



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101996900500395
Data Deposito	27/02/1996
Data Pubblicazione	27/08/1997

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	N		

Titolo

CITOCHINE MODIFICATE PER L'USO IN TERAPIA

4876 M Descrizione dell'invenzione industriale avente per titolo:

FM/cp "CITOCHINE MODIFICATE PER L'USO IN TERAPIA"

a nome: FONDAZIONE CENTRO SAN RAFFAELE DEL MONTE TABOR

con sede in: Milano

BREV. MI-V

002269

* * *

La presente invenzione riguarda citochine modificate per l'uso in terapia. Il sistema immunitario produce citochine ed altri fattori umorali in risposta a vari stimoli infiammatori, a traumi, ad infezioni batteriche e virali, o a segnali di degenerazione cellulare, come ad esempio il cancro. Sebbene termini come "linfochine", "monochine" e "citochine", siano stati coniati in origine al fine di distinguere prodotti derivanti da linfociti, monociti e cellule non-linfoidi, è stato successivamente scoperto che esiste una certa sovrapposizione tra queste categorie. Pertanto, il termine "citochine" è correntemente impiegato come sinonimo di "linfochine" e "monochine" e secondo tale accezione è impiegato anche qui di seguito. Un elenco di buona parte delle citochine note allo stato dell'arte e delle loro attività biologiche è riportato in Aggarwal B.B. e Pocsik E.

E' ben noto che varie citochine sono dotate di attività anti-tumorali, anti-virali ed anti-batteriche. Sulla base di tali attività, osservate sia in vitro sia in vivo in modelli animali, alcune citochine sono già state impiegate anche nell'uomo per scopi terapeutici (De Vita et. al., 1995, in *Biologic Therapy of Cancer*, Lippincott Company, Philadelphia). Ad esempio, alcune citochine come l'interleuchina-2 (IL-2) e l'interferone α (IFN α) hanno mostrato una buona attività anti-

tumorale in pazienti con vari tipi di tumore, come ad esempio il carcinoma metastatico renale, la "hairy cell" leucemia, il sarcoma di Kaposi, il melanoma, il mieloma multiplo, etc. Altre citochine come l'IFN β , il Tumor Necrosis Factor (TNF) α , il TNF β , la IL-1, -4, -6, -12, 15 e i Colony Stimulating Factors (CFSs) hanno mostrato una certa attività anti-tumorale su alcuni tipi di tumore e sono pertanto oggetto di ulteriori studi. Altre citochine sono state impiegate nella terapia di malattie infettive (Aggarwal B.B. e Pocsik E.)

In generale, l'uso terapeutico di citochine è fortemente limitato dalla loro tossicità sistematica. Poiché ciò costituisce un problema cruciale per il loro uso nell'uomo a dosi terapeuticamente attive, vari tentativi sono stati fatti per sviluppare nuovi derivati di citochine e nuove strategie terapeutiche volte a ridurre gli effetti tossici di questa classe di effettori biologici mantenendone l'efficacia terapeutica.

Un caso emblematico è costituito dal Tumor Necrosis Factor α (TNF).

Il TNF è una citochina, secreta principalmente da macrofagi, originalmente scoperta per la sua capacità di indurre la necrosi emorragica di alcuni tumori (Carswell et al., 1975). Successivamente è stato dimostrato che il TNF, oltre ad esercitare effetti citotossici e citostatici su diverse linee tumorali, è in grado di esercitare numerosi altri effetti biologici importanti ai fini della regolazione della risposta infiammatoria ed immunitaria (Beutler and Cerami, 1989; Fiers, 1991).

E' ormai consolidata l'idea che il TNF possa esercitare effetti

benefici o tossici per l'organismo che lo produce, in funzione della sua concentrazione, del sito di produzione e del tempo di permanenza nel sito di azione. Ad esempio, l'esposizione cronica a basse dosi di TNF può determinare cachessia mentre la iperproduzione acuta di TNF può determinare gravi danni vascolari, shock e persino morte (Beutler and Cerami, 1989).

La potenziale attività anti-tumorale del TNF è stata valutata attraverso vari studi condotti sia su modelli animali sia sull'uomo. Tali studi hanno indicato che l'attività anti-tumorale esercitata dal TNF in vivo dipende principalmente dalla sua capacità di indurre danni al sistema vascolare del tumore attraverso effetti diretti sull'endotelio e, inoltre, dall'attivazione della risposta infiammatoria ed immunitaria (Sidhu and Bollon, 1993). Una minore importanza è stata invece attribuita alla sua citotossicità diretta sulle cellule tumorali.

Sebbene studi clinici (fase II) condotti con il TNF su diversi tipi di tumore non abbiano indicato una attività anti-tumorale significativa, dati incoraggianti sono stati ottenuti impiegando TNF in associazione ad altri farmaci (IFNgamma, IL-2, agenti alchilanti, Melphalan etc.). Tuttavia in generale si è visto che effetti tossici di vario genere, indotti dal TNF, costituiscono un forte limite all'uso di dosi farmacologicamente attive (Spriggs and Yates, 1992). Un discreto successo è stato invece ottenuto attraverso l'uso di elevate dosi di TNF in terapie regionali (ad es. mediante perfusione di arti di pazienti con melanoma) in modo da ridurre gli effetti tossici sistemici (Lienard et al., 1992).

Varie strategie terapeutiche alternative, sempre basate sull'uso di TNF, sono attualmente in corso di valutazione, con l'intento di incrementare l'efficacia terapeutica del TNF attraverso un incremento della dose massima tollerata ed una riduzione degli effetti tossici sistematici, senza naturalmente compromettere la attività anti-tumorale. È stato stimato che una riduzione di circa un ordine di grandezza della dose necessaria per esercitare un effetto anti-tumorale potrebbe risultare ben tollerata.

Ciò è stato tentato attraverso:

- a) lo sviluppo di proteine di fusione che possano veicolare il TNF sul tumore ed incrementare la concentrazione locale. Ad esempio sono state prodotte proteine di fusione tra TNF ed anticorpi specifici per il tumore (Hoogenboom et al., 1991);
- b) lo sviluppo di mutanti del TNF che mantengano l'attività anti-tumorale e abbiano una ridotta tossicità sistematica. In tal senso sono già stati prodotti mutanti in grado di riconoscere selettivamente solo un recettore (p55 o p75) (Loetscher H et al., 1993).
- c) l'uso di anticorpi anti-TNF in grado di ridurre alcuni effetti tossici del TNF senza compromettere la sua attività anti-tumorale. Un anticorpo di questo tipo è già stato descritto in letteratura (Rathien et al. 1992).
- d) l'uso di derivati del TNF con una maggiore "half life" (ad esempio TNF coniugato con polietilen glicole).

Le potenzialità farmacologiche di tali strategie sono in corso di

valutazione.

Sebbene i dati ottenuti siano incoraggianti verso l'uso di TNF come agente anti-tumorale, il problema della sua tossicità sistemica non è in realtà ancora stato risolto.

Sono stati recentemente descritti (EP 251 494 ed EP 496 074) dei sistemi di veicolazione di agenti citotossici, paramagnetici o radioisotopici che sfruttano l'interazione biotina-avidina.

In particolare, EP 251 494 descrive un sistema di somministrazione di un agente diagnostico o terapeutico che comprende: un anticorpo coniugato ad avidina o streptavidina, un agente capace di complessare l'anticorpo coniugato e un composto costituito dall'agente diagnostico o terapeutico coniugato a biotina, che vengono somministrati sequenzialmente, opportunamente distanziati, così da permettere la localizzazione dell'agente terapeutico o diagnostico, sfruttando l'interazione biotina-streptavidina, sulla cellula bersaglio riconosciuta dall'anticorpo.

Gli agenti diagnostici o terapeutici descritti comprendono chelati metallici, in particolare chelati di radionuclidi e agenti anti-tumorali a basso peso molecolare quali cis-platino, doxorubicina, ecc. Viene infatti esplicitamente affermato che il sistema non è adatto per composti a peso molecolare superiore a 50.000 daltons (preferibilmente non superiore a 10.000 daltons) il che esclude di fatto l'applicabilità alle citochine, come ad esempio il TNF (51.000).

EP 496 074 descrive un metodo che prevede la somministrazione sequenziale di un anticorpo biotinilato, avidina o streptavidina e un

agente diagnostico o terapeutico biotinilato. Anche in questo caso, pur menzionando genericamente agenti citotossici fra i quali la ricina (una proteina la cui catena citotossica ha un peso molecolare di circa 30.000 daltons), si descrive per lo più l'applicazione a composti radiomarcati.

