



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

DOMANDA NUMERO	102008901620819
Data Deposito	22/04/2008
Data Pubblicazione	22/10/2009

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

ANTICORPO MONOCLONALE ISOLATO O SUO FRAMMENTO LEGANTE L'ANTIGENE SPECIFICO DI MEMBRANA DELLA PROSTATA, SUOI CONIUGATI E SUOI USI.

D E S C R I Z I O N E

del brevetto per Invenzione Industriale

di 1) UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI VERONA

di nazionalità italiana

con sede: VIA DELL'ARTIGLIERE, 8

VERONA (VR)

2) COLOMBATTI MARCO

di nazionalità italiana

residente: VIA C. BATTISTI, 178

SANT'ANNA D'ALFAEDO (VR)

Inventori: COLOMBATTI Marco, FRACASSO Giulio,
CINGARLINI Sara

La presente invenzione è relativa ad anticorpi monoclonali e loro frammenti leganti l'antigene, di seguito definiti scFv, come reagenti per la diagnosi ed il trattamento di tumori alla prostata e l'eradicazione/visualizzazione di cellule esprimenti alti livelli dell'antigene specifico di membrana della prostata (Prostate Specific Membrane Antigen), di seguito chiamato PSMA.

Il carcinoma prostatico è la forma più frequente di cancro nel sesso maschile (seguito dal carcinoma polmonare) e rappresenta la seconda causa di morte per

tumore.

Il carcinoma prostatico è all'esordio un tumore organo-confinato; nel trattamento di questa forma del tumore, la terapia chirurgica di asportazione della prostata e delle vescicole seminali e la radioterapia sono efficaci.

Tuttavia qualora il tumore venga diagnosticato in stadio avanzato e nei casi in cui la patologia evolve verso forme più aggressive, metastatiche ed androgeno-indipendenti, l'utilizzo di diversi approcci farmacologici è inefficace.

Pertanto in questi casi possono risultare quindi utili, al fine del trattamento di queste forme avanzate e metastatiche di carcinoma prostatico, le nuove strategie terapeutiche basate sull'immunoterapia passiva e specificamente sugli anticorpi monoclonali (moAb).

Per l'applicazione di tale terapia occorre individuare antigeni tumore-associati (TAA), cioè molecole espresse in modo specifico dal tessuto neoplastico, potenzialmente utilizzabili come target per la terapia immunologica.

Recenti studi suggeriscono che l'antigene specifico di membrana della prostata (PSMA, Prostate-

Specific Membrane Antigen), per alcune sue caratteristiche, possa rappresentare il bersaglio antigenico ideale nel carcinoma della prostata.

Il PSMA è una glicoproteina di circa 100 kD con un corto dominio intracellulare (aminoacidi 1-18), un dominio transmembrana (aminoacidi 19-43) e un dominio extracellulare (aminoacidi 44-750). E' espresso dalle cellule epiteliali prostatiche, sia normali che cancerose, ma con un livello di espressione notevolmente aumentato nel carcinoma prostatico; questo livello tende ad aumentare con la gravità e l'avanzare della patologia.

Al contrario, tessuti normali extraprostatici, come ad esempio i tubuli prossimali del rene, il duodeno e il colon, presentano una limitata espressione dell'antigene PSMA.

Come bersaglio delle immunoterapie antitumorali, il PSMA presenta il vantaggio di essere prevalentemente espresso a livello della prostata e di essere una proteina transmembrana presente sulla superficie cellulare che viene internalizzata dalla membrana cellulare attraverso vescicole endocitiche rivestite di clatrina. Tali caratteristiche rendono il PSMA sfruttabile per la terapia con immunotossine.

Vantaggiosamente, il legame di anticorpi o frammenti anticorpali al dominio extracellulare favorisce questo processo di endocitosi.

Sono noti numerosi anticorpi monoclonali in grado di legare il PSMA. Ad esempio il 7E11, approvato dalla FDA per lo studio di metastasi esprimenti PSMA, è un anticorpo monoclonale in grado di legare la porzione intracellulare del PSMA. Svantaggiosamente però il 7E11 non è in grado di legare cellule vitali, ma solo cellule necrotiche o apoptotiche all'interno di una massa tumorale.

Successivamente sono stati prodotti anticorpi monoclonali quali J591, J415, J533 ed E99 in grado di riconoscere epitopi presenti nel dominio extracellulare del PSMA e quindi capaci di legare anche cellule vitali.

In particolare il J591 è stato utilizzato per numerosi studi in vitro e in modelli animali sia a livello diagnostico che terapeutico ed è tuttora in fase di sperimentazione clinica.

In ultimo, EP1726650 descrive un ulteriore anticorpo monoclonale ed il suo frammento scFv in grado di legare PSMA.

Nel seguito con il termine "frammento

dell'anticorpo legante l'antigene" si intende uno o più frammenti di tale anticorpo che mantiene la capacità di legare specificamente il PSMA.

Per una migliore comprensione della presente invenzione, essa viene ora descritta anche con riferimento alle figure allegate che illustrano:

- la Figura 1 un Western Blotting eseguito su un lisato di cellule LNCaP (PSMA+) e PC-3 (PSMA-), utilizzando il moAb D2/B e come controllo l'anticorpo J591 già ampiamente descritto in letteratura;

- la figura 2 un saggio Western Blotting condotto su lisato di cellule LNCaP (PSMA+) su PC-3, cellule prive del bersaglio antigenico PSMA, impiegando scFv D2/B;

- le figura 3 a-d citofluorimetrie di D2/B e scFv D2/B su cellule PSMA+;

- la figura 4 a-d citofluorimetrie di D2/B e scFv D2/B su cellule PSMA-;

- la figura 5 confronto della capacità di legame a cellule LNCaP (PSMA+) di Ab J591, Ab D2/B, scFv D2/B;

- la figura 6 imaging in vivo con Ab D2/B coniugato al fluoroforo Cy5.5.

Scopo della presente invenzione è quindi quello di trovare nuovi anticorpi monoclonali per il trattamento

del carcinoma prostatico, che siano selettivi per le cellule tumorali, che consentano una diagnosi più precoce ed accurata e che costituiscano opzioni terapeutiche che permettano realmente di incidere sulla biologia della malattia in fase avanzata e metastatica in modo da fronteggiare con maggior successo una problematica socio-sanitaria di dimensioni sempre crescenti e dalle incerte prospettive di soluzione con i presidi terapeutici attuali.

Secondo la presente invenzione tale scopo viene raggiunto mediante un anticorpo monoclonale isolato o un suo frammento legante l'antigene secondo la rivendicazione 1, un suo coniugato secondo la rivendicazione 5, una composizione farmaceutica comprendente lo stesso secondo la rivendicazione 8. Viene inoltre fornito l'uso dell'anticorpo e del suo frammento, del coniugato e della composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 11.

Sulle cellule prostatiche il PSMA è espresso con una specifica struttura terziaria e quaternaria e gli anticorpi ottenuti con un PSMA isolato e denaturato non riconoscono in modo efficiente il PSMA espresso sulle cellule tumorali. Vantaggiosamente gli anticorpi e i loro frammenti secondo la presente invenzione sono in

grado di legare con alta affinità il PSMA nella sua forma nativa e possono quindi essere usati efficacemente sia in terapia che in diagnostica. In particolare, gli anticorpi monoclonali e i loro frammenti secondo l'invenzione sono in grado di legare PSMA in modo selettivo riducendo così gli effetti collaterali di una terapia non selettiva.

I frammenti di anticorpo utilizzati sono frammenti di anticorpo a singola catena (scFv) che hanno dimensioni e immunogenicità inferiori rispetto al corrispondente anticorpo. Tuttavia grazie alla piccola dimensione e alla minore affinità per l'antigene, hanno dimostrato un aumento della permeabilità nel microcircolo e una più facile interazione con l'antigene nel sito di legame dell'anticorpo.

Gli anticorpi monoclonali o i loro frammenti comprendono una seq. nucleotidica e aminoacidica peculiare a livello delle regioni variabili VH e VK che ne determinano specificità e affinità. Le sequenze nucleotidiche del moAb D2/B e del suo frammento scFv sono riportate come SEQ. ID. No: 1, 2, 3, 4. La sequenza specificata codifica per un frammento anticorpale dotato di buone capacità di legame all'antigene bersaglio PSMA

L'anticorpo monoclonale o un suo frammento come sopra descritti possono essere coniugati con un principio attivo per ottenere composti utilizzabili per radioimmunoterapia o imaging o ancora immunotossine ricombinanti.

Preferibilmente il principio attivo è un agente di marcatura, più preferibilmente un radionuclide selezionato tra ^{188}Re , ^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{187}Re , ^{111}In , ^{90}Y , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{177}Lu o nanoparticelle fluorescenti.

Alternativamente l' anticorpo monoclonale o un suo frammento possono essere coniugati con un agente citotossico, preferibilmente selezionato tra PE40, catena A della ricina, diantina, saporina.

