



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

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102019000008376
Data Deposito	07/06/2019
Data Pubblicazione	07/12/2020

Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	07	K	16	28

Titolo

ANTICORPI AD ATTIVITA ANTITUMORALE

11437M Descrizione del brevetto per invenzione industriale avente per titolo:

SB/mc **“ANTICORPI AD ATTIVITÀ ANTITUMORALE”**

a nome : **UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MODENA E REGGIO
EMILIA**

con sede in: Via Università, 4 - 41121 Modena (MO)

* * *

Campo tecnico dell'invenzione

La presente invenzione si riferisce ad anticorpi ad attività antitumorale che sono in grado di inibire il meccanismo di internalizzazione cellulare del ferro non legato alla transferrina.

Stato dell'arte

Il ferro è un bioelemento essenziale ed il metallo di transizione più importante in tutti gli organismi viventi, dai batteri agli esseri umani, grazie alla sua capacità di mediare il trasferimento degli elettroni. Esso infatti è presente nei gruppi eme delle proteine della catena di trasporto degli elettroni deputati alla fosforilazione ossidativa nelle creste mitocondriali, un noto processo a più fasi finalizzato ad ottenere energia sotto forma di ATP (Adenosine Tri-Phosphate) attraverso la generazione di un gradiente protonico (chemiosmosi), la cui richiesta è marcatamente aumentata all'interno delle cellule tumorali.

Il midollo osseo è ricco di cellule staminali ematopoietiche multipotenti che richiedono continuamente ferro per maturare e che per molti aspetti assomigliano alle cellule tumorali, se non fosse che quest'ultime perdono la capacità di differenziarsi. Tra i sintomi e i segni dell'anemia ferrocarenziale vi sono affaticamento e debolezza, pallore cutaneo, decolorazione delle mucose, scarso appetito, perdita di peso e spesso alopecia, tutti sintomi e segni riscontrabili anche

in pazienti affetti da tumori maligni (con o senza sanguinamento) e che fanno ipotizzare ad un suo iperconsumo nei pazienti affetti da cancro.

Il ferro forma composti principalmente negli stati ferroso (2^+) e ferrico (3^+), agendo rispettivamente come donatore di elettroni o accettore.

Una volta ingerito, i succhi gastrici facilitano la dissociazione del ferro dal cibo; il ferro eme entra direttamente negli enterociti duodenali, mentre il ferro non eme viene assorbito solo dopo la sua riduzione a Fe^{2+} . L'enzima dell'orletto a spazzola, il citocromo B duodenale (DcytB), riduce quindi Fe^{3+} non-eme a Fe^{2+} e questa conversione è favorita dall'azione dell'acido ascorbico, che migliora la biodisponibilità di ferro non-eme. Gli enterociti duodenali assorbono Fe^{2+} attraverso il Divalent Metal Transporter 1 (DMT1), noto anche come Divalent Cation Transporter 1 (DCT1), una proteina trans-membrana altamente conservata dai batteri agli esseri umani, codificata dal gene SLC11A2 (Solute Carrier Family 11 member 2).

Gli enterociti possono rilasciare il ferro assorbito nel flusso sanguigno tramite la ferroportina sensibile all'epcidina, dove può essere legato alla sua proteina di trasporto, la transferrina, dopo la sua riconversione a Fe^{3+} da parte dell'efestina ferrossidasi, dando origine al "Transferrin Bound Iron" (TBI). Ogni molecola di transferrina ha la capacità di trasportare due ioni Fe^{3+} ; due particolari membri della famiglia della transferrina sono la lattotransferrina, meglio conosciuta come lattoferrina, presente principalmente nel colostro e nel latte, e la melanotransferrina, ancorata alla membrana delle cellule melanomatose.

Sino ad oggi però si è ritenuto che il ferro più importante dal punto di vista biologico fosse quello legato alla transferrina, che è la glicoproteina plasmatica deputata al trasporto del ferro dal duodeno al resto dell'organismo. La transferrina

viene assunta dalle cellule attraverso l'endocitosi mediata dai recettori TFR1 (Transferrin Receptor 1) o TFR2 (Transferrin Receptor 2). TFR1 mostra un'affinità superiore di 25 volte rispetto a TFR2 e, quindi, è il principale recettore di legame per la transferrina.