WO 95/15979 descrive un metodo per localizzare agenti altamente tossici (I) su bersagli cellulari, basato sulla somministrazione di un primo coniugato (C1) comprendente la molecola bersaglio-specifica coniugata ad un ligando (L) o un anti-ligando (AL) seguita dalla somministrazione di un secondo coniugato (C2) costituito dall'agente tossico (I) legato ad un anti-ligando (AL) o al ligando (L). In questo caso, pur menzionando tra gli agenti tossici (I) anche le citochine, incluso il TNF, ed il sistema biotina/avidina come L/AL si desume che, nel caso dell'uso di citochine, è altamente preferibile la somministrazione del ligando (L) o (AL) per dissociare la citochina e consentire quindi alla citochina "libera" di esercitare effetti biologici. Ciò è intuitivamente dovuto al fatto che la citochina "legata" non è in grado di interagire con i propri recettori ed esercitare efficacemente i desiderati effetti biologici. E' prevedibile che la quantità di L o AL necessaria sia relativamente elevata al fine di poter competere nel legame sulla superficie cellulare, con conseguenti possibili problemi di tossicità. Inoltre, nel caso in cui la coppia L/AL sia costituita da biotina/avidina, considerando l'elevata stabilità di tale interazione (la più forte interazione non covalente nota, $K_d = 10^{-15}$ M) tale legame è praticamente indissociabile (D. Savage et. al., avidin-biotin chemistry: a handbook. Pierce Biotec Company

(Rockford).

WO 95/15979 non riporta inoltre alcuno specifico dato sperimentale a supporto dell'uso delle citochine nel metodo rivendicato, ma solo generiche citazioni che non sono sufficienti a fornire insegnamenti riproducibili e concreti per l'applicazione del metodo di localizzazione a questa classe di sostanze che agiscono oltrettutto attraverso un meccanismo non semplicemente citotossico, bensì attraverso complessi meccanismi pro-infiammatori, immunostimolanti, procoagulanti e necrotizzanti per mezzo dei quali sono in grado di esercitare effetti antitumorali anche senza esercitare effetti citotossici diretti, come invece richiesto dagli agenti impiegati nelle sopracitate domande EP-251 494 e EP-496 074.

Si è ora inaspettatamente trovato, contrariamente alle generiche indicazioni riportate in WO 95/15979, che le citochine possono essere efficacemente localizzate in forma biologicamente attiva solo ricorrendo ad un sistema in cui l'interazione tra la citochina coniugata e il componente bersaglio-specifico coniugato non sia diretta come nel caso di coniugazione a una coppia ligando/anti-ligando, ma sia piuttosto mediata da un terzo componente capace di legarsi a ponte fra il componente bersaglio-specifico e la citochina.

Secondo il metodo della presente invenzione, la citochina può esplicare la propria azione anche in forma legata e non è necessaria la somministrazione di un elemento della coppia ligando/anti-ligando per liberare la citochina in forma attiva. Tale risultato è da ritenersi inatteso poichè non era prevedibile che le citochine coniugate a un

ligando, sebbene impegnate nella interazione con il corrispondente anti-ligando a sua volta impegnato con il componente bersaglio-specifico coniugato ad un ligando opportuno, fossero comunque in grado di interagire con i recettori di membrana presenti sulle cellule bersaglio.

L'invenzione fornisce pertanto composizioni farmaceutiche in forma di preparazioni associate per l'impiego sequenziale in terapia che comprendono:

- a) un composto anti-bersaglio patologico coniugato ad un ligando di un sistema almeno ternario ligando/anti-ligando/ligando;
- b) un anti-ligando complementare al ligando del composto a);
- c) una citochina coniugata ad un ligando complementare all'anti-ligando b), con la condizione che l'interazione ligando/anti-ligando/ligando sia caratterizzata da un'affinità almeno un ordine di grandezza superiore rispetto all'affinità tra citochina e i suoi recettori naturali.

Esempi di composti coniugabili al composto a) e alla citochina, in accordo all'invenzione, comprendono apteni come biotina e digossigenina, mentre esempi di composti "anti-ligando" comprendono anticorpi anti-aptene (ad esempio, anticorpi anti-biotina e anticorpi anti-digossigenina) o, nel caso dell'uso di biotina come ligando, avidina e suoi analoghi (es. streptavidina, neutravidina).

Preferibilmente, sia il composto a) sia la citochina sono coniugati a biotina, mentre l'avidina (o composto analogo) è utilizzata come anti-ligando.

Le tecniche di coniugazione alle citochine e agli anticorpi sono

ampiamente note e possono far ricorso a metodiche chimiche o di
ingegneria genetica.

I composti a) anti-bersaglio patologico sono preferibilmente
anticorpi o anticorpi monoclonali in forma intera o frammentata. Detti
anticorpi sono già stati ampiamente descritti ed utilizzati, specie nel
caso di anticorpi diretti contro antigeni tumorali.

Esempi di citochine o linfochine impiegabili secondo l'invenzione
comprendono fattori di necrosi tumorale, interferoni, interleuchina,
fattori di stimolazione di colonie (CSF). E' anche possibile utilizzare
un modificatore della risposta biologica in grado di promuovere il
rilascio locale di citochina endogena, come ad esempio il
lipopolisaccaride (LPS) o un suo derivato, così da ottenere un effetto
locale maggiore ed effetti sistematici minori.

Inoltre, poichè è ben noto che le citochine possono talvolta
esercitare effetti additivi o sinergici, è possibile sfruttare la
strategia che sta alla base della presente invenzione per ottenere
effetti sinergici locali e minori effetti a livello sistematico. La
terapia biologica del cancro e gli effetti della combinazione di diverse
citochine sono ampiamente documentate e ben riassunte da De Vita et al.
1995 (Biologic Theraphy of Cancer, Lippincott Company, Philadelphia).

E' particolarmente preferito l'uso del TNF come citochina.
Preferibilmente, le interazioni dei coniugati tra loro o con il
recettore artificiale saranno caratterizzate da costanti di affinità
almeno un ordine di grandezza superiore alla costante di affinità dei
recettori di membrana delle citochine e da costanti cinetiche di

dissociazione almeno un ordine di grandezza inferiore a quelle della interazione della citochina con i suoi recettori naturali.

Il composto anti-bersaglio o anticorpo coniugato può essere somministrato a livello locale oppure essere iniettato nel torrente circolatorio, e lasciato reagire in vivo con gli antigeni o strutture cellulari riconosciute fino al momento in cui l'eccesso circolante di composto o anticorpo viene rimosso dall'organismo, mentre una significativa frazione rimane in forma legata al bersaglio patologico. A questo punto, è possibile somministrare l'anti-ligando b) seguito dalla citochina coniugata ad una concentrazione tale che si possa formare un legame con l'anticorpo o composto anti-bersaglio e consentire un accumulo, o un'incrementata permanenza della citochina sulle cellule bersaglio.

Affinché ciò possa accadere è necessario che i tempi di dissociazione della citochina modificata dal recettore "artificiale" (costituito dall'anti-ligando) siano almeno un ordine di grandezza più lunghi dei tempi di dissociazione dai recettori "naturali". Come dimostrato negli esempi di applicazione dell'invenzione, ciò può essere realizzato con un sistema costituito da un anticorpo biotinilato specifico per un antigene tumorale, neutravidina, e da biotina-TNF (bio-TNF). In tale sistema l'affinità tra bio-TNF e il recettore artificiale (avidina), pari a 10^{-15} M, e l'affinità tra bio-TNF e i suoi recettori naturali (TNF-R1 e TNF-R2), pari a 10^{-9} - 10^{-10} M, sono tali da favorire un accumulo ed una incrementata permanenza di TNF nel sito dove sono presenti i recettori artificiali (tumore).

Nelle forme preferite dell'invenzione un anticorpo monoclonale biotinilato specifico per un antigene tumorale viene messo in contatto con il tumore attraverso somministrazioni a livello sistematico, intra-lesionale o para-lesionale, instillazioni intracavitarie (es. vescica, cavità peritoneale), infusione intra-arteriali (fegato, sistema nervoso centrale), perfusioni vascolari loco-regionali (ad es. nel liquido di perfusione di arti, fegato, polmone), seguito da somministrazioni sequenziali analoghe di neutravidina o streptavidina e TNF-biotina.

Tra una somministrazione e l'altra è preferibile inserire tempi di incubazione dell'ordine di alcune ore al fine di consentire al sistema circolatorio l'eliminazione degli eccessi di prodotto ed avere così una più fine localizzazione sul bersaglio tumorale.

Inoltre, è preferibile l'uso di TNF biotinilato nella regione amino-terminale (residui 1-11, sequenza VRSSSRTPSDK), in modo da non impedire il legame multivalente con i propri recettori naturali e tale quindi da non inattivare gli effetti del TNF. Alternativamente è possibile inserire nella stessa regione, tramite tecniche d'ingegneria genetica, aminoacidi contenenti gruppi facilmente biotinilabili mediante le tecniche note (lisine, cisteina, tirosine, istidina, ecc.) (vedi Savage et al., Avidin-biotin chemistry: a handbook, Pierce Biotec Company) o segnali di glicosilazione, in modo da ottenere biotinilazione specifica sui residui carboidratici, ad esempio con biotina idrazide o con suoi derivati. La biotinilazione del TNF nella porzione amino-terminale può essere facilmente ottenuta anche attraverso la costruzione, mediante tecniche di ingegneria genetica, di coniugati TNF

con proteine o frammenti di proteine direttamente biotinilate dal sistema di espressione. Un esempio di tali proteine è costituito dalla acetil-CoA carbossilasi di *E. coli*, e dal suo dominio C-terminale contenente il sito di biotinilazione.