Infine l'anticorpo monoclonale o un suo frammento possono essere coniugati con biotina per sfruttare l'alta affinità dell'interazione avidina-biotina o con altre coppie molecolari che permettano protocolli terapeutici a piu' step. In particolare, il coniugato con la biotina trova applicazione in tecniche di direccionamento in caso di trattamenti che prevedono l'uso di radioisotopi. Infatti vari studi preclinici hanno evidenziato la superiorità del pretargeting rispetto al targeting diretto; ad esempio Goldenberg D.M. et al. (J. Clin. Oncol., 24:823-834, 2006)

Si è evidenziato che la somministrazione di un coniugato dell'anticorpo secondo l'invenzione o di un suo frammento con biotina, prima della somministrazione di un radiofarmaco (Streptavidina e poi Biotina-radiomarcata), consente una migliore distribuzione al sito tumorale del radiofarmaco riducendone così gli effetti collaterali.

L'anticorpo monoclonale, i suoi frammenti e i suoi coniugati possono essere formulati in composizioni farmaceutiche con opportuni eccipienti e possono essere utilizzati per la preparazione di un medicamento per il trattamento o la diagnosi di tessuti tumorali overesprimenti l'antigene PSMA, un tumore, preferibilmente il tumore della prostata.

Per ottenere anticorpi monoclonali si procede con:

immunizzazione di topi di ceppo Balb/c, fusione delle cellule presenti nella milza dell'animale immunizzato con cellule di ibridoma, selezione in terreno HAT, identificazione degli ibridomi policlonali riconoscenti l'antigene di interesse, clonaggio, ricaratterizzazione per specificità/affinità degli ibridomi ora monoclonali, adattamento in terreni di crescita privi di HAT. Gli anticorpi sono poi purificati dal terreno di coltura dell'ibridoma

mediante tecniche biochimiche standard (cromatografia di affinità).

Ulteriori caratteristiche della presente invenzione risulteranno dalla descrizione che segue di alcuni esempi meramente illustrativi e non limitativi.

ESEMPI

Gli anticorpi monoclonali e gli scFv dell'invenzione sono stati caratterizzati mediante citofluorimetria a flusso e con western blot sulle seguenti linee cellulari di CaP umano, fornite dalla ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD): metastasi linfonodale di CaP (LNCaP), metastasi cerebrale di CaP (DU145), metastasi ossea di CaP (PC-3). Tali linee cellulari sono state mantenute in RPMI 1640 arricchito con siero fetale bovino (FBS) 10%, glutamina 2 mM, penicillina e streptomicina 100 U/ml. La temperatura di incubazione è stata di 37°C ed è stata usata CO₂ ad una concentrazione del 5%. Le cellule sono state ripiastrate 2-3 volte alla settimana, staccandole con una soluzione di PBS/EDTA 0,02% o PBS/Tripsina 0,05%/EDTA 0,02%.

Nel seguito si farà riferimento agli anticorpi secondo l'invenzione con l'acronimo "D2/B" e "scFv D2/B".

ESEMPIO 1

Preparazione dei moAb

L'anticorpo è stato ottenuto previa immunizzazione di topi Balb/c con lisati di membrana di cellule esprimenti l'antigene PSMA e con la forma ricombinante dello stesso antigene, mediante la tecnologia dell'ibridoma. Cellule ricavate dalla milza degli animali immunizzati comprendenti linfociti B sono state fuse con cellule di mieloma. Gli ibridomi prodotti, clonati per diluizione limite, caratterizzati per specificità ed affinità, crescono in opportuno terreno senza siero fetale. Gli anticorpi sono purificati dal sovranatante di coltura mediante cromatografia di affinità.

ESEMPIO 2

Test Elisa

Il test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) è una tecnica immunochimica utilizzata per rilevare la presenza di una molecola mediante il suo riconoscimento con anticorpi specifici.

Questo test è stato utilizzato per determinare l'isotipo dei moAb anti-PSMA precedentemente prodotti. Il kit usato (Hybridoma Subisotyping Kit, Calbiochem) ha permesso di identificare l'isotipo anticorpale tra

le sottoclassi IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM ed IgA; per l'esecuzione del test si rimanda alla scheda di utilizzo del prodotto.

I risultati, che sono riportati nella Tabella 1, mostrano come l'anticorpo D2/B sia una IgG1; la riga 2 della tabella (IgG1) presenta un valore di assorbanza di 4,0, contro un valore del controllo negativo (solo terreno di coltura) di 0,8. Il valore di assorbanza del D2/B, relativo alle altre sottoclassi di IgG è paragonabile a quello del controllo negativo. Nel test come controllo positivo è stato utilizzato siero murino che, come si evince dalla terza colonna, possiede anticorpi di quasi tutti gli isotipi.

Tabella 1

	D2/B	Controllo negativo	Siero topo
IgM	0,56	0,54	2,36
IgG ₁	4,00	0,81	1,75
IgG _{2a}	0,41	0,32	2,42
IgG _{2b}	0,30	0,25	1,84
IgG ₃	0,30	0,28	1,24
IgA	0,25	0,23	0,18

ESEMPIO 3

Dal moAb al scFv D2/B e relativa produzione.

Estratto mediante TRIzol (Gibco BRL) l'RNA totale dell'ibridoma D2/B, si è proceduto alla sintesi del cDNA utilizzando il kit SuperScript cDNA Synthesis (Invitrogen). Mediante PCR con opportuni primers Forward e Revers atti ad identificare le combinazioni capaci di amplificare le regioni variabili VH e VK del moAb D2/B, si sono identificate le coppie utili e quindi si è proceduto al clonaggio delle VH e VK in un vettore plasmidico che introduce all'N-terminale della proteina un Tag di 6 istidine. Il sequenziamento del vettore ha permesso di identificare la sequenza delle regioni VH e VK (SEQ ID 1, 2).

La produzione del scFv D2/B avviene in batteri E.Coli ceppo HB2151 cresciuti a 37°C in agitazione (225 rpm) in terreno 2xTY addizionato di ampicillina 100µg/ml, glucosio 0,1% ed indotti, raggiunta un'assorbanza a 600nm di 0,8, con IPTG 1mM finale per 3h a 37°C. I batteri raccolti mediante centrifugazione a 5.000 rpm +4°C per 10 min. sono trattati per 1h con il tampone Tris-HCl 30 mM pH=8,0+EDTA 1mM+saccarosio 20%; ottenuto per separazione in centrifuga il sovranatante che è la frazione periplasmatica si procede alla purificazione del scFv D2/B mediante cromatografia su resina NiNTA (Novagen) eluendo con Tris 20mM pH=8,0+250 mM

Imidazolo.

La purezza della proteina è stata verificata in SDS-PAGE.

ESEMPIO 4

Western Blotting

Al fine di verificare la potenzialità di riconoscimento in Western Blot dell'anticorpo D2/B è stato eseguito un SDS-PAGE su gel di poliacrilamide 10% dei lisati cellulari di LNCaP PSMA+ e PC-3 PSMA-. La lisi è stata precedentemente effettuata mediante sonicazione in una soluzione di Tris 20 mM, NaCl pH 8,0 150 mM, TRITON X 100 1% e inibitori delle proteasi (Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche). In ogni pozzetto sono stati caricati χ μ l di lisato corrispondenti a circa 100 μ g di proteine totali; per la procedura di esecuzione del gel e le condizioni di separazione delle proteine ci si riferisce al protocollo di Laemmli. Successivamente le proteine separate sul gel sono state trasferite mediante un campo elettrico su una membrana di nitrocellulosa (procedura definita, Western Blot).

Per verificare il riconoscimento dell'antigene PSMA si è proceduto all'incubazione per tutta la notte a 4°C in leggera agitazione della membrana in presenza

dell'anticorpo primario anti-PSMA D2/B e dell'Ab di controllo J591 entrambi alla concentrazione di 10-20 µg/ml in soluzione al 5% di latte scremato in TBST. L'eccesso di anticorpo è stato eliminato mediante 4 lavaggi in TBST.

E' stato poi utilizzato un anticorpo secondario anti-topo HRP diluito 1:1.000 in latte scremato al 5% in TBST; l'incubazione ha avuto una durata di 1 ora a temperatura ambiente in agitazione.

Dopo 3 lavaggi in TBST e 1 lavaggio in PBS, il segnale è stato rilevato tramite sviluppo con chemiluminescenza (ECL Amersham Biosciences, UK).

La Figura 1 mostra un Western Blotting condotto su lisato di cellule LNCaP (PSMA+) e PC-3 (PSMA-), utilizzando come controllo l'anticorpo J591 già ampiamente descritto in letteratura; come si può osservare il D2/B riconosce l'antigene presente nel lisato cellulare come il J591 (corsie 1 e 2 rispettivamente). Si può inoltre vedere che su lisato di cellule antigene-negative (PC-3) non vi è segnale (corsie 3 e 4 per D2/B e J591, rispettivamente).