In passato TFR1 è stato adottato come bersaglio per la somministrazione di numerose sostanze citotossiche ed antitumorali coniugate con la transferrina, come cisplatino, clorambucile, ciclofosfamide, doxorubicina, tossina difterica e artemisinina. Altri ricercatori stanno sperimentando anticorpi di nuova generazione diretti contro TFR1 (o TFR2) con l'intento di spegnere l'endocitosi del ferro legato alla transferrina, al fine di ottenere una deplezione intracellulare di ferro.

Sussiste tuttora una forte esigenza di identificare nuovi agenti antitumorali.

Sommario dell'invenzione

Oggetto dell'invenzione sono anticorpi in grado di legarsi e inibire proteine di membrana preposte all'internalizzazione cellulare del ferro non legato alla transferrina per l'uso come medicamento, in particolare nel trattamento di tumori.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

È stato sorprendentemente trovato che anticorpi in grado di legarsi e inibire proteine di membrana preposte all'internalizzazione cellulare del ferro non legato alla transferrina (NTBI: Non-Transferrin Bound Iron) sono utili come agenti antitumorali, in particolare nel trattamento di tumori maligni aggressivi.

Oggetto dell'invenzione sono anticorpi per l'uso come medicamento, in particolare come inibitori di proteine di membrana preposte all'internalizzazione cellulare del ferro non legato alla transferrina.

L'invenzione si riferisce inoltre ad anticorpi in grado di legarsi e inibire proteine di membrana preposte all'internalizzazione cellulare del ferro non legato

alla transferrina per l'uso nel trattamento di tumori.

Secondo la presente invenzione, con il termine "inibire" si intende la capacità di ridurre o bloccare la funzionalità delle proteine di membrana preposte all'internalizzazione cellulare del ferro non legato alla transferrina.

Secondo un aspetto preferito, la proteina di membrana appartiene alla famiglia DMT (Divalent Metal Transporter) oppure alla famiglia ZIP (Zinc-regulated transporter Iron-regulated transporter like protein) e relative isoforme; l'anticorpo è quindi scelto tra un anticorpo anti-ZIP o anti-DMT o loro combinazioni.

Secondo un aspetto ulteriormente preferito, la proteina di membrana è scelta tra ZIP14 (Zinc-regulated transporter Iron-regulated transporter like protein, o Human SLC39A14) e/o DMT1 (Divalent Metal Transporter); l'anticorpo è quindi scelto tra un anticorpo anti-ZIP14 o anti-DMT1 o loro combinazioni.

Con il termine "anticorpo" secondo la presente invenzione si intendono anticorpi isolati o frammenti di tali anticorpi, che si legano specificamente alle proteine di membrana (canali trans-membrana) preposte all'internalizzazione cellulare del ferro non legato alla transferrina, preferibilmente ZIP14 o DMT1.

In particolare, i frammenti leganti possono essere frammenti Fab, Fab', F(ab')₂, Fv e single-chain antibodies.

Come noto nella tecnica, gli anticorpi possono vantaggiosamente essere, ad esempio, anticorpi policlonali, monoclonali, chimerici e/o completamente umani o umanizzati.

Anticorpi anti-ZIP14 e anti-DMT1 sono noti in letteratura e sono descritti, per esempio, in Liuzzi JP, Lichten LA, Rivera S, Blanchard RK, Aydemir TB, Knutson MD, Ganz T, Cousins RJ, Interleukin-6 regulates the zinc transporter

Zip14 in liver and contributes to the hypozincemia of the acute-phase response, Proc Natl Acad Sci USA, 2005 May 10;102(19):6843-8, e rispettivamente in Garrick MD, Dolan KG, Horbinski C, Ghio AJ, Higgins D, Porubcin M, Moore EG, Hainsworth LN, Umbreit JN, Conrad ME, Feng L, Lis A, Roth JA, Singleton S, Garrick LM, DMT1: a mammalian transporter for multiple metals. Biometals, 2003 Mar;16(1):41-54.