Al fine di mantenere la struttura del biotina-TNF quanto più simile a quella del TNF non biotinilato è preferibile una biotinilazione a livello degli alfa-aminogruppi. Ciò può essere realizzato attraverso l'uso di protocolli di biotinilazione basati sulla reazione di biotina-6-aminocaproil-N-idrossisuccinimide estere a pH compresi tra 5,5 e 7,5. In alternativa, si è osservato che è possibile ottenere TNF biotinilato in forma tale da mantenere la capacità di interagire con avidina e con i recettori di membrana mediante "rimescolamento" di subunità tra TNF biotinilato, ad esempio con uno dei metodi descritti sopra, e TNF non biotinilato. Preferibilmente, la reazione di rimescolamento viene ottenuta mediante incubazione di miscele di TNF biotinilato e TNF non biotinilato in rapporto 1:3 per 24-72 ore, a 4°C. Tali forme di TNF coniugati all'estremità N-terminale sono nuove e costituiscono un ulteriore aspetto dell'invenzione.

Al fine di facilitare la commercializzazione e l'uso rutinario delle composizioni dell'invenzione è possibile la preparazione di kits contenenti materiali di grado terapeutico. Preferibilmente, un kit in accordo alla presente invenzione, comprende:

- una fiala contenente da 0,5 a 10 mg di anticorpo biotinilato;
- una fiala contenente da 5 a 100 mg di avidina o streptavidina o neutravidina;

- una fiala contenente da 0,5 a 10 mg di TNF biotinilato (o altra citochina biotinilata).

Il metodo della presente invenzione presenta vari vantaggi rispetto ai metodi noti, ad esempio quelli basati sulla coniugazione diretta di citochine ad anticorpi:

- 1) ad esempio, non richiede che l'affinità dell'anticorpo sia necessariamente elevata, in quanto è possibile somministrare dosi relativamente alte di anticorpo e avidina ed avere comunque una efficiente marcatura del tumore, seguite da dosi relativamente più basse di biotina-TNF. Ciò non è possibile invece con coniugati anticorpo-TNF convenzionali, per i quali la dose di anticorpo è invariabilmente "legata" alla dose di TNF.
- 2) La diffusibilità di anticorpi e TNF separati nella massa tumorale è presumibilmente migliore di quella ottenibile con coniugati anticorpo-TNF, a causa del loro minore peso molecolare.
- 3) La marcatura dei tumori con molecole ad elevata affinità come avidina e streptavidina (10^{-15} M) consente di selezionare dosi di biotina-TNF tali da favorire termodinamicamente e cinematicamente l'interazione con il recettore artificiale (avidina) e sfavorire l'interazione con i recettori naturali a livello sistemico (10^{-9} - 10^{-10} M). Nel caso di coniugati anticorpo-TNF, è estremamente difficile ottenere anticorpi in grado di legare l'antigene tumorale con affinità dell'ordine di 10^{-15} M.

La presente invenzione è ulteriormente descritta nei seguenti esempi.

Sebbene tali esempi si riferiscano in particolar modo al trattamento di patologie tumorali, è facilmente intuibile che la stessa strategia può essere impiegata nel trattamento di qualsiasi altra patologia che sia curabile con un trattamento localizzato di citochine.

ESEMPIO 1

In questo esempio viene dimostrata un'applicazione dell'invenzione basata sul sistema:

Bersaglio patologico : A : B : C-citochina

dove:

Bersaglio patologico = linfoma murino esprimente l'antigene murino Thy 1.1 (cellule RMA geneticamente ingegnerizzate in modo da esprimere l'allele Thy1.1 (RMA Thy 1.1 Cl.2));

A = anticorpo monoclonale anti-Thy 1.1, biotinilato (mAb bio-19E12).

B = neutravidina

C-citochina = coniugato biotina-TNF

e dove

(:) rappresenta una interazione non covalente, mentre

(-) rappresenta un legame covalente.

Materiali

- AH-BNHS (biotina 6-aminocaproil-N-idrossisuccinimide estere) (SPA, B002-61)
- SULFO-NHS-LC-Biotina (Pierce, 21335)
- TNF a umano (1x108 U/mg) (DGR080)
- Lisina (Sigma cod. L5501)
- Terreno di coltura: RPMI-1640 sterile (Gibco 31870-025)

- Foetal Calf Serum (FCS) (PBI-Biological Industries, cod. 04-001-1A)
- Foetal Calf Serum (FCS) (Sigma, F2442)
- Geneticina (G418, Sigma cod. G9516) in Hepes 100 mM
- Hepes (Sigma, H0887)
- Glutammmina 200 mM (Gibco cod. 04305030D)
- Penicillina 10000 IU/ml, streptomicina 10000 mg/ml, Anfotericina B 25 µg/ml (Gibco cod. 15240-021)
- NaCl (BDH cod. 10241)
- HCl 37% (BDH cod. 10125)
- Piastre in PVC a 96 pozzetti per colture cellulari a fondo piatto (Costar 3595)
- Piastre a 96 pozzetti a fondo rotondo (PBI, 650180)
- 2-mercaptopetanolo (Merck cod. 12006)
- Actinomicina D (Fluka 01815)
- Thiazolyl blue (MTT) (Merck 11714)
- PBS (NaCl 0.15 M, Na-fosfato 0.05 M, pH 7.3)
- Neutravidina (Pierce cod. 31000)
- Sodium azide (Baker, 9099)
- mAb 19E12

Esempio 1.1

Preparazione di anticorpo mAb 19E12 biotinilato (bio-19E12)

In una provetta Eppendorf sono stati pipettati 1000 µl di una soluzione di mAb 19E12, 1 mg/ml in sodio bicarbonato pH 8,5, 34 µl di una soluzione di Sulfo-NHS-LC-Biotina, 1 mg/ml (rapporto molare mAb/biotina: 1/24). La miscela è stata incubata a temperatura ambiente

(23/24°C) per 30 minuti. Dopo incubazione la miscela è stata dializzata contro 2 l di PBS per una notte a 4°C e conservata a + 4°C.

Esempio 1.2

Preparazione di TNF-biotina (bio-TNF)

In questo capitolo sono riportati alcuni esempi di protocolli di preparazione di coniugati biotina-TNF.

Esempio 1.2.1 (preparazione di bio-TNF cod.#B)

In una provetta Eppendorf sono stati pipettati 60 µl di una soluzione di TNF (0,5 mg/ml), in acqua bidistillata, 6 µl Na-carbonato 1 M, pH 6,8, 6 µl di AH-BNHS, 3 mg/ml in DMSO (rapporto molare TNF/Biotina: 1/66). La miscela è stata incubata a temperatura ambiente (23/24°C) per 3 ore e mescolata con 7,5 µl di una soluzione di lisina 1 M. Dopo una ulteriore incubazione per 1 h a temperatura ambiente sono stati aggiunti alla miscela 240 µl di soluzione RPMI, 10% FCS, 2 mM glutammmina, 100 IU/ml penicillina, 100 µg/ml streptomicina, anfotericina B 250 ng/ml. La miscela è stata quindi dializzata contro 2 l di 0.9% NaCl per una notte a 4°C. (3 cambi) e conservata -20°C.

Esempio 1.2.2 (preparazione di bio-TNF cod.#C, cod.#D, cod.#E, cod.#F, cod.#G)

Il prodotto bio-TNF cod. #C viene preparato come descritto nell'esempio 1.1.1 eccetto per l'uso di un tampone di coniugazione a pH 7,8.

A titolo di confronto vengono preparate anche soluzioni di bio-TNF (cod.#D, cod.#E, cod.#F, cod.#G) impiegando altri tamponi di incubazione, vari rapporti molari TNF/biotina (v. tabella 1).

Esempio 1.3

Determinazione dell'attività biologica del TNF biotinilato su cellule
RMA Thy 1.1 C 1.2

Lo scopo di questo esperimento è di determinare la attività biologica specifica di diverse preparazioni di bio-TNF ottenute in condizioni di coniugazione diverse (vedi esempio 1.1), mediante un test di citotossicità su cellule RMA Thy 1.1 Cl.2

Procedura:

Ad ogni pozzetto di una piastra a 96 pozzetti a fondo piatto (Costar 3595) sono stati aggiunti:

- a) 60.000 cellule RMA Thy 1.1 Cl.2 (Mycoplasma free) in 50 μ l di RPMI, FCS 5%, glutammmina 2 mM, penicillina 100 IU/ml, streptomicina 100 μ g/ml, anfotericina B 250 ng/ml 2-mercaptopietanolo 50 nM, G418 500 μ g/ml (RPMI-Completo);
- b) 50 μ l di soluzione di TNF standard o di campione in RPMI- Completo alla concentrazione desiderata;
- c) 10 μ l di Actinomicina-D 330 ng/ml in RPMI-Completo.