Similmente è stata verificata la funzionalità di riconoscimento in Western Blot del scFv D2/B, utilizzando gli stessi lisati cellulari, ma impiegando

in questo caso come anticorpo secondario un anti-myc Tag ottenuto in coniglio (Sigma) e come anticorpo terziario un anti-coniglio-HRP (Sigma). Il scFv D2/B riconosce PSMA nel lisato di LNCaP e non dà segnale se saggiato su lisato di PC-3, cellule prive del bersaglio antigenico PSMA. (Figura 2)

ESEMPIO 5

Immunofluorescenza

La linea cellulare LNCaP (PSMA+) è stata fatta crescere su vetrino coprioggetto polilisinato in una piastra da 24 pozzetti. Al momento di procedere con l'immunofluorescenza è stato aspirato il terreno e sono stati eseguiti 2 lavaggi con PBS.

Le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 2%, applicata per 10 minuti a temperatura ambiente e sono stati eseguiti 3 ulteriori lavaggi con PBS per eliminare l'eccesso di fissante.

Le cellule sono state incubate a temperatura ambiente per 1 ora in presenza dell'anticorpo primario α -PSMA alla concentrazione di 10 μ g/ml. Sono stati utilizzati l'anticorpo D2/B, il 7E11 per un confronto con un anticorpo già studiato, un α -MHC di classe I come controllo positivo e un controllo isotipico, come controllo negativo.

L'eccesso di anticorpo è stato eliminato mediante 4 lavaggi con una soluzione di BSA 0.2% in PBS.

L'incubazione con l'anticorpo secondario α -mouse FITC (fluoresceina, Beckman Coulter, USA) diluito 1:200 è avvenuta per 1 ora a temperatura ambiente.

Dopo 2 ulteriori lavaggi con PBS sono state aggiunte 2 gocce di PBS/glicerolo 1:1 ed il vetrino è stato montato e sigillato.

Il risultato è stato osservato al microscopio a fluorescenza Axioskop 20 (Carl Zeiss, Germania).

Il monoclonale D2/B è in grado di riconoscere specificamente cellule LnCAP (PSMA+) ma non evidenzia segnale utilizzando cellule prive dell'antigene PSMA (es. linea cellulare DU145).

ESEMPIO 6

Immunoistochimica su sezioni paraffinate

Sezioni di CaP umano paraffinate sono state utilizzate per valutare la capacità di riconoscimento di tessuti tumorali del moAb D2/B in confronto al già noto anticorpo J591. Le sezioni sparaffinate in stufa a 60°C (30'-60'), trattate con Xilolo 4' per 5 volte, reidratate sequenzialmente in etanolo: 100%, 95%, 75% 3' per 2 volte ciascuno ed immerse in H₂O per 5' sono state incubate per smascherare l'antigene PSMA in

pentola a pressione in tampone citrato 10mM PH 6 per 15' a 95°C. Dopo 3 lavaggi in PBS 5', una incubazione in PBS + 3% H₂O₂ per 6' ed ulteriori 3 lavaggi in PBS 5', si sono saturati i preparati con PBS+BSA1% 30-40 min; l'incubazione con Ab primario (D2/B o J591, entrambi 2µg/ml) è stata condotta O/N a 4°C; dopo 3 lavaggi con PBS 5' è stato utilizzato il kit EnVision Detection System HRP/DAB (Dako) seguendo le istruzioni riportate dalla ditta.

La controcolorazione è stata eseguita con Ematossilina di Gill per 5", lavando poi con abbondante H₂O, successivamente con una scala alcolica sequenziale di etanolo al 75%, 80%, 95%, 100% e poi con Xilolo 5' per 4 volte. I vetrini sono stati montati con resina ed osservati al microscopio ottico.

ESEMPIO 7

Citofluorimetria

La citofluorimetria è una metodica che permette di valutare alcuni parametri fisici e chimici di particelle contenute in una sospensione. Tramite l'uso di una luce laser e di rilevatori ottici, il sistema raccoglie la fluorescenza emessa da un fluorocromo (sostanza organica in grado di emettere una

fluorescenza se opportunamente eccitata) legato ad un anticorpo monoclonale specifico per molecole espresse sulla superficie e/o nel citoplasma della cellula in esame. Il segnale raccolto viene quindi convertito in un segnale analogico/digitale.

Questa metodica è stata utilizzata per verificare alcuni parametri molto importanti quali:

1) La specificità, cioè la capacità dei moAb prodotti (D2/B e scFv D2B) di legare l'antigene sulla membrana di cellule positive e di non legarsi in maniera aspecifica a cellule negative;

2) La concentrazione saturante i siti anticorpali espressi su cellule LNCaP, rispetto ad un anticorpo di controllo il J591.

Cellule LNCaP e PC-3 in incubazione a 37°C sono state staccate con Tripsina/EDTA per circa 4 minuti a 37°C, neutralizzate con terreno completo, lavate 2 volte con 10 ml di una soluzione fredda di PBS/BSA 0,2%, centrifugando sempre a 1000 rpm, per 5 min. a 4°C ed alla fine incubate in numero di 200.000-300.000/0.5ml con D2/B, J591 ed un controllo isotipico per 1 ora a 4°C. Dopo 2 lavaggi con 3 ml di PBS/BSA 0,2% alla temperatura di 4°C per eliminare l'eccesso di anticorpo primario, le cellule, risospese in 100 µl di

PBS/BSA 0,2%, sono state incubate per 30 minuti a 4°C in presenza di una concentrazione saturante (circa 1 µg/100 µl) di anticorpo secondario, IgG di capra anti-IgG di topo, marcato con FITC (fluoresceina).

Finita l'incubazione, eseguito un ulteriore lavaggio e risospe le cellule in 500 µl di PBS/BSA 0,2% si è proceduto all'analisi con un citofluorimetro (BD FACSCanto). Per evidenziare il legame di scFv D2/B come anticorpo secondario si è invece usato un anti-myc Tag di mouse e poi come anticorpo terziario IgG di capra anti-IgG di topo, marcato con FITC,

I parametri presi in considerazione analizzando i dati sono stati: la fluorescenza media della popolazione cellulare (MFI) e la percentuale di cellule che si posizionavano nei canali compresi tra i valori di fluorescenza 500 e 256.000, considerando positive le cellule entro questo range.

Per verificare la capacità di legame del moAb, le cellule LNCaP sono state incubate con concentrazioni scalari degli anticorpi anti-PSMA D2/B e scFvD2B e con l'anticorpo J591 di cui è nota l'affinità. In base ai valori di MFI ottenuti è stata costruita una curva di binding nella quale il valore del 100% di saturazione dei siti antigenici è stato fatto corrispondere alla

concentrazione in cui si è registrato il massimo valore di fluorescenza.

Come si può evincere dalle Figure 3.A e 3.B gli anticorpi D2/B e scFv D2/B riconoscono l'antigene espresso sulla membrana della linea cellulare LNCaP con un valore di MFI di circa 8.000 e 1.500 rispettivamente. Le Figure 3.C e 3.D sono i rispettivi controlli negativi. Con la stessa metodica, si è valutata anche la specificità dei moAb andando ad analizzare il legame aspecifico a cellule antigene-negative, PC-3 (metastasi ossea di CaP); i risultati, riassunti nelle Fig. 4.A e 4.B evidenziano la mancanza di legame di moAb D2/B e di scFv D2/B, rispettivamente. Le Fig. 4.C e 4.D sono i rispettivi controlli negativi.

La misura della concentrazione di J591, D2/B e scFv D2/B saturante i siti antigenici (PSMA) presenti su cellule LNCaP è riportata in Figura 5.

ESEMPIO 8

Sintesi delle immunotossine coniugate chimicamente alla RTA

Lo schema di sintesi delle immunotossine prodotte è stato il seguente.

L'anticorpo D2/B da coniugare è stato fatto passare su una colonna di affigel blu per eliminare quella

frazione di moAb capace di legarsi alla resina che contaminando la preparazione della Immunotossina ne inficierebbe i test di citotossicità. Il D2/B dializzato in PBS, è stato coniugato allo SMPT(4-succinimidilossicarbonil-a-metil-a-(2-piridiltio)toluene, Pierce, Rockford IL) disciolto alla concentrazione 10 mM in dimetilformamide anidra, utilizzando un rapporto IgG:derivatizzante 1:2,5 circa.

L'eccesso di cross-linker è stato poi eliminato mediante gel filtrazione su colonnine PD-10 (Pharmacia, Uppsala, Svezia).

Il numero dei gruppi SH inseriti, corrispondenti al numero di possibili legami anticorpo-tossina è stato determinato in base al fatto che il DTT, riducendo i gruppi tiolici, libera il piridin-2-tione la cui quantità è valutata spettrofotometricamente mediante lettura a 343 nm. Questo valore risultava essere compreso tra 1,2 e 1,5.

La RTA ricombinante, prodotta e purificata secondo il protocollo descritto da Chignola et al. (J.Biol.Chem., 270:23345-51, 1995) è stata trattata con DTT (ditiotreitolo) 25 mM a temperatura ambiente per 2 ore per ridurre le cisteine e renderle reattive per la coniugazione.

Il DTT è stato successivamente eliminato mediante colonnine PD-10 e la tossina, ridotta e purificata, è stata concentrata con Centricon-10 (Amicon, Beverly, MA).