Inoltre, gli anticorpi anti-ZIP14 e anti-DMT1 sono disponibili sul mercato, come ad esempio quelli prodotti da Biorbyt con i seguenti numeri di catalogo (tutte le informazioni sono disponibili ai rispettivi link):

anti-ZIP14: orb96723 <http://www.biorbyt.com/zip14-antibody-7>

anti-DMT1: orb5976 <http://www.biorbyt.com/dmt1-antibody-orb5976>

oppure da Abcam con i seguenti numeri di catalogo:

anti-ZIP14: ab106568 <https://www.abcam.com/slc39a14zip-14-antibody-ab106568.html>

anti-ZIP14: ab140973 <https://www.abcam.com/slc39a14zip-14-antibody-ab140973.html>

anti-ZIP14: ab123988 <https://www.abcam.com/slc39a14zip-14-antibody-ab123988.html>

anti-ZIP14: ab133384 <https://www.abcam.com/slc39a14zip-14-antibody-ab133384.html>

anti-ZIP14: ab219174 <https://www.abcam.com/slc39a14zip-14-antibody-ab219174.html>

anti-ZIP14: ab191199 <https://www.abcam.com/slc39a14zip-14-antibody-ab191199.html>

anti-DMT1: ab55735 <https://www.abcam.com/dmt1-antibody-ab55735.html>

anti-DMT1: ab55812 <https://www.abcam.com/dmt1-antibody-ab55812.html>

anti-DMT1: ab123085 <https://www.abcam.com/dmt1-antibody-ab123085.html>

anti-DMT1: ab140977 <https://www.abcam.com/dmt1-antibody-ab140977.html>

anti-DMT1: ab133402 <https://www.abcam.com/dmt1-antibody-ab133402.html>

Anticorpi anti-ZIP14 e anti-DMT1 sono inoltre prodotti da Abbexa, Abbiotec, Abgent, Abnova Corporation, Arigo Biolaboratories, Aviva Systems Biology Corporation, Bethyl Laboratories, Covalab, Elabscience, GeneTex, Invitrogen - Thermo Fisher Scientific, LifeSpan BioSciences, MBL International Corporation, Merck Millipore, MyBioSource, Nordic-MUbio, NovoPro, Novus Biologicals, OriGene Technologies, Osenses, PromoCell GmbH, ProSci, Proteintech, RayBiotech, Rockland Immunochemicals, Signalway Antibody, Sigma-Aldrich.

Anticorpi con immunogenicità ridotta possono essere generati usando tecniche di *library-based display* e umanizzazione. Gli anticorpi possono essere umanizzati o primatizzati usando tecniche ben note nell'arte. Si veda, ad esempio, Winter and Harris, *Immunol. Today* 14:43-46 (1993) e Wright et al., *Crit. Rev. Immunol.* 12:125-168 (1992).

L'anticorpo può essere ingegnerizzato mediante tecniche di DNA ricombinante per sostituire i domini CH1, CH2, CH3, i domini *hinge* e/o la regione *framework* con la corrispondente sequenza umana [come descritto ad esempio in WO 92/02190 e US Patent No. 5,530,101, 5,585,089, 5,693,761, 5,693,792, 5,714,350 e 5,777,085].

Inoltre, l'uso del cDNA di immunoglobuline (Ig) per la costruzione di geni chimerici di Ig è noto nell'arte [Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3439-43 (1987) e *J. Immunol.* 139: 3521-6 (1987)]. L'mRNA è isolato da un ibridoma o altra cellula che produce l'anticorpo e viene usato per produrre cDNA. Il cDNA di

interesse può essere amplificato dalla reazione a catena della polimerasi usando primer specifici [U.S. patent No. 4,683,195 e 4,683,202].

In alternativa, una libreria di espressione viene creata e controllata per isolare la sequenza di interesse che codifica la regione variabile dell'anticorpo e quindi fusa con le sequenze della regione costante umana. Le sequenze dei geni delle regioni costanti umane possono essere trovate in Kabat et al., "Sequenze di proteine di interesse immunologico", pubblicazione N.I.H. n. 91-3242 (1991). I geni della regione C umana sono facilmente reperibili da cloni noti. La scelta dell'isotipo sarà guidata dalle funzioni effettrici desiderate, come la fissazione del complemento o l'attività nella citotossicità cellulare anticorpo-dipendente. Gli isotipi preferiti sono IgG1, IgG2 e IgG4. È possibile utilizzare una delle regioni costanti della catena leggera umana, kappa o lambda. L'anticorpo chimerico umanizzato viene quindi espresso con metodi convenzionali. I vettori di espressione includono plasmidi, retrovirus, YAC, episomi derivati da EBV e simili.

