetrameri specifici per un peptide mCD20 che esprime lo stesso motif A/SNSS del peptide immunizzante, ma che differisce per gli AA che fiancheggiano il motif. In breve, gli splenociti del topo immunizzato saranno incubati con un tetramero MHC di classe II/peptide coniugato con phycoerythrin (PE) e successivamente con un AcMo anti-CD4 marcato con FITC. Successivamente, si isolerà una porzione degli splenociti colorati con il tetramero mediante biglie magnetiche anti-PE su colonna. Le cellule isolate, precedentemente marcate con il fluorocromo CFSE (0.5µM-5 µM) (marcante della divisione cellulare), saranno utilizzate in un test di coniugato a BSA o KLH. Dopo 7 giorni, si analizzeranno i picchi sequenziali decrescenti di fluorescenza di CFSE al citofluorimetro. Si userà come controllo di stimolazione alla proliferazione un peptide hCD20 (che esprime A/SNPS), un peptide irrilevante (Qp1-a), entrambi liberi o coniugati a carriers (BSA, KLH). La PHA sarà usata come controllo positivo.

Il test di citotossicità si eseguirà marcando le cellule target A20 (linea autologa di linfoma B CD20⁺, MHC classe II⁺) o i linfociti B autologhi (caricati o non con il peptide) con il colorante Tracker Orange prima dell'aggiunta di cellule effettrici (CD4⁺ tetramero/peptide specifiche). Si aggiungerà successivamente la 7 amino-actimocina C per misurare l'entità della lisi. Si includeranno come controllo linfociti CD4⁺ da topo non immunizzato, immunizzato con peptide mCD20 e immunizzato con Qp1a-KLH. Quale bersaglio nel controllo negativo, saranno utilizzate le cellule di mieloma murino autologhe CD20-negative e linfociti B di topo non immunizzato. Ci aspettiamo che il peptide mCD20 sia immunogenico nel topo, poiché il motif A/SNSS del peptide e del CD20 murino sono fiancheggiati da AA diversi. Ciò nonostante, se il peptide si dimostrasse poco immunogenico, si utilizzeranno protocolli di immunizzazione che prevedono dosi più elevate di peptide (10 o 100 µg per ogni inoculo). Ci aspettiamo di identificare negli animali immunizzati cellule CD4⁺ peptide/specifiche che proliferano o che sono citotossiche nei confronti di linfociti B autologhi.

2.3.4 EFFETTI DELLA VACCINO-TERAPIA CON PEPTIDE mCD20 SUL DECORSO DEL LES IN UN MODELLO MURINO.

I topi BWF1 sviluppano una malattia lupica che ricorda quella umana, con abnorme tolleranza delle cellule B, iperproduzione di anticorpi, tra cui quelli anti-DNA responsabili a loro volta di una glomerulonefrite letale. Un peptide dotato di proprietà immunogeniche nei topi BALB/c è verosimile che lo sia anche nei topi BWF1, poiché entrambi condividono gli stessi alplotipi di HLA di classe I e II. L'immunizzazione sarà eseguita prima (gruppo 1: 30 topi) e dopo due settimane (gruppo 2: 30 topi) la comparsa delle manifestazioni di malattia (proteinuria, anticorpi anti-DNA).

2.3.4.1 - Valutazione dell'efficacia del vaccino nel LES murino. Ciascun gruppo di topi BWF1 sarà diviso in due sottogruppi (1a and 2a: 18 topi; 1b and 2b: 12 topi) che saranno immunizzati con KLH-mCD20 (gruppi #a) e Qp1a-KLH (gruppi#b). Sieri e urine saranno raccolti ogni due settimane per il dosaggio rispettivamente dell'azotemia/anticorpi anti-DNA e proteinuria/ematuria. La metà dei topi di ciascun gruppo sarà sacrificato intorno alla 40^a settimana (periodo in cui ci si aspetta che la sopravvivenza degli animali non trattati sia inferiore al 50%), per la valutazione istopatologica e immunoistochimica dei reni. I rimanenti animali saranno lasciati vivi per la valutazione della sopravvivenza.

2.3.4.2 - Analisi statistica. Le differenze dei parametri tra i due gruppi saranno valutate mediante il test di Mann-Whitney, mentre per l'analisi di sopravvivenza si utilizzerà il test di Kaplan-Meier. La differenza statistica delle sopravvivenze sarà calcolata con il test log Rank.

In ragione dell'alterata regolazione B-linfocitaria nei topi BWF1, ci aspettiamo che il motif ANSS del CD20 sia meno tollerogeno rispetto a quanto accade nei topi Balb/c e che il vaccino risulti quindi più efficace. Ci aspettiamo inoltre di ottenere un miglior controllo di malattia nel gruppo di animali in cui la vaccinoterapia venga iniziata dopo l'insorgenza della malattia stessa. Pur tenendo conto delle ovvie differenze tra i due modelli sperimentali, è stato infatti dimostrato in uno studio recente che gli anticorpi anti-CD20 sono protettivi solo se inoculati dopo l'insorgenza dell'encefalite allergica sperimentale, un modello murino di sclerosi multipla (10).