La reazione di coniugazione tra l'anticorpo D2/B derivatizzato e la RTA è stata fatta avvenire per 48 ore a temperatura ambiente.

L'immunotossina così ottenuta è stata purificata mediante gel filtrazione su una colonna TSK3000SW (Beckman, San Ramon, CA), con flusso 0,5 ml/min. e PBS come eluente.

I picchi corrispondenti ai PM 180-150 (D2/B+1 RTA) e 240-210 kDa (Ab+2/3 RTA) sono stati ulteriormente purificati su affigel blu, utilizzando un gradiente salino da 150 mM a 1 M di NaCl in tampone fosfato 5 mM. Questo perché la sola tossina ha un peso di 30 kDa, mentre l'anticorpo di 150 kDa.

E' stata quindi utilizzata una colonnina di affigel blu perché la sua matrice è capace di legare enzimi che utilizzano come coenzima il NAD o che hanno come substrato sequenze nucleotidiche, come la RTA; per questi motivi essa è in grado di legare in modo specifico la RTA coniugata al D2/B e di lasciar passare l'anticorpo libero.

Le frazioni contenenti proteina sono state riunite, concentrate su Centricon-10, dializzate contro PBS. La concentrazione è stata stimata allo spettrofotometro e quindi i vari pool sono stati sterilizzati per filtrazione.

ESEMPIO 9

Produzione delle immunotossine di fusione genica scFv D2/B-PE40 (la sequenza nucleotidica SEQ. ID. No. 5.

La sequenza del scFv D2/B è stata clonata in un vettore pET11d tra i siti Nco I e Hind III; a valle del sito Hind III nel vettore è inserita la sequenza genica della tossina PE40.

La proteina di fusione viene prodotta in batteri E.coli ceppo BL21(DE3)pLysS precedentemente trasformati con il vettore plasmidico codificante per la Immunotossina; i batteri cresciuti a 37°C sotto agitazione (225rpm) in terreno LB addizionato di glucosio 5%, MgSO₄ 0,05% ampicillina 100µg/ml, cloramfenicolo 34µg/ml sono indotti, raggiunta un'assorbanza a 600nm di 0,8, con IPTG 1mM finale. Dopo 3h i batteri raccolti mediante centrifugazione a 5.000 rpm sono lisati mediante incubazione e sonicazione in tampone di lisi (Tris 20mM pH=7,5+EDTA 10mM+Triton-X100 1%) addizionato di lisozima 0,1mg/ml, PMSF 0,1 mM,

inibitori di proteasi (Roche). Mediante centrifugazione a 10.000 rpm a +4°C si raccolgono i corpi di inclusione (CI) che vengono lavati 2 volte nello stesso tampone di lisi e poi solubilizzati alla concentrazione di 20mg/ml in tampone CAPS 50mM pH=11 addizionato di N-laurilsarcosina 0,8-1% finale e DTT 1mM. Eliminati per centrifugazione eventuali residui insolubili, la proteina è rifoldata mediante dialisi ripetute. Dialisi I e II sono di 12h a +4°C in Tris 20mM pH=8,5+DTT 0,1mM+PMSF 0,1 mM, dialisi III e IV sono di 12h in Tris 20mM pH=8,5+PMSF 0,1 mM, dialisi V 24h in Tris 0,1 M pH=8,0+L-glutathione ridotto 5mM+L-glutathione ossidato 0,5 mM+L-Arginina 0,4 M+PMSF 0,1 mM, dialisi VI 24h in Tris 20mM pH=7,4+PMSF 0,1mM.

La proteina è stata quindi purificata mediante 2 passaggi su colonne QAE da 10ml (Bio-Rad) utilizzando un cromatografo FPLC (Bio-Rad) ed impiegando un gradiente lineare di NaCl da 0 a 0,5 M in Tris 20mM pH=7,4 della durata di 200 ml al flusso di 1 ml/min, con frazioni raccolte del volume di 2,5 ml.

La purezza della proteina è stata valutata in SDS-PAGE e l'identificazione è stata confermata mediante Western Blot.

ESEMPIO 10

Citotossicità su cellule in monostrato

E' stato valutato l'effetto citotossico dell'immunoconiugato prodotto in cellule PSMA positive e negative a livello di inibizione della proliferazione cellulare, anche a confronto con gli effetti della sola tossina.

Le cellule LNCaP e PC-3 sono state distribuite in piastre da 96 pozzetti in terreno completo a concentrazioni tali da raggiungere, nei pozzetti di controllo, dopo le 32 ore del test, una condizione di subconfluenza.

Alcuni pozzetti sono stati trattati con concentrazioni scalari delle immunotossine D2/B-RTA (ottenuta per coniugazione chimica mediante SMPT) o scFv D2/B-PE40 (ottenuta mediante fusione genica) o come controllo della immunotossina J591-RTA (ottenuta per coniugazione chimica mediante SMPT), altri con la sola RTA, PE o la PE40, il solo moAb D2/B o scFv D2/B per un tempo di incubazione di 22 ore a 37°C.

Ad ogni pozzetto è stato addizionato 1 µCi [metil-3H]-timidina (61,7 Ci/mmlo, NEN DuPont) e la piastra è stata incubata per ulteriori 10 ore sempre a 37°C.

Le cellule sono state raccolte su filtri con un cell-harvester e la radioattività è stata misurata

mediante scintillazione liquida con un β -counter.

L'effetto citocida è stato espresso in termini di incorporazione di timidina triziata rispetto ad un controllo di cellule non trattate; i risultati sono stati rielaborati in termini di percentuale di inibizione della proliferazione. Quanto minore era l'entità dell'emissione radioattiva, minore incorporazione di timidina triziata, tanto maggiore poteva essere considerata l'inibizione della crescita cellulare.

E' stata quindi calcolata la IC50, cioè la concentrazione di farmaco in grado di inibire del 50% la proliferazione cellulare; misura che poteva essere facilmente comparata con la IC50 relativa alle altre molecole utilizzate nel saggio di citotossicità.

TABELLA 2

	LNCaP	PC-3
	PSMA+	PSMA-
	ng/ml	ng/ml
U591-smpt-RTA	7,4	>1.260
D2/B-smpt-RTA	21	>16.800
scFv D2/B-PE40	1,3	>6.500
moAb D2/B	>6.000	>6.000
scFv D2/B	> 3.300	> 3.300
PE tossina	2,4	3,4
PE40 tossina	1.950	
RTA tossina	12.000	9.000

ESEMPIO 11

scFv D2/B monobiotinilati

scFv D2/B monobiotinilati sono stati ottenuti clonando tra i siti NcoI-NotI lo scFv; nel vettore in posizione 3' rispetto al sito NotI sono state inserite in sequenza: una sequenza peptidica ricavata dalla regione "cerniera" delle IgA, una regione peptidica definita BAD (Biotin Acceptor Domain) ed una regione clivabile riconosciuta dalle proteasi Enterochinasi e Fattore X. La regione "cerniera" delle IgA funge da spacer tra lo scFv e la regione BAD, che viene monobiotinilata in una reazione catalizzata dall'enzima BirA. La produzione della proteina biotinilata è stata condotta in batteri

trasformati con il plasmide di interesse e capaci di biotinilare il sito BAD; mediante induzione con IPTG ed aggiunta di biotina al terreno di coltura si ottengono le proteine di interesse comprendenti ciascuna la porzione scFv con la desiderata specificità unitamente ad una molecola di biotina.

La proteina scFv-biotina è stata purificata su resina NiNTA in condizioni parzialmente denaturanti per meglio facilitare l'esposizione del Tag N terminale di 5 Istidine (His) e quindi il legame alla colonna. La purezza della proteina ottenuta è stata analizzata mediante SDS-PAGE mentre la corretta identità è stata confermata in Western Blot mediante utilizzo di Ab anti-scFv, Ab anti-His Tag e di streptavidina-HRP.

E' stata quindi valutata la funzionalità del scFv-biotinilato da noi sintetizzato, mediante analisi al FACS condotta su cellule PSMA+ (LNCaP) e PSMA- (PC-3). La MIF su LNCaP è di 161, 728 e 314 rispettivamente per il controllo negativo (solo Avidina-FITC), l'Ab D2/B biotinilato chimicamente ed il scFv-D2/B biotinilato enzimaticamente, mentre i rispettivi valori su PC-3 sono 132, 151, 180.