Frammenti di anticorpo, come Fv, F(ab')₂ e Fab possono essere preparati mediante scissione della proteina intatta, ad esempio mediante proteasi o clivaggio chimico. In alternativa, viene progettato un gene troncato. Per esempio, un gene chimerico che codifica una parte del frammento F(ab')₂ può comprendere sequenze di DNA codificanti per il dominio CH1 e la regione di cerniera della catena H, seguite da un codone di arresto traslazionale per produrre la molecola troncata.

Le sequenze di consenso delle regioni H e L J possono essere utilizzate per progettare oligonucleotidi da utilizzare come primer per introdurre utili siti di restrizione nella regione J per il successivo collegamento di segmenti della regione V a segmenti della regione C umana. Il cDNA della regione C può essere modificato mediante mutagenesi sito diretta per posizionare un sito di restrizione nella

posizione analoga nella sequenza umana.

I vettori di espressione includono plasmidi, retrovirus, YAC, episomi derivati da EBV e simili.

Inoltre, anticorpi umani o anticorpi di altre specie possono essere generati attraverso tecniche ben note nell'arte di tipo *display-based* che comprendono, senza limitazioni, *phage display*, *retroviral display*, *ribosomal display* e altre tecniche, e le molecole risultanti possono essere sottoposte ad ulteriore maturazione, come la maturazione dell'affinità [Winter and Harris, Immunol. Today 14:43-46 (1993); Hanes e Plückthun, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4937-42 (1997) (ribosomal display); Parmley e Smith, Gene 73:305-18 (1988) (phage display); Scott, Trends Biochem. Sci. 17:241-5 (1992); Cwirla et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6378-82 (1990); Russel et al., Nucleic Acids Res. 21:1081-5 (1993); Hoogenboom et al., Immunol Rev. 130:41-68 (1992); Chiswell e McCafferty, Trends Biotechnol. 10:80-4 (1992); e U.S. patent No. 5,733,743]. Se vengono utilizzate tecniche di display per produrre anticorpi che non sono umani, tali anticorpi possono essere umanizzati come descritto sopra.

Gli anticorpi dell'invenzione possono essere generati contro la proteina intera in una qualsiasi delle sue isoforme o contro suoi frammenti peptidici, ad esempio contro le regioni 261-291, 261-340, 1-66 della proteina DMT-1 umana oppure, ad esempio, contro la regione 28-58, 50-100 della proteina ZIP-14 umana. Gli anticorpi possono essere selezionati, con tecniche note all'esperto del settore, in base alla loro capacità di inibire, completamente o in parte, la funzione delle proteine di membrana (canali trans-membrana) preposte all'internalizzazione cellulare del ferro non legato alla transferrina, preferibilmente ZIP14 e DMT1.

Secondo un aspetto preferito dell'invenzione, il tumore è scelto tra un tumore

a polmoni, bronchi o laringe; colon-retto; mammella; pancreas; prostata; fegato, colecisti e vie biliari; ovaie; cervello o altri distretti del sistema nervoso; midollo osseo o sangue (leucemia); ossa o articolazioni; tessuti molli (incluso cuore e vasi); linfonodi (linfoma) e milza; nasofaringe o cavo orale; ghiandole salivari; pleura, pericardio e peritoneo; tiroide o timo; esofago, stomaco o intestino tenue; utero; placenta; ghiandola surrenale; rene, vie urinarie o vescica; testicoli; cute.

Secondo un ulteriore aspetto preferito dell'invenzione, il tumore è scelto tra mieloma multiplo, osteosarcoma di superficie ad alto grado, carcinoma a cellule di Merkel, coriocarcinoma, carcinoma anaplastico della tiroide, carcinoma midollare, sarcoma pleomorfo ad alto grado, sarcoma indifferenziato, linfoma anaplastico a grandi cellule, linfoma diffuso a grandi cellule, leucemia mieloide acuta, leucemia linfoblastica acuta, carcinoma dedifferenziato dei dotti salivari, carcinoma duttale invasivo scarsamente differenziato, carcinoma lobulare invasivo, carcinoma neuroendocrino (polmone), carcinoma squamocellulare scarsamente differenziato (utero, bronchi, cavo orale, timo, esofago), sarcoma stromale ad alto grado, carcinoma endometriale ad alto grado, carcinoma scarsamente coesivo (tipo sigillocellulare), adenocarcinoma scarsamente differenziato (pancreas, polmone, colon/retto, esofago, intestino tenue), carcinoma sarcomatoide, carcinoma oncocitico, mesotelioma maligno, melanoma nodulare, glioblastoma, seminoma anaplastico, neuroblastoma, carcinoma nasofaringeo indifferenziato, tumore stromale gastrointestinale di alto grado, colangiocarcinoma scarsamente differenziato, cistoadenocarcinoma sieroso o mucinoso di alto grado, adenocarcinoma acinare scarsamente differenziato.