Bibliografia

1. Perosa F, Favoino E et al: *Blood* 107:1070, 2006.
2. Perosa F, Favoino E et al: *J Immunol* 179:7967, 2007.
3. Perosa F, Favoino E et al: *J Immunol* 182:416, 2009.
4. Perosa F, Luccarelli G et al: *J Immunol* 171:1918, 2003.
5. Perosa F, Carbone R et al: *J Immunol Methods* 128:9, 1990.
6. Roberts WK, Livingston PO et al: *Blood* 99:3748, 2002.
7. Palomba ML, Roberts WK et al: *Clin Cancer Res* 11:370, 2005.
8. van de Berg PJ, van Leeuwen EM et al: *Curr Opin Immunol* 20:339, 2008.
9. Stoll ML, Gavalchin J: *Rheumatology (Oxford)* 39:18, 2000.
10. Matsushita T, Yanaba K et al: *J Clin Invest* 118:3420, 2008.

2.4 DURATA DELLO STUDIO

Si prevede che lo studio possa essere completato nell'arco di due anni.

2.5 STIMA DETTAGLIATA DEL BUDGET COMPLESSIVO E PARZIALE PER TUTTE LE PRINCIPALI VOCI DI SPESA

Il costo totale del progetto è stato calcolato in € 30.000,00 (Euro trentamila).

Voci di spesa

A - Spese generali

Reagenti, ricambi, strumentazione, cancelleria, toner, partecipazione a congressi, spese di pubblicazione, ecc: €

3.000,00

B – Materiali di consumo e animali

Plasticheria, xeno-antisieri marcati, anticorpi monoclonali, kit per isolare cellule mediante biglie magnetiche, fluorocromi, tetrameri, terreni di coltura, librerie fagiche, sintesi di peptidi, acquisto e custodia animali:

€ 27.000,00

Strumenti già a disposizione dell'unità operativa

Strumentazione per cromatografia HPLC/FPLC

Apparecchio per RT-PCR

Microscopio invertito a fluorescenza

Citofluorimetro per fenotipizzazione cellulare

Criotomo ad un compressore
Apparecchio per PCR
Cappe a flusso laminare per colture cellulari.

2.6 DICHIARAZIONE DI ASSENZA DI CONFLITTO DI INTERESSI

Il responsabile scientifico del progetto e tutti i componenti dell'unità di ricerca dichiarano di non avere rapporti, diretti o indiretti, con industrie farmaceutiche e/o organizzazioni con interessi finanziari che possano interferire con la realizzazione del progetto stesso.

3 CURRICULUM VITAE DEL RESPONSABILE E PUBBLICAZIONI

3.1 CURRICULUM VITAE

Vito Racanelli è Ricercatore di Medicina Interna presso l'Università degli Studi Bari. E' docente di Medicina d'Urgenza nel corso di laurea in Medicina e Chirurgia, di Medicina Interna e di Immunologia Diagnostica in diverse Scuole di Specializzazione dello stesso Ateneo. Fa parte del collegio dei Docenti del Dottorato di Ricerca in Diagnostica Biomolecolare in Medicina Interna e Oncologia. La sua attività scientifica, svolta in Italia e negli Stati Uniti (National Institutes of Health, Bethesda, 2001-2003), è documentata da pubblicazioni su riviste internazionali ad elevato fattore d'impatto, capitoli di libri, traduzioni di trattati, brevetti, premi di ricerca, relazioni e comunicazioni a congressi nazionali ed internazionali. Le sue principali linee di ricerca riguardano la fisiopatologia del sistema immunitario, con particolare riferimento alle malattie autoimmuni e linfoproliferative, alla crioglobulinemia mista HCV-correlata e alle vasculiti. E' membro della Società Italiana di Immunologia e Immunologia Clinica e della Società Italiana di Medicina Interna. E' caporeparto dell'U.O. Medicina Interna 'G. Baccelli' dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Consorziale Policlinico di Bari e, in tale veste, è attivamente impegnato nella diagnosi e cura dei pazienti affetti da patologie sistemiche ed in particolare da lupus eritematoso sistemico. L'efficacia, la tollerabilità e la sicurezza della ciclosporina A nel trattamento di questa malattia è stata valutata in un studio prospettico, randomizzato, multicentrico.

3.2 PUBBLICAZIONI NEGLI ULTIMI 5 ANNI [max 5]

- 1 PRETE M, **RACANELLI V**, DIGIGLIO L, VACCA A, DAMMACCO F, PEROSA F. Extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis: An update. *Autoimmun Rev* 2011 Sep 10 [Epub ahead of print].
- 2 **RACANELLI V**, PRETE M, MUSARAJ G, DAMMACCO F, PEROSA F. Autoantibodies to intracellular antigens: Generation and pathogenetic role. *Autoimmun Rev* 2011; 10:503-8.
- 3 PEROSA F, PRETE M, **RACANELLI V.**, DAMMACCO F (2010). CD20-depleting therapy in autoimmune diseases: from basic research to the clinic. *JOURNAL OF INTERNAL MEDICINE*, vol. 267(3); p. 260-277, ISSN: 0954-6820
- 4 PEROSA F, FAVOINO E, VICENTI C, GUARNERA A, **RACANELLI V.**, DE PINTO V, DAMMACCO F (2009). Two structurally different rituximab-specific CD20 mimotope peptides reveal that rituximab recognizes two different CD20-associated epitopes. *JOURNAL OF IMMUNOLOGY*, vol. 182; p. 416-423, ISSN: 0022-1767
- 5 **RACANELLI V.**, PRETE M, MINOIA C, FAVOINO E, PEROSA F (2008). Rheumatic disorders as paraneoplastic syndromes. *AUTOIMMUNITY REVIEWS*, vol. 7; p. 352-358, ISSN: 1568-9972