ESEMPIO 12

Esempio di imaging in vivo con D2/B marcato con traccianti fluorescenti

Riguardo alla possibilità di utilizzare metodiche di immuno-imaging in vivo basati sull'uso di D2/B o scFv D2/B marcati con tracers fluorescenti topi SCID immunodeficienti sono stati iniettati con cellule LNCaP premarcate in vitro un D2/B legato al fluorocromo Cy5.5 secondo il protocollo del produttore. Tale metodica ci ha consentito di rilevare un impianto s.c. di $7,5 \cdot 10^6$ cellule PSMA+, ma si pensa di poter arrivare a sensibilità maggiori (10^6 cellule). Figura 6

ESEMPIO 13

Esempio di coniugazione con un isotopo radioattivo

La scelta del chelante da coniugare all'Ab è subordinata alla scelta dei radionuclidi che si intendono impiegare; inoltre il chelante deve possedere un gruppo funzionale disponibile per il legame all'Ab. Ad esempio il DOTA può coniugarsi direttamente per mezzo di uno dei 4 carbossili liberi; l'Ab concentrato, lavato con 1% DTPA (pH=5,0), dializzato in tampone fosfato 0,1M pH=7,0 e fatto reagire con esteri in forma attiva del DOTA. Gli esteri attivi si ottengono solubilizzando DOTA 0,361 mmol (146 mg) assieme a 0,313 mmol (36 mg) di N-idrossisuccinimide in 2 ml di H₂O,

aggiustando a pH=7,3 con NaOH prima di aggiungere 10 mg di 1-etil-3-(dimetilaminopropil)carbodiimide. La miscela viene incubata per 1 h in ghiaccio prima di aggiungere l'Ab da derivatizzare. L'eccesso di DOTA è eliminato o per gel filtrazione (colonne PD-10) o per centrifugazione (concentratori Amicon), usando una soluzione di ammonio acetato 0,3 M. La marcatura con ^{111}In viene condotta aggiungendo $^{111}\text{InCl}_3$ in 0,01M HCl alla soluzione 0,3 M in ammonio acetato del DOTA-Ab. Dopo 20 min. a 37°C la miscela di reazione è separata su colonne Biogel-P6 equilibrate in 1%HSA-PBS. La quantità di radioisotopo libero ancora presente viene valutata mediante cromatografia TLC.

SEQUENCE LISTING

<110> Università di Verona

<120> ANTICORPO MONOCLONALE ISOLATO O SUO FRAMMENTO LEGANTE L'ANTIGENE SPECIFICO DI MEMBRANA DELLA PROSTATA, SUOI CONIUGATI E SUOI USI

<130> 840-07

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 366

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> V_region

<222> (1)..(366)

<223> Ab D2/B Variable heavy chain

<220>

<221> misc_feature

<222> (97)..(114)

<223> CDRH1

<220>

<221> misc_feature

<222> (157)..(204)

<223> CDRH2

<220>

<221> misc_feature

<222> (301)..(336)

<223> CDRH3

<400> 1

atggccgagg tgaagctcca ggagtcagga cctggcctcg ttaaaccctc tcagtctctg	60
tctctcacct gctctgtcac tggctactcc atcaccagtg gttattactg gaactggatc	120
cggcagtttc caggaaacaa actggagtg atgggctcca taagtttcga cggtacaat	180
aactacaacc catctctcag aaatcgaatc tccatcactc gtgacacatc taagaaccag	240
ttttttctga agttgaattc tgtgactact gaagacacag ctacatatta ctgtgcaaga	300
gagggagatt actacggtag tagcttcttt acttactggg gccaagggac tctggtcact	360
gtctcg	366

<210> 2

<211> 327

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> V_region

<222> (1)..(327)

<223> Ab D2/B variable light chain

<220>

<221> misc_feature

<222> (76)..(108)

<223> CDRL1

<220>

<221> misc_feature

<222> (154)..(174)

<223> CDRL2

<220>

<221> misc_feature

<222> (271)..(294)

<223> CDRL3

<400> 2

gcactcgaca ttgtgatgac tcagtctcca gttcactgt ctgcatctgt gggagaaact 60

gtcaccctca catgtggagc aagtgagaat atttacggtg ctttaaattg gtatcagcgg 120

aaacagggaa aatctcctca actcctgata tatggagcaa ccaacttggc agatggcatg 180

tcatacgaggt tcagtggcag cggatctggt agacagtatt ctctcaagat cagtagcctg 240

catcctgacg atgttgcaac gtattactgt caaatgtgt ttcgtactta cacgttcgga 300

gggggggacaa agttggaaat aaaacgg 327

<210> 3

<211> 822

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(822)

<223> scFv D2/B

<220>

<221> V_region

<222> (1)..(366)

<223> scFv D2/B variable heavy chain

<220>

<221> V_region

<222> (415)..(741)

<223> scFv D2/B variable light chain

<400> 3

atg gcc gag gtg aag ctc cag gag tca gga cct ggc ctc gtt aaa cct 48

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

1

5

10

15

tct cag tct ctg tct ctc acc tgc tct gtc act ggc tac tcc atc acc 96

Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr

20

25

30

agt ggt tat tac tgg aac tgg atc cgg cag ttt cca gga aac aaa ctg 144

Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu

35

40

45

gag tgg atg ggc tcc ata agt ttc gac ggt aac aat aac tac aac cca 192

Glu Trp Met Gly Ser Ile Ser Phe Asp Gly Asn Asn Asn Tyr Asn Pro

50

55

60

tct ctc aga aat cga atc tcc atc act cgt gac aca tct aag aac cag 240

Ser Leu Arg Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln

65

70

75

80

ttt ttt ctg aag ttg aat tct gtg act act gaa gac aca gct aca tat	288
Phe Phe Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr	
	85
	90
	95
tac tgt gca aga gag gga gat tac tac ggt agt agc ttc ttt act tac	336
Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Phe Phe Thr Tyr	
	100
	105
	110
tgg ggc caa ggg act ctg gtc act gtc tcg agt ggt gga ggc ggt tca	384
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser	
	115
	120
	125
ggc gga ggt ggc tct gga ggt ggc ggt agt gca ctc gac att gtg atg	432
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Leu Asp Ile Val Met	
	130
	135
	140
act cag tct cca gct tca ctg tct gca tct gtg gga gaa act gtc acc	480
Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr	
	145
	150
	155
	160
ctc aca tgt gga gca agt gag aat att tac ggt gct tta aat tgg tat	528
Leu Thr Cys Gly Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Ala Leu Asn Trp Tyr	
	165
	170
	175
cag cgg aaa cag gga aaa tct cct caa ctc ctg atc tat gga gca acc	576
Gln Arg Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Thr	
	180
	185
	190
aac ttg gca gat ggc atg tca tcg agg ttc agt ggc agc gga tct ggt	624
Asn Leu Ala Asp Gly Met Ser Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly	
	195
	200
	205
aga cag tat tct ctc aag atc agt agc ctg cat cct gac gat gtt gca	672
Arg Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Ser Ser Leu His Pro Asp Asp Val Ala	
	210
	215
	220
acg tat tac tgt caa aat gtg ttt cgt act tac acg ttc gga ggg ggg	720
Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Phe Arg Thr Tyr Thr Phe Gly Gly Gly	
	225
	230
	235
	240
aca aag ttg gaa ata aaa cgg gcg gcc gca cat cat cat cac cat cac	768
Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala His His His His His His	
	245
	250
	255
ggg gcc gca gaa caa aaa ctc atc tca gaa gag gat ctg aat ggg gcc	816
Gly Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala	
	260
	265
	270
gca tag	822
Ala	

<210> 4
 <211> 273
 <212> PRT
 <213> Mouse

<400> 4

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

1

5

10

15

Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr

20

25

30

Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu
 35 40 45
 Glu Trp Met Gly Ser Ile Ser Phe Asp Gly Asn Asn Asn Tyr Asn Pro
 50 55 60
 Ser Leu Arg Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
 65 70 75 80
 Phe Phe Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Phe Phe Thr Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Leu Asp Ile Val Met
 130 135 140
 Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr
 145 150 155 160
 Leu Thr Cys Gly Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Ala Leu Asn Trp Tyr
 165 170 175
 Gln Arg Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Thr
 180 185 190
 Asn Leu Ala Asp Gly Met Ser Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 195 200 205
 Arg Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Ser Ser Leu His Pro Asp Asp Val Ala
 210 215 220
 Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Phe Arg Thr Tyr Thr Phe Gly Gly Gly
 225 230 235 240
 Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala His His His His His His
 245 250 255
 Gly Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala
 260 265 270
 Ala

<210> 5
 <211> 1830
 <212> DNA

<213> Mouse and Bacteria

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1830)

<223> scFv D2/B-PE40

<220>

<221> V_region

<222> (1)..(738)

<223> scFv D2/B variable heavy and light chain region

<220>

<221> misc_feature

<222> (739)..(1830)