Gli anticorpi dell'invenzione si sono dimostrati efficaci in vitro nel trattamento di tumori. Questi anticorpi si legano alle proteine di membrana preposte

all'internalizzazione cellulare del ferro non legato alla transferrina, in particolare DMT1 e/o ZIP14, che, come si è sorprendentemente trovato, è utilizzato dalle cellule tumorali maligne per sostenere il loro metabolismo accelerato. In questo modo, si viene a creare una carenza intracitoplasmatica di ferro nelle cellule tumorali, con conseguente blocco metabolico e inibizione della proliferazione delle cellule tumorali stesse.

Gli anticorpi della presente invenzione possono essere utilizzati come agenti antitumorali anche in combinazione con agenti in grado di legarsi e inibire/bloccare il recettore della transferrina, preposto all'internalizzazione del ferro legato alla transferrina, anti-TFR1 e/o anti-TRF2, o con altri agenti chemioterapici ed immunoterapici oppure in associazione a radioterapia.

L'invenzione riguarda anche un metodo per il trattamento di un tumore in un paziente che comprende la somministrazione a detto paziente di una dose efficace di un anticorpo come sopra definito.

I seguenti esempi illustrano ulteriormente l'invenzione.

ESEMPI

Esempio 1 - Valutazione dell'espressione dei recettori ZIP14 e DMT1 in sezioni di tessuto tumorale

Sono stati selezionati i campioni biotici o chirurgici di 46 pazienti d'ambosessi e di ogni età deceduti per neoplasie istologicamente aggressive entro i 5 anni dalla diagnosi, nonostante chemio- e radio-terapie, come riassunto nella seguente Tabella 1:

Tabella 1

SITO	ISTOTIPO
Cervello e sistema nervoso	Glioblastoma
Nasofaringe e cavità orale	Carcinoma nasofaringeo indifferenziato Carcinoma squamocellulare scarsamente differenziato
Ghiandole salivari	Carcinoma dedifferenziato dei dotti salivari Carcinoma oncocitico
Polmoni, bronchi e laringe	Carcinoma neuroendocrino Carcinoma squamocellulare scarsamente differenziato Adenocarcinoma scarsamente differenziato
Pleura, pericardio e peritoneo	Mesotelioma maligno
Tiroide e timo	Carcinoma anaplastico Carcinoma midollare Carcinoma squamocellulare scarsamente differenziato
Esofago	Carcinoma squamocellulare scarsamente differenziato Adenocarcinoma scarsamente differenziato
Stomaco e intestino tenue	Carcinoma scarsamente coesivo (tipo sigillocellulare) Adenocarcinoma scarsamente differenziato Tumore stromale gastrointestinale di alto grado
Colon e retto	Adenocarcinoma scarsamente differenziato
Fegato, colecisti e vie biliari	Colangiocarcinoma scarsamente differenziato
Pancreas	Adenocarcinoma scarsamente differenziato
Mammella	Carcinoma duttale invasivo scarsamente differenziato Carcinoma lobulare invasivo
Ovaie	Cistoadenocarcinoma sieroso o mucinoso di alto grado
Utero	Carcinoma endometriale di alto grado Carcinoma squamocellulare scarsamente differenziato Sarcoma stromale di alto grado
Placenta	Coriocarcinoma
Surrene	Neuroblastoma
Rene, vescica e vie urinarie	Carcinoma sarcomatoide
Prostata	Adenocarcinoma acinare scarsamente differenziato
Testicoli	Seminoma anaplastico
Linfonodi e milza	Linfoma B diffuso a grandi cellule Linfoma a grandi cellule anaplastiche

SITO	ISTOTIPO
Midollo osseo e sangue	Leucemia mieloide acuta Leucemia linfoblastica acuta Mieloma multiplo
Ossa e articolazioni	Osteosarcoma di alto grado di superficie Sarcoma plemorfo indifferenziato
Tessuti molli	Sarcoma indifferenziato (a piccole cellule rotonde)
Cute	Melanoma nodulare Carcinoma a cellule di Merkel