La piastra è stata quindi incubata per 24 h a 37°C, 5% CO₂. Ad ogni pozzetto sono stati inoltre aggiunti 10 μ l di soluzione di thiazolyl blue (MTT), 5 mg/ml in PBS. Dopo ulteriore incubazione per 4 h a 37°C, 5% CO₂, ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 μ l di soluzione lisante (N,N-dimetilformammide 33 % (v/v), sodio dodecil sulfato 20% (p/v), in acqua, a pH 4.7 con acido acetico glaciale). Le soluzioni nei vari pozzetti sono state mescolate mediante l'ausilio di una pipetta multicanale ed incubate per 24 h a 37°C. L'assorbanza a 570 nm e 650 nm

(riferimento) di ogni pozzetto è quindi stata letta mediante un lettore di piastre multicanale.

L'attività citotossica è stata calcolata interpolando i valori di assorbanza su una curva di calibrazione ottenuta con TNF non biotinilato.

Risultati

Tabella 1

Attività biologica di bio-TNF, misurata mediante test di citotossicità su cellule RMA

Reazione di biotinilazione

	cod. (#)	TNF/biotina (rapporto mol.)	(pH)	Attività biologica ^{a)} (U/mg)
TNF	A	0 (non biotinyl.)	-	$1,0 \times 10^8$
bio-TNF	B	1/66	6,8	5×10^7
bio-TNF	C	1/66	7,8	$2,5 \times 10^7$
bio-TNF	D	1/66	8,8	$3,1 \times 10^7$
bio-TNF	E	1/138	8,8	$3,9 \times 10^6$
bio-TNF	F	1/275	8,8	$3,0 \times 10^5$
bio-TNF	G	1/550	8,8	$1,0 \times 10^5$

a) Misurata impiegando una curva di calibrazione costruita impiegando TNF non biotinilato (cod.#A)

Esempio 1.4

Confronto delle capacità di legame e delle cinetiche di associazione e di dissociazione di bio-TNF e TNF da cellule pre-trattate con anticorpi e neutravidina

Lo scopo dell'esperimento è di dimostrare che la costruzione di recettori artificiali sulle cellule tumorali mediante il sistema di pre-targeting con anticorpi biotinilati e neutravidina incrementa significativamente la quantità totale di bio-TNF che può essere legata

alle cellule rispetto alla quantità massima legabile ai recettori naturali.

Inoltre, lo scopo di questo esperimento è di valutare i tempi di associazione e di dissociazione del bio-TNF dai recettori naturali ed artificiali (neutravidina) da cellule pre-trattate con anticorpi e neutravidina.

Procedura

L'esperimento è stato condotto trattando le cellule MRA thy 1.1 Cl.2 come descritto negli esempi 1.5 e 1.6. Il TNF totale legato è stato rivelato impiegando un metodo indiretto basato sull' uso di anticorpi polyclonali di coniglio anti-TNF ed anticorpi di capra anti-IgG di coniglio fluorescinati ed analisi mediante FACS

Cinetica di associazione

50.000 cellule in 50 μ l PBS/FCS 2% sono state seminate in pozzetti di una piastra a fondo rotondo, mescolate con 1 μ l di mAb bio-19E12, 0,5 mg/ml in PBS/FCS 2% (concentrazione finale di anticorpo 10 μ g/ml), ed incubate per 10 min in ghiaccio.

Le cellule sono state lavate 2 volte mediante aggiunta di 200 μ l/pozzetto di PBS/FCS 2% e centrifugazione per 2 min a 1300 rpm. Le cellule sono state risospese mediante l'uso di un vortex e mescolate con 50 μ l/pozzetto di PBS/FCS 2% e con 1 μ l neutravidina 2,5 mg/ml in PBS/FCS 2% (concentrazione finale di neutravidina 50 mg/ml). Dopo incubazione per 10 min in ghiaccio, le cellule sono state nuovamente lavate per 2 volte con PBS/FCS 2%, come sopra.

Ad ogni pozzetto sono stati quindi aggiunti 50 μ l di PBS/FCS 2%, 1

µl di TNF o di bio-TNF alla concentrazione di 22,2 µg/ml (concentrazione finale di TNF e bio-TNF 450 ng/ml), ed i campioni sono stati incubati per 1 h in ghiaccio.

Dopo un ulteriore lavaggio con PBS/FCS 2%, ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 50 µl di siero polyclonale di coniglio anti-TNF (Genzyme cod#IP300) 1:1000 in PBS/FCS 2%, e incubati per 10 min in ghiaccio.

Le cellule sono state lavate 2 volte mediante aggiunta di PBS/FCS 2% (200 µl/pozzetto) e centrifugazione. Successivamente sono stati aggiunti ad ogni pozzetto 50 µl di antisiero di capra anti-immunoglobuline di coniglio coniugato con fluoresceina (goat anti-rabbit-FITC) in PBS/FCS 2% ed incubati per 10 min in ghiaccio.

Dopo un ultimo lavaggio con PBS/FCS 2% i campioni sono stati risospesi in 200 µl di PBS/FCS 2% ed analizzati mediante FACS.

Cinetica di dissociazione

100.000 cellule in 50 µl PBS/FCS 2% sono state seminati in 8 pozzetti di una piastra a fondo rotondo, mescolate con 1 µl di mAb bio-19E12, 0,5 mg/ml in PBS/FCS 2% (concentrazione finale di anticorpo 10 mg/ml), ed incubate per 10 min in ghiaccio.

Le cellule sono state lavate 2 volte mediante aggiunta di 200 µl/pozzetto di PBS/FCS 2% e centrifugazione per 2 min a 1300 rpm. Le cellule sono state risospese mediante l'uso di un vortex e mescolate con 50 µl/pozzetto di PBS/FCS 2% e con 1 µl neutravidina 2.5 mg/ml in PBS/FCS 2% (concentrazione finale di neutravidina 50 µg/ml). Dopo incubazione per 10 min in ghiaccio, le cellule sono state nuovamente

lavate per 2 volte con PBS/FCS 2%, come sopra.

Ad ogni pozzetto sono stati quindi aggiunti 50 μ l di PBS/FCS 2%, 1 μ l di TNF o di bio-TNF alla concentrazione di 22,2 μ g/ml (concentrazione finale di TNF e bio-TNF 450 ng/ml), ed i campioni sono stati incubati per 1 h in ghiaccio.

Gli 8 campioni sono stati lavati con 200 μ l di PBS/FCS 2% mediante centrifugazione (2 volte). Le cellule sono state risospese in 50 μ l di RPMI, FCS 5%, glutammina 2 mM, penicillina 100 IU/ml, streptomicina 100 μ g/ml, anfotericina B 250 ng/ml, e a vari tempi, fissate con paraformaldeide 0.25% per 1 h a 4°C.

Dopo un ulteriore lavaggio con PBS/FCS 2%, ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 50 μ l di siero polyclonale di coniglio anti-TNF (Genzyme cod#IP300) 1:1000 in PBS/FCS 2%, e incubati per 10 min in ghiaccio.

Le cellule sono state nuovamente lavate 2 volte mediante aggiunta di PBS/FCS 2% (200 μ l/pozzetto) e centrifugazione. Successivamente sono stati aggiunti ad ogni pozzetto 50 μ l di antisiero di capra anti-immunoglobuline di coniglio coniugato con fluoresceina (goat anti-rabbit-FITC) 1/1000 in PBS/FCS 2% ed incubati per 10 min in ghiaccio.

Dopo un ultimo lavaggio con PBS/FCS 2% i campioni sono stati risospesi in 200 μ l di PBS/FCS 2% ed analizzati mediante FACS.

Risultati

Il pre-targeting delle cellule con neutravidina determina un aumento di almeno 10-20 volte del legame di bio-TNF alle cellule, rispetto al legame ottenibile con i soli recettori naturali (determinato in assenza di neutravidina o impiegando TNF non biotinilato). L'aumento

maggioré è stato osservato con il bio-TNF cod.#B (biotinilato a pH 6.8) (dati non mostrati).

Inoltre, come si può osservare in figura 1 (pannello inferiore) il tempo di permanenza del bio-TNF sulle cellule RMA pretrattate con anticorpi ed avidina è circa 30 volte superiore ($t_{1/2}=7$ h) al tempo di permanenza del TNF sulle stesse cellule ($t_{1/2}=0,22$ h).

In conclusione gli esperimenti di legame dimostrano che sfruttando la strategia di pre-targeting con anticorpi e neutravidina secondo l'oggetto dell'invenzione è possibile aumentare di circa 10-20 volte la quantità massima di bio-TNF legata a cellule tumorali e che tale quantità è in grado di permanere sulla membrana cellulare per tempi circa 30 volte più lunghi.

Esempio 1.5

Confronto tra le citotossicità del TNF e del bio-TNF su cellule tumorali pretrattate con anticorpi biotinilati e neutravidina, in vitro, in presenza di actinomicina D

Lo scopo di questo esempio è di dimostrare la capacità di un sistema anticorpo biotinilato/avidina di veicolare il TNF-biotina sulla superficie cellulare in forma biologicamente attiva e di incrementare la citotossicità in vitro, rispetto a quella ottenibile sfruttando semplicemente i recettori naturali.