<223> PE40 Toxin Sequence

<400> 5

atg	gcc	gag	gtg	aag	ctc	cag	gag	tca	gga	cct	ggc	ctc	gtt	aaa	cct	48
Met	Ala	Glu	Val	Lys	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	
1				5					10					15		

tct	cag	tct	ctg	tct	ctc	acc	tgc	tct	gtc	act	ggc	tac	tcc	atc	acc	96
Ser	Gln	Ser	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ser	Val	Thr	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	
			20					25					30			

agt	ggc	tat	tac	tgg	aac	tgg	atc	cgg	cag	ttt	cca	gga	aac	aaa	ctg	144
Ser	Gly	Tyr	Tyr	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Phe	Pro	Gly	Asn	Lys	Leu	
		35					40					45				

gag	tgg	atg	ggc	tcc	ata	agt	ttc	gac	ggc	aac	aat	aac	tac	aac	cca	192
Glu	Trp	Met	Gly	Ser	Ile	Ser	Phe	Asp	Gly	Asn	Asn	Asn	Tyr	Asn	Pro	
	50					55					60					

tct	ctc	aga	aat	cga	atc	tcc	atc	act	cgt	gac	aca	tct	aag	aac	cag	240
Ser	Leu	Arg	Asn	Arg	Ile	Ser	Ile	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	
65					70					75					80	

ttt	ttt	ctg	aag	ttg	aat	tct	gtg	act	act	gaa	gac	aca	gct	aca	tat	288
Phe	Phe	Leu	Lys	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	
				85					90					95		

tac	tgt	gca	aga	gag	gga	gat	tac	tac	ggc	agt	agc	ttc	ttt	act	tac	336
Tyr	Cys	Ala	Arg	Glu	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	Phe	Phe	Thr	Tyr	
			100					105					110			

tgg	ggc	caa	ggg	act	ctg	gtc	act	gtc	tcg	agt	ggc	gga	ggc	ggc	tca	384
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	
		115					120					125				

ggc	gga	ggc	ggc	tct	gga	ggc	ggc	ggc	agg	gca	ctc	gac	att	gtg	atg	432
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Leu	Asp	Ile	Val	Met	
	130					135					140					

act	cag	tct	cca	gct	tca	ctg	tct	gca	tct	gtg	gga	gaa	act	gtc	acc	480
Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Glu	Thr	Val	Thr	
145					150					155					160	

ctc	aca	tgt	gga	gca	agt	gag	aat	att	tac	ggc	gct	tta	aat	tgg	tat	528
Leu	Thr	Cys	Gly	Ala	Ser	Glu	Asn	Ile	Tyr	Gly	Ala	Leu	Asn	Trp	Tyr	
				165					170					175		

cag	cgg	aaa	cag	gga	aaa	tct	cct	caa	ctc	ctg	atc	tat	gga	gca	acc	576
Gln	Arg	Lys	Gln	Gly	Lys	Ser	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gly	Ala	Thr	
			180					185					190			

aac	ttg	gca	gat	ggc	atg	tca	tcg	agg	ttc	agt	ggc	agc	gga	tct	ggc	624
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Asn	Leu	Ala 195	Asp	Gly	Met	Ser	Ser 200	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser 205	Gly	Ser	Gly	
aga Arg	cag Gln 210	tat Tyr	tct Ser	ctc Leu	aag Lys	atc Ile 215	agt Ser	agc Ser	ctg Leu	cat His	cct Pro 220	gac Asp	gat Asp	gtt Val	gca Ala	672
acg Thr 225	tat Tyr	tac Tyr	tgt Cys	caa Gln	aat Asn 230	gtg Val	ttt Phe	cgt Arg	act Thr	tac Tyr 235	acg Thr	ttc Phe	gga Gly	ggg Gly	ggg Gly 240	720
aca Thr	aag Lys	ttg Leu	gaa Glu	ata Ile 245	aaa Lys	gct Ala	ttc Phe	ggc Gly	ggc Gly 250	agc Ser	ctg Leu	gcc Ala	gcg Ala	ctg Leu 255	acc Thr	768
gcg Ala	cac His	cag Gln	gct Ala 260	tgc Cys	cac His	ctg Leu	ccg Pro	ctg Leu 265	gag Glu	act Thr	ttc Phe	acc Thr	cgt Arg 270	cat His	cgc Arg	816
cag Gln	ccg Pro	cgc Arg 275	ggc Gly	tgg Trp	gaa Glu	caa Gln	ctg Leu 280	gag Glu	cag Gln	tgc Cys	ggc Gly 285	tat Tyr 285	ccg Pro	gtg Val	cag Gln	864
cgg Arg	ctg Leu 290	gtc Val	gcc Ala	ctc Leu	tac Tyr	ctg Leu 295	gcg Ala	gcg Ala	cgg Arg	ctg Leu	tgc Ser 300	tgg Trp	aac Asn	cag Gln	gtc Val	912
gac Asp 305	cag Gln	gtg Val	atc Ile	cgc Arg	aac Asn 310	gcc Ala	ctg Leu	gcc Ala	agc Ser	ccc Pro 315	ggc Gly	agc Ser	ggc Gly	ggc Gly	gac Asp 320	960
ctg Leu	ggc Gly	gaa Glu	gcg Ala	atc Ile 325	cgc Arg	gag Glu	cag Gln	ccg Pro	gag Glu 330	cag Gln	gcc Ala	cgt Arg	ctg Leu	gcc Ala 335	ctg Leu	1008
acc Thr	ctg Leu	gcc Ala	gcc Ala 340	gcc Ala	gag Glu	agc Ser	gag Glu	cgc Arg 345	ttc Phe	gtc Val	cgg Arg	cag Gln	ggc Gly 350	acc Thr	ggc Gly	1056
aac Asn	gac Asp	gag Glu 355	gcc Ala	ggc Gly	gcg Ala	gcc Ala	aac Asn 360	gcc Ala	gac Asp	gtg Val	gtg Val	agc Ser 365	ctg Leu	acc Thr	tgc Cys	1104
ccg Pro	gtc Val 370	gcc Ala	gcc Ala	ggt Gly	gaa Glu	tgc Cys 375	gcg Ala	ggc Gly	ccg Pro	gcg Ala	gac Asp 380	agc Ser	ggc Gly	gac Asp	gcc Ala	1152
ctg Leu 385	ctg Leu	gag Glu	cgc Arg	aac Asn	tat Tyr 390	ccc Pro	act Thr	ggc Gly	gcg Ala	gag Glu 395	ttc Phe	ctc Leu	ggc Gly	gac Asp	ggc Gly 400	1200
ggc Gly	gac Asp	gtc Val	agc Ser	ttc Phe 405	agc Ser	acc Thr	cgc Arg	ggc Gly	acg Thr 410	cag Gln	aac Asn	tgg Trp	acg Thr	gtg Val 415	gag Glu	1248
cgg Arg	ctg Leu	ctc Leu	cag Gln 420	gcg Ala	cac His	cgc Arg	caa Gln	ctg Leu 425	gag Glu	gag Glu	cgc Arg	ggc Gly	tat Tyr 430	gtg Val	ttc Phe	1296
gtc Val	ggc Gly 435	tac Tyr	cac His	ggc Gly	acc Thr	ttc Phe	ctc Leu 440	gaa Glu	gcg Ala	gcg Ala	caa Gln 445	agc Ser	atc Ile	gtc Val	ttc Phe	1344
ggc Gly	ggg Gly 450	gtg Val	cgc Arg	gcg Ala	cgc Arg	agc Ser 455	cag Gln	gac Asp	ctc Leu	gac Asp	gcg Ala 460	atc Ile	tgg Trp	cgc Arg	ggt Gly	1392
ttc	tat	atc	gcc	ggc	gat	ccg	gcg	ctg	gcc	tac	ggc	tac	gcc	cag	gac	1440

Phe 465	Tyr	Ile	Ala	Gly	Asp 470	Pro	Ala	Leu	Ala	Tyr 475	Gly	Tyr	Ala	Gln	Asp 480	
cag Gln	gaa Glu	ccc Pro	gac Asp	gca Ala 485	cgc Arg	ggc Gly	cgg Arg	atc Ile	cgc Arg 490	aac Asn	ggg Gly	gcc Ala	ctg Leu	ctg Leu 495	cgg Arg	1488
gtc Val	tat Tyr	gtg Val	ccg Pro 500	cgc Arg	tgc Ser	agc Ser	ctg Leu	ccg Pro 505	ggc Gly	ttc Phe	tac Tyr	cgc Arg	acc Thr 510	agc Ser	ctg Leu	1536
acc Thr	ctg Leu	gcc Ala 515	gcg Ala	ccg Pro	gag Glu	gcg Ala	ggc Ala 520	gag Glu	gtc Val	gaa Glu	cgg Arg 525	ctg Leu	atc Ile	ggc Gly		1584
cat His	ccg Pro 530	ctg Leu	ccg Pro	ctg Leu	cgc Arg	ctg Leu 535	gac Asp	gcc Ala	atc Ile	acc Thr	ggc Gly 540	ccc Pro	gag Glu	gag Glu	gaa Glu	1632
ggc Gly 545	ggg Gly	cgc Arg	ctg Leu	gag Glu	acc Thr 550	att Ile	ctc Leu	ggc Gly	tgg Trp 555	ccg Pro	ctg Leu	gcc Ala	gag Glu	cgc Arg	acc Thr 560	1680
gtg Val	gtg Val	att Ile	ccc Pro	tgc Ser 565	gcg Ala	atc Ile	ccc Pro	acc Thr	gac Asp 570	ccg Pro	cgc Arg	aac Asn	gtc Val	ggc Gly 575	ggc Gly	1728
gac Asp	ctc Leu	gac Asp	ccg Pro 580	tcc Ser	agc Ser	atc Ile	ccc Pro	gac Asp 585	aag Lys	gaa Glu	cag Gln	gcg Ala	atc Ile 590	agc Ser	gcc Ala	1776
ctg Leu	ccg Pro	gac Asp 595	tac Tyr	gcc Ala	agc Ser	cag Gln	ccc Pro 600	ggc Gly	aaa Lys	ccg Pro	ccg Pro	cgc Arg 605	gag Glu	gac Asp	ctg Leu	1824
aag Lys	taa															1830