I campioni precedentemente fissati in formaldeide ed inclusi in paraffina, sono stati sottoposti a colorazione ematossilina/eosina (EE), a colorazione istochimica per il Fe²⁺ (colorazione di Turnbull) e Fe³⁺ (colorazione di Perls), ed a caratterizzazione immunoistochimica. Dopo deparaffinazione, idratazione, blocco endogeno delle perossidasi e smascheramento antigenico, le sezioni di tessuto sono state incubate per 30 minuti a temperatura ambiente con anti-TFR1 (clone DF1513, Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA), anti-TFR2 (clone 9F8 1C11, Santa Cruz), anti-DMT1 (policlonale, Biorbyt LLC, San Francisco, CA, USA) e anti-ZIP14 (policlonale, Biorbyt). È stato applicato un anticorpo secondario biotinilato e il prodotto di colorazione è stato rilevato con complesso avidina-biotina, controcolorato con ematossilina. Il rilevamento della reazione è stato ottenuto mediante un complesso polimerico adatto per coloratori automatici Roche - Ventana, con DAB (3,3'-diaminobenzidina tetraidrocloruro) come cromogeno. I risultati immunoistochimici per ciascun campione neoplastico sono stati confrontati con il tessuto normale adiacente.

Inoltre, sono stati adottati gli stessi criteri di validazione già in pratica per la valutazione dell'espressione del Pd-L1 (Programmed death-Ligand 1) nel cancro mediante immunoistochimica [Garon EB, Rizvi NA, Hui R, et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. N Engl J Med. 2015;372:2018-28], come segue:

- nessuna (-): nessuna colorazione è stata osservata o una colorazione della membrana di qualsiasi entità in un numero di cellule tumorali <1%, cioè un punteggio TPS (Tumor Proportion Score) <1%;

- bassa (+): colorazione della membrana di qualsiasi entità in un numero di cellule tumorali da $\geq 1\%$ a <49%, ovvero un TPS da $\geq 1\%$ a <49%;

- alto (++) : colorazione della membrana di qualsiasi entità in un numero di cellule tumorali $\geq 50\%$, ovvero un TPS $\geq 50\%$.

I risultati sono riassunti nella seguente Tabella 2:

Tabella 2

	TFR1	TFR2	DMT	ZIP
< 1%	10 (21.7%)	42 (91.4%)	26 (56.5%)	0 (0%)
1-49%	16 (34.8%)	2 (4.3%)	9 (19.5%)	1 (2.2%)
$\geq 50\%$	20 (43.5%)	2 (4.3%)	11 (24.0%)	45 (97.8%)

Pertanto, nella quasi totalità dei casi (45 casi su 46: 97,8%) si è assistito ad un incremento d'espressione, in più del 50% della cellularità neoplastica, della proteina ZIP14, deputata all'internalizzazione del ferro non legato alla transferrina, ed in nessun caso (0%) ad una mancata iperespressione della stessa.

Per quanto riguarda DMT1, nel 43,5% dei casi si è assistito ad una sua iperespressione, variabile da caso a caso per quanto riguarda la percentuale di cellularità coinvolta.

Nel 43,5% dei casi si è riscontrato anche un incremento d'espressione, in più del 50% della cellularità neoplastica, della molecola TFR1, che può pertanto essere

tenuta in considerazione come valido bersaglio molecolare, in contemporanea al blocco della via del ferro non legato alla transferrina.

Esempio 2 - Test di efficacia sull'inibizione della proliferazione di cellule tumorali

Si è poi provveduto a valutare il comportamento degli anticorpi anti-ZIP14 e anti-DMT1 su una linea cellulare neoplastica umana, in particolare su una linea cellulare umana di mieloma multiplo.

In dettaglio, 1000 µL di linea cellulare di mieloma multiplo umano RPMI 8226 (Sigma-Aldrich), costituita da circa 600.000 cellule mantenute a 37°C ed ad una concentrazione di CO₂ del 5%, in sospensione con RPMI 1640, glutamina (2 mM) e siero bovino fetale (10%), sono stati messi a contatto per 12 ore consecutive con 20 µL di anticorpo anti-ZIP14 (Biorbyt - orb96723), ottenendo una riduzione delle cellule in proliferazione in una proporzione pari a 17:1 rispetto alla linea cellulare non trattata, rilevata in fluorescenza rossa EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine).