A tal scopo sono state impiegate le cellule RMA Thy 1.1 Cl.2 l'anticorpo monoclonale anti-Thy 1 umano, biotinilato (mAb bio-19E12), neutravidina, e bio-TNF cod#B.

L'esperimento è stato condotto mediante incubazione sequenziale e

lavaggio delle cellule con a) mAb bio-19E12, b) neutravidina, c) bio-TNF.

Poiché è noto che il legame del TNF ai recettori naturali induce la sintesi di fattori protettivi, come ad esempio la Mn superrossidodismutasi, al fine di inibire la produzione di tali fattori ed esaltare l'attività citotossica del TNF, il test di citotossicità è stato eseguito in presenza di un inibitore della trascrizione (actinomicina D).

Procedura:

Ad ogni pozzetto di una piastra a 96 pozzetti a fondo rotondo (Costar 3595) sono stati aggiunte 1.000.000 di cellule in 50 μ l PBS/FCS 2% e 1 μ l di una soluzione di mAb bio-19E12, 0,5 mg/ml. La sospensione è stata incubata per 10 min in ghiaccio. Le cellule sono state lavate 2 volte mediante aggiunta di 200 μ l/pozzetto di PBS/FCS 2% e centrifugazione per 2 min a 1300 rpm. Le cellule sono state risospese mediante l'uso di un vortex e mescolate con 50 μ l/pozzetto di PBS/FCS 2% e con 1 μ l neutravidina 0,5 mg/ml in PBS/FCS 2%. Dopo incubazione per 10 min in ghiaccio, le cellule sono state nuovamente lavate per 2 volte con PBS/FCS 2%, come sopra.

Ad ogni pozzetto sono stati quindi aggiunti 50 μ l di PBS/FCS 2%, 1 μ l di TNF o di bio-TNF alla concentrazione desiderata ed incubati per 15 min in ghiaccio. Dopo un ulteriore lavaggio con PBS/FCS 2%, le cellule di ogni pozzetto sono state risospese in 1,5 ml di RPMI, FCS 5%, glutammina 2 mM, penicillina 100 IU/ml, streptomicina 100 μ g/ml, anfotericina B 250 ng/ml, 2-mercaptopietanolo 50 nM, G418 500 μ g/ml (RPMI-

completo).

Le cellule sono quindi state seminate in piastre da 96 pozzetti a fondo piatto (60.000 cellule/100 μ l/pozzetto), mescolate con 10 μ l/pozzetto di una soluzione di actinomicina D, 330 ng/ml in RPMI-completo, ed incubate per 24 h a 37°C, 5% CO₂.

La vitalità cellulare è stata determinata come descritto nell'esempio 1.3.

Risultati

I risultati dell'esperimento esperimento condotto in presenza di actinomicina D, sono riportati in fig. 2. Come si può osservare, mentre la dose di TNF o bio-TNF necessaria ad uccidere il 50% delle cellule (LD₅₀) (che si manifesta con una diminuzione del 50% della assorbanza) è superiore a 100.000 U/ml, in assenza di neutravidina, la LD₅₀ di bio-TNF in presenza di neutravidina è di circa 2.000-3.000 U/ml. Inoltre, mentre la citotossicità del TNF non è influenzata dalla presenza o dall'assenza di neutravidina, la citotossicità di bio-TNF è, come atteso, fortemente dipendente dalla presenza di neutravidina. Ciò indica che: a) il TNF ed il bio-TNF sono debolmente citotossici per le cellule RMA, in assenza di neutravidina, b) la presenza di recettori "artificiali" di neutravidina sulla membrana delle cellule RMA aumenta pesantemente la citotossicità del bio-TNF, c) il bio-TNF legato alla membrana attraverso un ponte di anticorpo-biotina-avidina è in grado di interagire con i propri recettori naturali e scatenare effetti citotossici.

In un esperimento condotto in assenza di actinomicina D, sia il TNF sia il bio-TNF sono risultati privi di attività citotossica (risultati

non mostrati).

Esempio 1.6

Confronto tra la tumorigenicità in vivo (nel topo) di cellule RMA thy 1.1 cl.2 pretrattate con anticorpi biotinilati, neutravidina e con TNF o TNF-biotina, in assenza di Actinomicina D

Lo scopo di questo esperimento è di dimostrare una ridotta tumorigenicità in vivo di cellule pretrattate con bio-TNF legato alla superficie cellulare attraverso il sistema anticorpo-biotina-neutravidina (recettore artificiale), rispetto a cellule pretrattate con TNF o con bio-TNF legati esclusivamente ai recettori naturali.

Il modello impiegato è basato sulla somministrazione sottocute di cellule RMA Thy1.1 Cl.2 pre-trattate in vitro. L'esperimento è stato condotto impiegando 4 gruppi di topi C57 BL6 femmine (5 topi ciascuno) e nella misurazione del diametro della massa tumorale in diversi giorni. I topi sono stati trattati con cellule pretrattate come indicato in tabella 2.

E' importante ricordare che le dosi di TNF e bio-TNF impiegate in questo studio (50.000 U/ml e 10.000 U/ml, rispettivamente) sono tali da determinare parziali effetti citotossici solo in presenza di actinomicina D, come dimostrato nell'esempio 1.5 (figura 2). Nel presente esperimento le cellule sono state trattate interamente in assenza di actinomicina D, in condizioni, cioè, in cui sia il TNF sia il bio-TNF sono privi di citotossicità.

Tabella 2

Schema sperimentale del trattamento delle cellule RMA Thy1.1 C1.2

inoculate nei topi

Gruppo (#)	topi (N.)	mAb bio-19E12Neutrav. (10 µg/ml) (10 µg/ml)	TNF (50000 U/ml)	bio-TNF (10000 U/ml)
1	5	-	-	-
2	5	+	-	-
3	5	+	+	-
4	5	+	+	+

Procedura:

180.000 cellule in 50 µl PBS/FCS 2% sono state seminate in quattro pozzetti di una piastra a fondo rotondo, mescolate con 1 µl di mAb bio-19E12, 0,5 mg/ml in PBS/FCS 2%, ed incubate per 10 min in ghiaccio.

Le cellule sono state lavate 2 volte mediante aggiunta di 200 µl/pozzetto di PBS/FCS 2% e centrifugazione per 2 min a 1300 rpm. Le cellule sono state risospese mediante l'uso di un vortex e mescolate con 50 µl/pozzetto di PBS/FCS 2% e con 1 µl neutravidina 0,5 mg/ml in PBS/FCS 2%. Dopo incubazione per 10 min in ghiaccio, le cellule sono state nuovamente lavate per 2 volte con PBS/FCS 2%, come sopra.

Ad ogni pozzetto sono stati quindi aggiunti 50 µl di PBS/FCS 2%, 1 µl di TNF o di bio-TNF alla concentrazione di 50.000 e 10.000 U/ml, rispettivamente, ed incubati per 15 min. in ghiaccio

Dopo un ulteriore lavaggio con PBS/FCS 2%, le cellule di ogni pozzetto sono state risospese in 200 µl di PBS, trasferite in tubi Eppendorf, e mescolate con 1,2 ml di PBS. Mediante l'ausilio di siringhe da insulina, 30.000 cellule/200 µl/topo sono state iniettate sottocute a livello inguinale. Il diametro medio (laterale e longitudinale) della

massa tumorale é stato determinato a vari tempi mediante l'uso di un calibro.

Risultati:

I risultati ottenuti sono riportati in tabella 3. Come si può osservare il trattamento delle cellule con mAb bio-19E12/neutravidina/bio-TNF (gruppo 4) ha determinato una riduzione della tumorigenicità delle cellule RMA Thy1.1 Cl.2, nei topi, rispetto ai topi trattati nello stesso modo ma senza bio-TNF (gruppo 2). Diversamente il pre-trattamento delle cellule con mAb bio-19E12/neutravidina/ TNF (gruppo 3) non ha prodotto una significativa riduzione della tumorigenicità rispetto al gruppo di controllo (gruppo 2). In un ulteriore esperimento condotto con 50.000 U/ml di bio-TNF, anzichè 10.000, il volume della massa tumorale dopo 17 giorni era inferiore al limite di rivelazione (15 mm^3) (dati non mostrati).

Questi risultati indicano che il bio-TNF legato alla membrana cellulare mediante un "ponte" di anticorpo-biotina/neutravidina é in grado di scatenare funzioni effettive tali da ridurre la tumorigenicità delle cellule RMA thy 1.1 Cl.2 in vivo.

Inoltre, é interessante osservare che sebbene la dose di bio-TNF impiegata nel trattamento delle cellule RMA era tale da determinare lisi cellulare, in presenza di actinomocina D (vedi esempio 1.5), e sebbene il trattamento delle cellule in questo esperimento sia stato condotto in assenza di actinomicina D, cioè in condizioni tali in cui il TNF non é in grado di esercitare effetti citotossici diretti, tale trattamento ha comunque determinato una riduzione > 5 volte del volume della massa

tumorale dopo 17-19 giorni dall'inoculo. Ciò suggerisce che la ridotta tumorigenicità osservata è dovuta ad effetti indiretti dell'ospite sulle cellule tumorali (effetti infiammatori, immunitari etc.)