<210> 6
 <211> 609
 <212> PRT
 <213> Mouse and Bacteria

<400> 6

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

85

90

95

Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Phe Phe Thr Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Leu Asp Ile Val Met
130 135 140

Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr
145 150 155 160

Leu Thr Cys Gly Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Ala Leu Asn Trp Tyr
165 170 175

Gln Arg Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Thr
180 185 190

Asn Leu Ala Asp Gly Met Ser Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
195 200 205

Arg Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Ser Ser Leu His Pro Asp Asp Val Ala
210 215 220

Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Phe Arg Thr Tyr Thr Phe Gly Gly Gly
225 230 235 240

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala Phe Gly Gly Ser Leu Ala Ala Leu Thr
245 250 255

Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Thr Phe Thr Arg His Arg
260 265 270

Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys Gly Tyr Pro Val Gln
275 280 285

Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser Trp Asn Gln Val
290 295 300

Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro Gly Ser Gly Gly Asp
305 310 315 320

Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala Arg Leu Ala Leu
325 330 335

Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Val Arg Gln Gly Thr Gly
340 345 350

Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Asn Ala Asp Val Val Ser Leu Thr Cys

355	360	365
Pro Val Ala Ala Gly Glu Cys Ala Gly Pro Ala Asp Ser Gly Asp Ala		
370	375	380
Leu Leu Glu Arg Asn Tyr Pro Thr Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly		
385	390	400
Gly Asp Val Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu		
	405	410
Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Arg Gly Tyr Val Phe		
	420	425
Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe		
	435	440
Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala Ile Trp Arg Gly		
	445	450
Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp		
465	470	475
Gln Glu Pro Asp Ala Arg Gly Arg Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg		
	485	490
Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe Tyr Arg Thr Ser Leu		
	500	505
Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly		
	515	520
His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Glu		
	530	535
Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr		
545	550	555
Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly		
	565	570
Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Lys Glu Gln Ala Ile Ser Ala		
	580	585
Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro Arg Glu Asp Leu		
	595	600
Lys		

R I V E N D I C A Z I O N I

1. Anticorpo monoclonale D2/B isolato legante l'antigene specifico di membrana della prostata (PSMA) caratterizzato dal fatto di comprendere la sequenza nucleotidica delle regioni variabili VH e Vk (SEQ. ID. No. 1, 2.

2. Frammento anticorpale scFv D2/B legante l'antigene secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto di comprendere una seq. di almeno 741 nucleotidi consecutivi, che ne caratterizzano le regioni variabili VH e VL leganti l'antigene, di SEQ. ID. No. 3.

3. Anticorpo monoclonale isolato o un suo frammento legante l'antigene secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto di legare PSMA nella sua forma nativa presente sulla superficie di cellule tumorali.

4. Anticorpo monoclonale isolato o un suo frammento legante l'antigene secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto di legare selettivamente PSMA.

5. Coniugato principio attivo-anticorpo comprendente un anticorpo monoclonale isolato o un suo frammento legante l'antigene secondo una qualsiasi

delle rivendicazioni precedenti coniugato con un principio attivo selezionato nel gruppo costituito da agente di marcatura, un agente citotossico o un agente veicolante.

6. Coniugato secondo la rivendicazione 5, caratterizzato dal fatto che detto agente di marcatura è un radionuclide o nanoparticelle fluorescenti.

7. Coniugato secondo la rivendicazione 5 o 6, caratterizzato dal fatto che detto agente di marcatura è selezionato nel gruppo costituito da ^{188}Re , ^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{187}Re , ^{111}In , ^{90}Y , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{177}Lu .

8. Coniugato secondo la rivendicazione 5, caratterizzato dal fatto che detto agente citotossico è PE40, catena A della ricina, saporina e diancina.

9. Coniugato scFv D2/B-PE40 costituito dalla SEQ. ID. No. 5.

10. Coniugato secondo la rivendicazione 6, caratterizzato dal fatto che detto agente veicolante è biotina o nanoparticelle.

11. Composizione farmaceutica comprendente un anticorpo monoclonale isolato o un suo frammento legante l'antigene secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4 od un coniugato secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 5 a 10.

12. Uso di un anticorpo monoclonale isolato o un suo frammento legante l'antigene secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4 o di un coniugato secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 5 a 10 o di una composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 11 per la preparazione di un medicamento per il trattamento o la diagnosi di un tumore.

13. Uso secondo la rivendicazione 12, caratterizzato dal fatto che detto tumore è un tumore alla prostata.

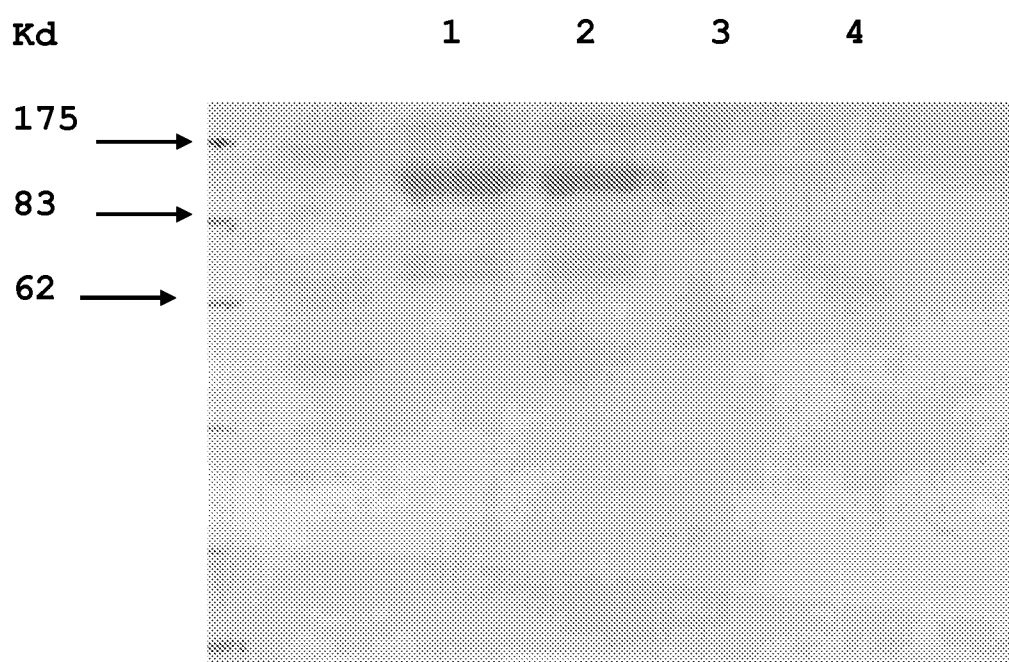
14. Uso di un anticorpo monoclonale isolato o un suo frammento legante l'antigene secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4 o di un coniugato secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 5 a 10 o di una composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 11 per la vascolatura PSMA+ di tumori di qualunque istotipo.