Altri 1000 µL di linea cellulare di mieloma multiplo umano RPMI 8226, costituita anch'essa da circa 600.000 cellule mantenute a 37°C e ad una concentrazione di CO₂ del 5%, in sospensione standard con RPMI 1640, glutamina (2 mM) e siero bovino fetale (10%), sono stati messi a contatto per 12 ore consecutive con 25 µL di anticorpo anti-DMT1 (Biorbyt - orb5976), ottenendo una riduzione delle cellule in proliferazione in una proporzione pari a 2:1 rispetto alla linea cellulare non trattata, rilevata sempre in fluorescenza rossa EdU.

Questi risultati sono pertanto riconducibili al blocco metabolico e quindi proliferativo delle cellule neoplastiche dovuto alla mancata assunzione del ferro non legato alla transferrina presente nel siero del mezzo di coltura.

RIVENDICAZIONI

1. Anticorpo inibitore di proteine di membrana preposte all'internalizzazione cellulare del ferro non legato alla transferrina per l'uso come medicamento.
2. Anticorpo inibitore di proteine di membrana preposte all'internalizzazione cellulare del ferro non legato alla transferrina per l'uso secondo la rivendicazione 1, nel trattamento dei tumori.
3. Anticorpo per l'uso secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui la proteina di membrana è una proteina ZIP in una qualsiasi isoforma.
4. Anticorpo per l'uso secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui la proteina di membrana è una proteina DMT in una qualsiasi isoforma.
5. Anticorpo per l'uso secondo la rivendicazione 3, in cui la proteina di membrana è ZIP14.
6. Anticorpo per l'uso secondo la rivendicazione 4, in cui la proteina di membrana è DMT1.
7. Anticorpo per l'uso secondo la rivendicazione 5 o 6, scelto tra un anticorpo anti-ZIP14 o un anticorpo anti-DMT1 o loro combinazioni.
8. Anticorpo per l'uso secondo le rivendicazioni 2-7, in cui il tumore è maligno.
9. Anticorpo per l'uso secondo le rivendicazioni 2-8, in cui il tumore è scelto tra un tumore a polmoni, bronchi o laringe; colon-retto; mammella; pancreas; prostata; fegato, colecisti e vie biliari; ovaie; cervello o altri distretti del sistema nervoso; midollo osseo o sangue (leucemia); ossa o articolazioni; tessuti molli (incluso cuore e vasi); linfonodi (linfoma) e milza; nasofaringe o cavo orale; ghiandole salivari; pleura, pericardio e peritoneo; tiroide o timo; esofago, stomaco o intestino tenue; utero; placenta; ghiandola surrenale; rene, vie urinarie o vescica; testicoli; cute.

10. Anticorpo per l'uso secondo le rivendicazioni 2-9, in cui il tumore è scelto tra mieloma multiplo, osteosarcoma di superficie ad alto grado, carcinoma a cellule di Merkel, coriocarcinoma, carcinoma anaplastico della tiroide, carcinoma midollare, sarcoma pleomorfo ad alto grado, sarcoma indifferenziato, linfoma anaplastico a grandi cellule, linfoma diffuso a grandi cellule, leucemia mieloide acuta, leucemia linfoblastica acuta, carcinoma dedifferenziato dei dotti salivari, carcinoma duttale invasivo scarsamente differenziato, carcinoma lobulare invasivo, carcinoma neuroendocrino (polmone), carcinoma squamocellulare scarsamente differenziato (utero, bronchi, cavo orale, timo, esofago), sarcoma stromale ad alto grado, carcinoma endometriale ad alto grado, carcinoma scarsamente coesivo (tipo sigillocellulare), adenocarcinoma scarsamente differenziato (pancreas, polmone, colon/retto, esofago, intestino tenue), carcinoma sarcomatoide, carcinoma oncocitico, mesotelioma maligno, melanoma nodulare, glioblastoma, seminoma anaplastico, neuroblastoma, carcinoma nasofaringeo indifferenziato, tumore stromale gastrointestinale di alto grado, colangiocarcinoma scarsamente differenziato, cistoadenocarcinoma sieroso o mucinoso di alto grado, adenocarcinoma acinare scarsamente differenziato.

Milano, 7 giugno 2019