Tabella 3

Diametro e volume delle masse tumorali nei quattro gruppi di topi trattati secondo lo schema riportato in tabella 2 a vari giorni dall'inoculo

Gruppo	Topo (N.)	Diametro ^{a)} (mm)				Volume (mm ³)
		giorno 11	giorno 14	giorno 15	giorno 19	
Gruppo 1	1	-	5	7	12	
	2	-	5	8	15	
	3	3	-	-	15	
	4	5	7	10	15	
	5	3	3	5	10	
	media ±SD	3,6 ±0,64	5 ±1,63	7,5 ±2,1	13,3 ±2,3	1231 ±194
Gruppo 2	1	6	9	11	15	
	2	6	9	9	15	
	3	6	8	9	15	
	4	6	8	11	14	
	5	6	8	10	15	
	media ±SD	6 ±0,0	8,4 ±0,5	10 ±1,0	14,8 ±0,44	1696 ±50
Gruppo 3	1	6	8	9,5	15	
	2	7	7	8	15	
	3	6	8	10	15	
	4	6	7	10	15	
	5	5	8	11	15	
	media ±SD	6 ±0,7	7,6±0,54	9,7 ±1,09	15 ±0,0	1766 ±0,0
Gruppo 4	1	3	3	4,5	7,5	
	2	3	3	5,5	9	
	3	3	5	8	9	
	4	-	-	ascite	ascite	
	5	-	4	4	9	
	media ±SD	3 ±0,0	3,75 ±0,95	5,5 ±0,88	8,6 ±0,75	332 ± 30

a) media dei diametri longitudinale e laterale

ESEMPIO 2

In questo esempio viene dimostrata una applicazione dell'invenzione basata sul sistema:

Bersaglio patologico : A : B : C-induttore del rilascio di citochine

dove:

Bersaglio patologico = linfoma murino esprimente l'antigene umano Thy 1.1 (cellule RMA Thy1.1 Cl.2);

A = anticorpo monoclonale anti-Thy 1 umano, biotinilato (mAb bio-19E12).

B = neutravidina

C-induttore del rilascio di citochine = coniugato biotina-lipopolisaccaride (LPS)

e dove

(:) rappresenta una interazione non covalente, mentre

(-) rappresenta un legame covalente.

Esempio 2.1

Preparazione di LPS-biotina

Materiali

Lipopolisaccaride da *Salmonella* minesota (LPS): Sigma cod. L2137 lot. 101H4029

Biotinamidocaproilidrazide: Sigma B-3770

Tris base: BDH cod. 103156X

Sodio-M-periodato: Sigma S-1878

Sodio-acetato: BDH cod. 10235

Sodio-azide: J.T. Baker cod. 9099

Soluzioni

- "Stop solution": 0,1 M Tris-HCl pH 7,5 (in acqua).
- "Labelling solution": 100 mM Na-acetato, 0,02% Na-azide, pH 5,5.

Metodo

100 microlitri LPS (0,8 mg/ml in labelling solution) sono stati miscelati con 50 microlitri di Na-M-periodato (30 mM in labelling solution). La miscela è stata incubata a temperatura ambiente al buio per 30 minuti. Dopo incubazione la miscela è stata dializzata contro acqua distillata (4 cambi di 1 h ciascuno).

Al campione sono stati aggiunti 50 microlitri di biotina-idrazide (0,5 mg/ml in labelling solution) e la miscela è stata incubata per 1 ora a temperatura ambiente.

Al campione sono stati aggiunti 50 ml di "stop solution". La miscela è stata dializzata contro acqua distillata (4 cambi di 1 h ciascuno) e conservata a -20°C.

Esempio 2.2

Controllo della preparazione di LPS-biotina

Materiali

Cloruro di sodio (NaCl), BDH cod. 10241.

(NaH₂PO₄·H₂O): BDH, cod. 102454R.

Idrossido di sodio (NaOH): BDH, cod. 10252.

BSA, albumina, bovina: Sigma A4503.

Tween 20 (poliossietilene(20)sorbitanmonolaurato: BDH lot. ZA1645815.

Streptavidina: SPA (Società prodotti antibiotici) SAS1-610.

STV-HRP: Sigma S 5512.

OPD tavolette, 5 mg: Sigma P 6912.

H₂SO₄: BDH 10276-5G.

H₂O₂: Carlo Erba A902011404.

Soluzioni

- PBS: 0,15 M NaCl, 0,05 M Na-fosfato pH 7,3.
- PBS-3% BSA
- PBS-0,5% BSA-0,05% Tween
- PBS-0,05% Tween
- OPD: 2 tavolette in 15 ml acqua distillata e 20 ml di H₂O₂.
- 10% H₂SO₄

Metodo

La preparazione di LPS-biotina è stata incubata in micropiastra in PVC (Becton Dickinson cod. 3912) con 10 microgrammi/ml streptavidina in PBS, 100 microlitri/pozzetto; 1 h a 37°C. La piastra è stata lavata tre volte con PBS, poi è stata bloccata con PBS-3% BSA, 200 microlitri/pozzetto per 2h a temperatura ambiente.

Sono state preparate diluizioni seriali (1:2) di biotina-LPS in PBS-0,5% BSA-0,05% Tween. La piastra è stata lavata nuovamente per tre volte con PBS. Sono stati aggiunti 100 microlitri/pozzetto di campione, incubando 1 h a 37°C.

La piastra è stata lavata tre volte con PBS. A ciascun pozzetto sono stati aggiunti 100 microlitri di Streptavidina-HRP 1:2000 in PBS/BSA 0,5%/Tween 0,05%. Dopo incubazione per 1 h a 37°C, la piastra è stata lavata tre volte con PBS-Tween 0,05%. A ciascun pozzetto sono stati aggiunti 100 microlitri di soluzione OPD.

La reazione è stata bloccata con 100 microlitri di 10% H_2SO_4 .

Risultati

Densità ottiche misurate

Biotina-LPS (microgrammi/ml)	Optical Density (492 nm)
0,3	1,150
0,1	1,107
0,03	0,986
0,01	0,670

Esempio 2.3

Confronto tra la tumorigenicità *in vivo* (nel topo) di cellule

RMA thy 1.1 cl.2 pretrattate con anticorpi biotinilati,

neutravidina e con LPS o LPS-biotina

Lo scopo di questo esperimento è di dimostrare una ridotta tumorigenicità *in vivo* di cellule pretrattate con bio-LPS legato alla superficie cellulare attraverso il sistema anticorpo-biotina-neutravidina (recettore artificiale), rispetto a cellule pretrattate con LPS.

Il modello impiegato è basato sulla somministrazione sottocute di cellule RMA Thy1.1 Cl.2 pre-trattate *in vitro*. L'esperimento è stato condotto impiegando 3 gruppi di topi C57 BL6 femmine (5 topi ciascuno) e nella misurazione del diametro della massa tumorale in diversi giorni. I topi sono stati trattati con cellule pretrattate come indicato in tabella 4.

Tabella 4

Schema sperimentale del trattamento delle cellule RMA Thy 1.1 Cl.2 inoculate nei topi.

Gruppo (#)	topi (n.)	mAb bio-19E12 (10 µg/ml)	Neutrav. (10 µg/ml)	LPS (2 µg/ml)	bio-LPS (2 µg/ml)
1	5	+	+	-	-
2	5	+	+	+	-
3	5	+	+	-	+

Procedura

La procedura dell'esperimento è identica a quella riportata nell'esempio 1.6 eccetto per l'uso di LPS o biotina-LPS al posto di TNF e biotina-TNF, rispettivamente.

Risultati

I risultati ottenuti sono riportati in tabella 5. Come si può osservare il trattamento delle cellule con mAb bio-19E12/neutravidina/bio-LPS (gruppo 3) ha determinato una riduzione della tumorigenicità delle cellule RMA Thy1.1 Cl.2, nei topi, rispetto ai topi trattati nello stesso modo ma senza bio-LPS (gruppo 1) o con LPS (gruppo 2).

Questi risultati indicano che il bio-LPS legato alla membrana cellulare mediante un "ponte" di anticorpo-biotina/neutravidina è in grado di scatenare funzioni effetttrici tali da ridurre la tumorigenicità delle cellule RMA thy 1.1 Cl.2 *in vivo*.

Ai due topi sopravvissuti al trentesimo giorno dall'inoculo (v. Tabella 5) sono state inoculate nell'altro fianco cellule RMA thy 1.1 fresche, non trattate, al fine di verificare un eventuale risposta immunitaria scatenata dal trattamento precedente. Come si può osservare

in tabella 5 i due topi sono sopravvissuti anche al secondo inoculo.

Siccome le cellule inoculate non erano state trattate rispetto al primo inoculo, questi risultati indicano che il primo trattamento ha indotto una "memoria" immunitaria.