p.i.: 1) UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI VERONA

2) COLOMBATTI MARCO

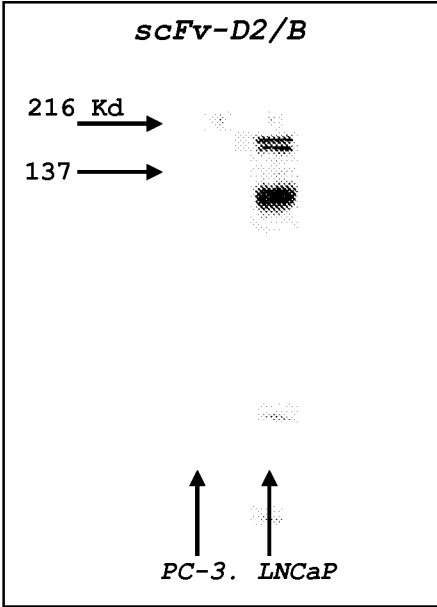
Francesco FIUSSELLO

Figura 1- Western Blot con moAb D2/B



1 D2/B LNCaP; 2 J591 LNCaP; 3 D2/B PC-3; 4 J591 PC-3

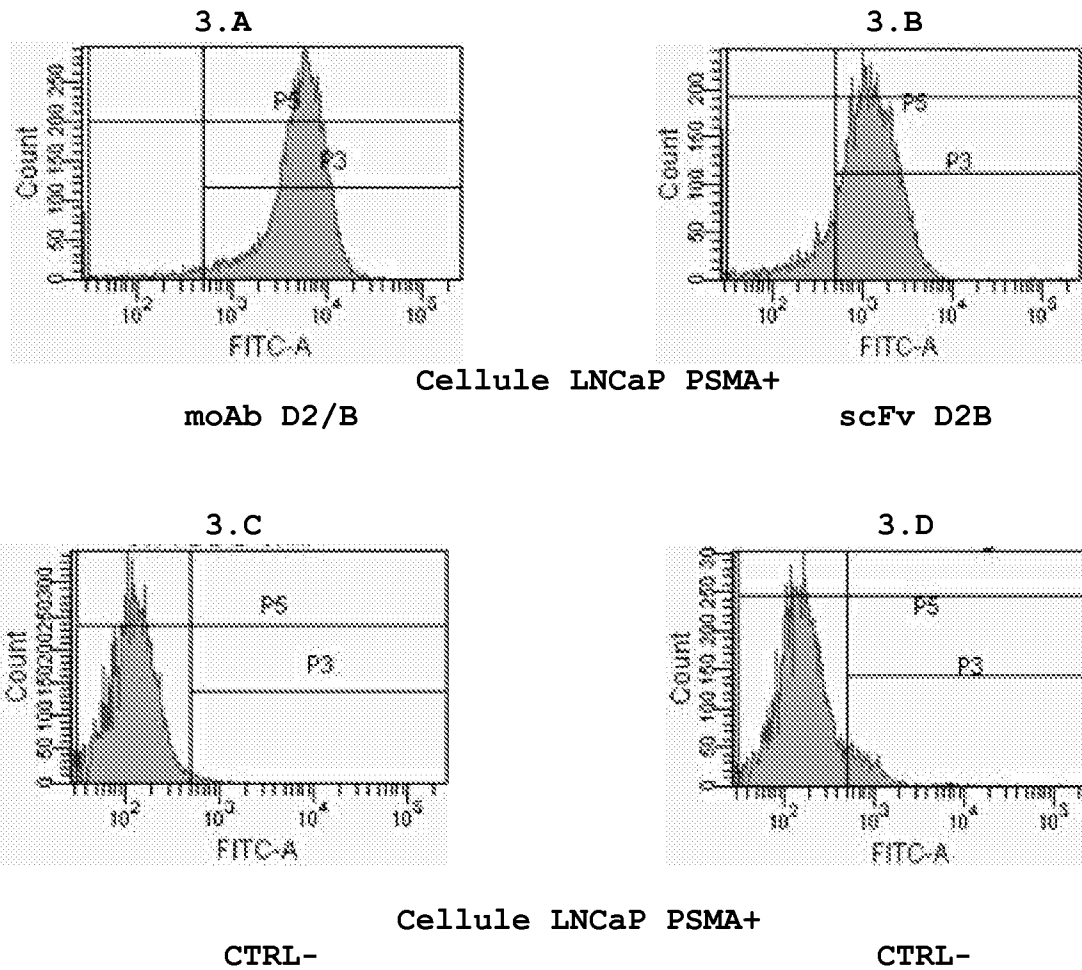
Figura 2 -Western Blot con scFv D2/B



p.i.: 1) UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI VERONA
2) COLOMBATTI MARCO

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

Figura 3- Citofluorimetrie di D2/B e scFv D2/B su cellule PSMA+

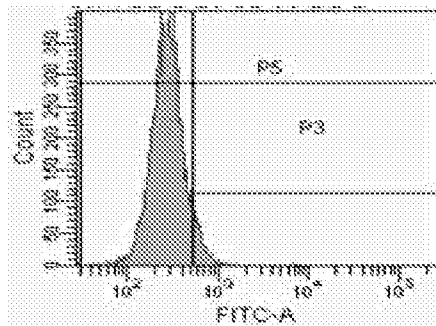


p.i.: 1) UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI VERONA
2) COLOMBATTI MARCO

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

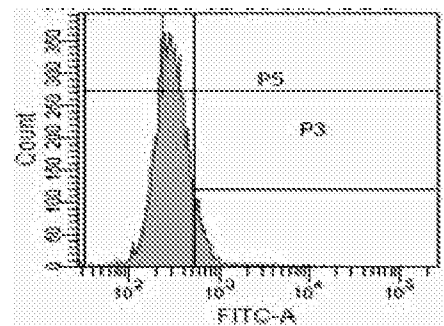
Figura 4- Citofluorimetrie di D2/B e scFv D2/B su cellule PSMA-

4.A



moAb D2/B

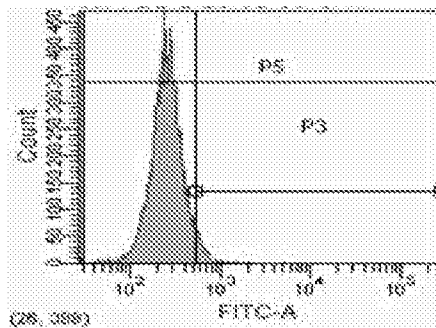
4.B



scFv D2/B

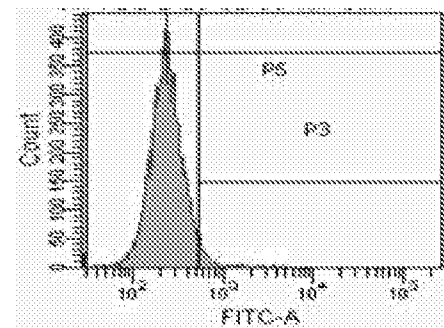
Cellule PC-3 PSMA-

4.C



CTRL-

4.D

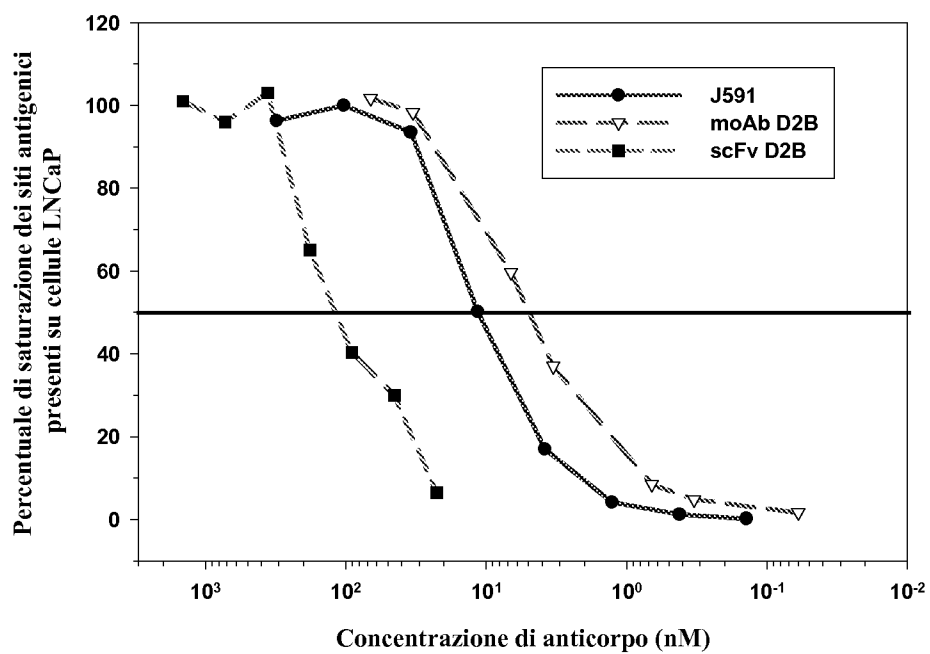


CTRL-

p.i.: 1) UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI VERONA
2) COLOMBATTI MARCO

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

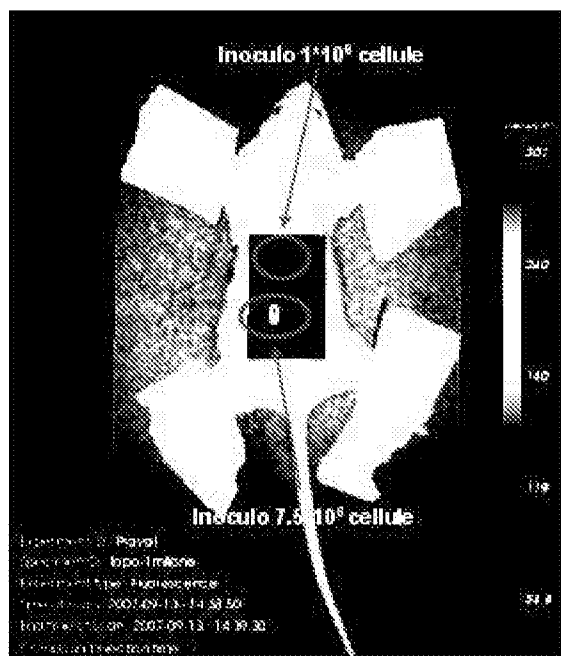
Figura 5 Capacità di legame di J591, D2/B, scFv D2/B



p.i.: 1) UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI VERONA
2) COLOMBATTI MARCO

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)

Figura 6 Imaging in vivo con D2/B Cy5.5



p.i.: 1) UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI VERONA
2) COLOMBATTI MARCO

Francesco FIUSSELLO
(Iscrizione Albo nr. 1099/B)