Tabella 5

Percentuale di sopravvivenza nei tre gruppi di topi trattati secondo lo schema riportato in tabella 4 a vari giorni dall'inoculo

Gruppo	Giorni trascorsi dal primo inoculo										
	10	18	19	20	21	22	25	30 ^{a)}	40	45	60
1	100	60	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	100	100	40	20	20	0	0	0	0	0	0
3	100	100	100	80	80	60	60	40	40	40	40

a) Secondo inoculo: ai due topi sopravvissuti sono state risomministrate cellule RMA Thy 1.1 fresche non trattate.

Bibliografia pertinente

Aggarwal B.B. and Pocsik E. Cytokines from clone to Clinic. Arch. Biochem. Biophys. 292, 335-359 (1992).

Beutler, B., and A. Cerami. (1989). The biology of cachectin/TNF - a primary mediator of the host response. Ann. Rev. Immunol. 7: 625.

Carswell, E.A., L.J. Old, R.L. Kassel, S. Greene, N. Fiore, and B. Williamson. 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72:3666.

Corti A., Bagnasco L., Cassani C. (1994) Identification of an epitope of TNF receptor type 1 (p55) recognized by a TNF antagonist monoclonal antibody. Lymph. Cytokine Res. 13, 183-190.

Fiers W. (1991). TNF: Characterization at the molecular and cellular

and in vivo levels. FEBS Lett. 285, 199-212.

Hoogenboom, HR., Volkaert G., and Rausw C.M. (1991) Construction and expression of antibody-TNF fusion proteins. Molecular Immunology 28: 1027-1037.

Lienard, D., Ewalenko, P., Delmotte J.J., Renar, N., Lejeune, F. (1992) High-dose recombinant tumor necrosis factor in combination with interferon gamma and Melphalan in isolation perfusion of the limbs for melanoma and sarcoma. J. Clin Oncol. 10:52-60.

Loetscher H., Steueber D., Banner D., Mackay F., Lesslauer W. (1993) Human TNF alpha mutants with exclusive specificity for the 55 kDa or 75-kDa TNF receptors. J. Biol. Chem. 268:26350-26357.

Rathien DA, Furphy L.J. and Aston R. (1992) Selective enhancement of the tumor necrosis activity of TNFalpha with monoclonal antibody Br. J. Cancer 39:266-273.

Paganelli G., P. Magnani, F. Zito, E. Villa, F. Sudati, L. Lopalco, C. Rossetti, M. Malcovati, F. Chiolerio, E. Seccamani, A.G. Siccardi and F. Fazio. (1991). Three-step monoclonal antibodies tumor targeting in CEA-positive patients. Cancer Res. 51:5960-5966.

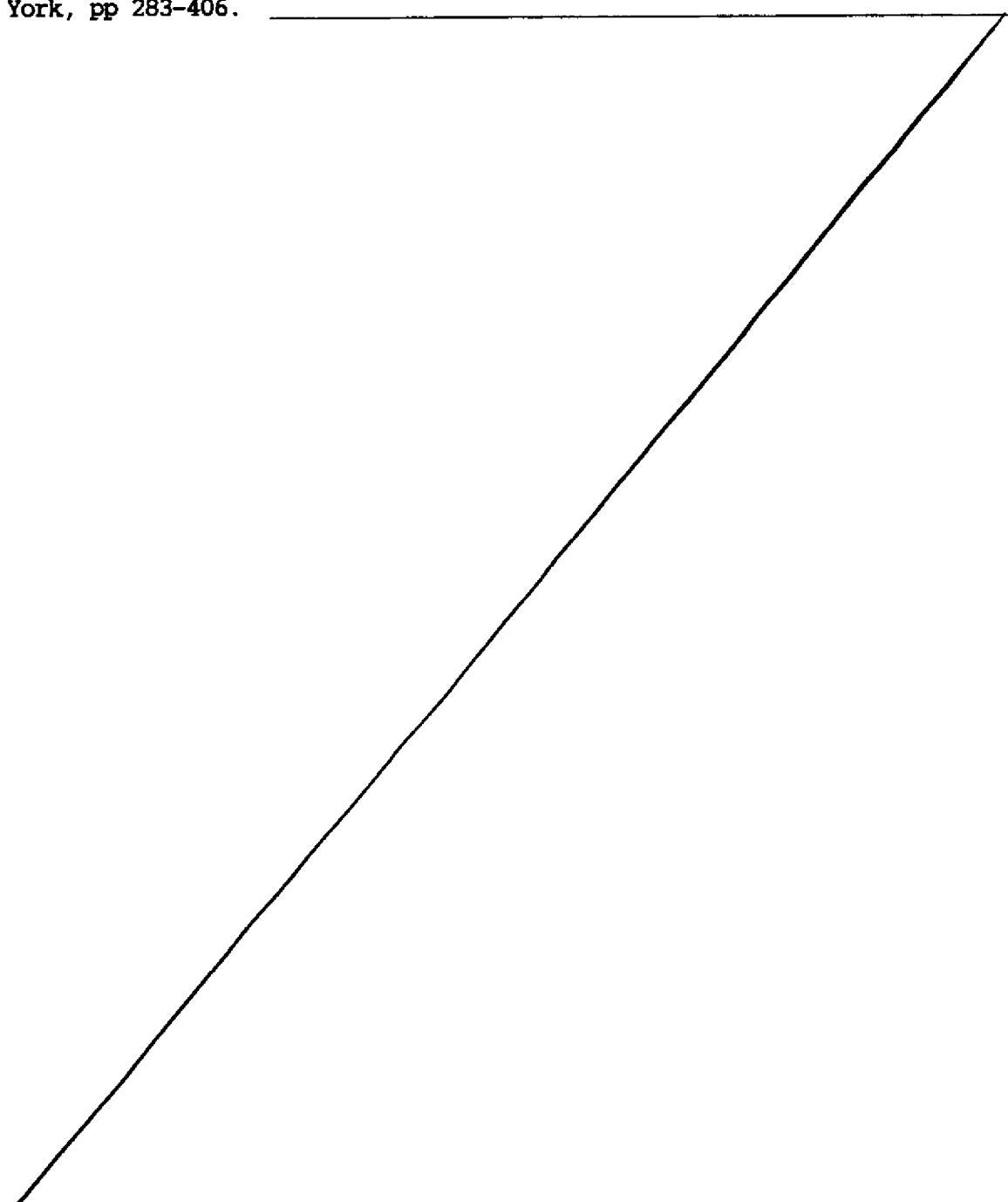
Paganelli G., C. Belloni, P. Magnani, F. Zito, A. Pasini, I. Sassi, M. Meroni, M. Mariani, M. Vignali, A.G. Siccardi and F. Fazio. (1992). Two-step tumour targeting in ovarian cancer patients using biotinylated monoclonal antibodies and radioactive streptavidin. Eur. J. Nucl. Med. 19:322-329.

Paganelli G., A.G. Siccardi, M. Malcovati, G.A. Scassellati and F. Fazio. (1993). Biotinylated monoclonal antibodies: their potential for

diagnosis and therapy of cancer. Curr. Op. Ther. Pat. 3: 1465-1474.

Sidhu R S. and A.P. Bollon (1993) Tumor Necrosis Factor activities and cancer therapy- a perspective Pharmac. Ther. 57, 79-128.

Spring DR., Yates SW (1992) Cancer chemotherapy. Experiences with TNF administration in humans. In Tumor Necrosis Factor: The Molecules and their emerging roles in medicine, ed. B. Beutler Raven Press, Ltd, New York, pp 283-406.



RIVENDICAZIONI

1. Composizioni farmaceutiche in forma di preparazioni associate per l'impiego sequenziale in terapia che comprendono:
 - a) un composto anti-bersaglio patologico coniugato ad un ligando di un sistema almeno ternario ligando/anti-ligando/ligando;
 - b) un anti-ligando complementare al ligando del composto a);
 - c) una citochina coniugata ad un ligando complementare all'anti-ligando b), con la condizione che l'interazione ligando/anti-ligando/ligando sia caratterizzata da un'affinità almeno un ordine di grandezza superiore rispetto all'affinità tra citochina e i suoi recettori naturali.
2. Composizioni secondo la rivendicazione 1, in cui il ligando è biotina e l'anti-ligando è avidina, streptavidina o neutravidina.
3. Composizioni secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui il composto a) e citochina sono entrambi coniugati a biotina e il componente b) è avidina, streptavidina o neutravidina.
4. Composizioni secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti, in cui il composto anti-bersaglio patologico è un anticorpo.
5. Composizioni secondo la rivendicazione 4, in cui l'anticorpo è monoclonale.
6. Composizioni secondo la rivendicazione 4 o 5, in cui l'anticorpo è un anticorpo diretto verso antigeni tumorali.
7. Composizioni secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti, in cui la citochina è il fattore di necrosi tumorale (TNF).
8. Composizioni secondo la rivendicazione 7, in cui il fattore di

necrosi tumorale è biotinilato.

9. Composizioni secondo la rivendicazione 8, in cui il fattore di necrosi tumorale è biotinilato nella regione amino-terminale.

10. Fattore di necrosi tumorale coniugato a un ligando nella regione amino-terminale.

11. Fattore di necrosi tumorale secondo la rivendicazione 10, in cui il ligando è coniugato all' α -aminogruppo del residuo 1.

12. Fattore di necrosi tumorale secondo la rivendicazione 10 o 11, in cui il ligando è biotina.

13. Fattore di necrosi tumorale secondo la rivendicazione 10 o 11, in cui il ligando è una proteina o un frammento di proteina biotinilata.

14. Procedimento per la preparazione del fattore di necrosi tumorale delle rivendicazioni 10-13 che comprende la reazione del fattore di necrosi tumorale con biotina-6-aminocaproil-N-idrossisuccinimide a pH compreso fra 5,5 e 7,5.

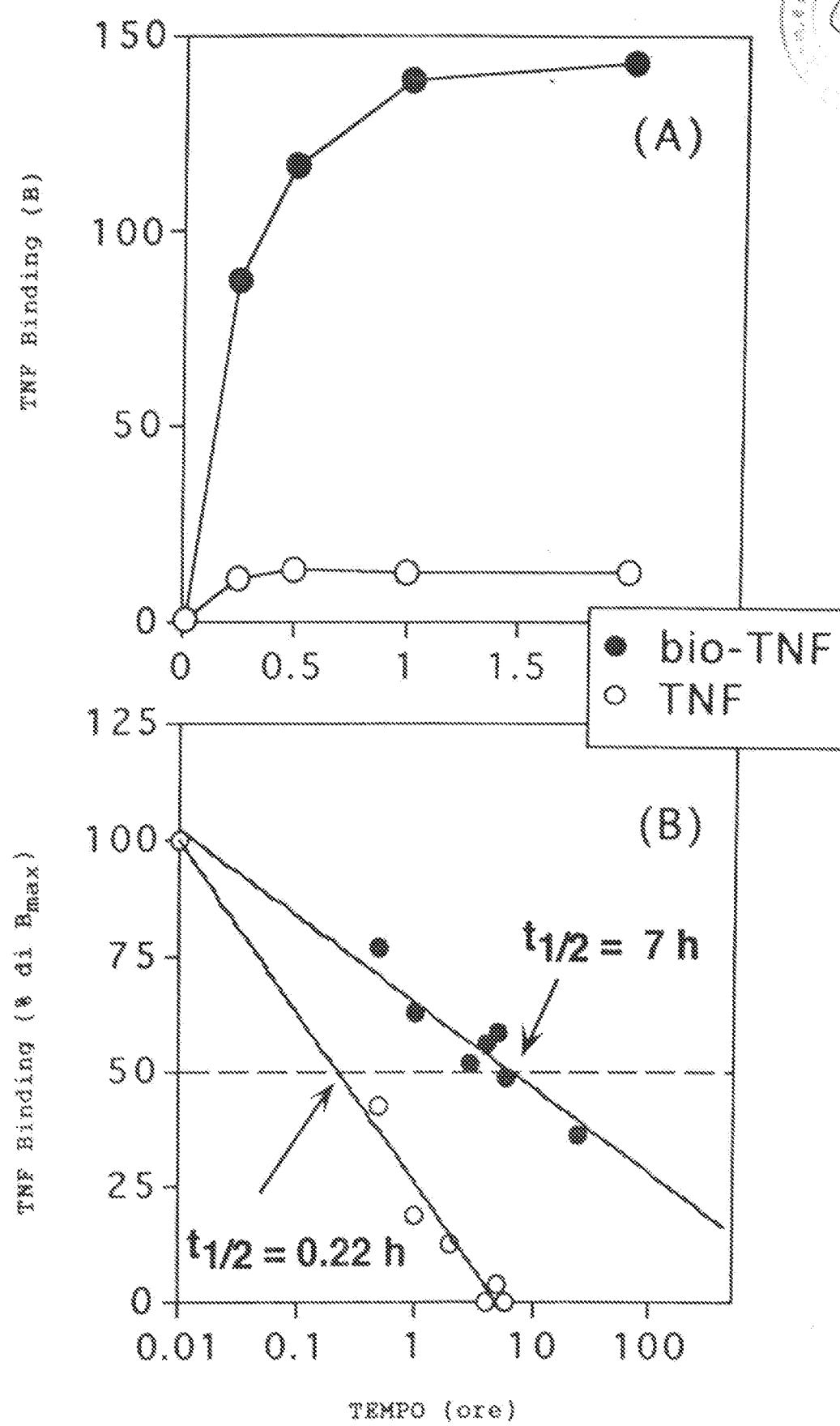
15. Fattore di necrosi tumorale biotinilato ottenibile per rimescolamento di subunità tra fattore di necrosi tumorale biotinilato e fattore di necrosi tumorale non biotinilato in rapporto 1:3 per 24-72 ore a 4°C.

Milano, 27 febbraio 1996

Il Mandatario
(Bianchetti Marina)
dello Studio Consulenza Brevettuale s.r.l.

M. Bianchetti

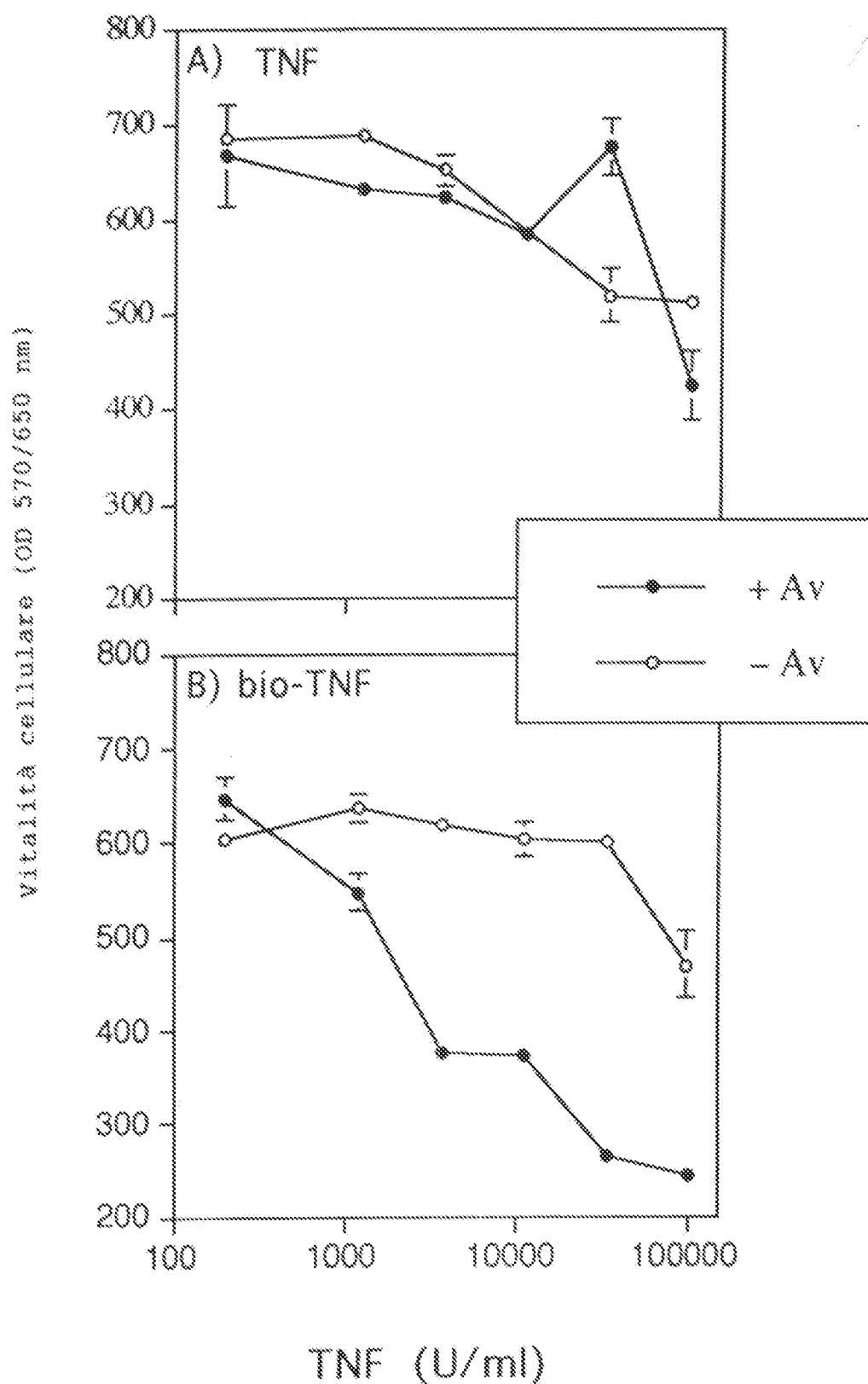
FIGURA 1



Il Mandatario
(Minoja Fabrizio)
dello Studio Consulenza Brevettuale s.r.l.

F. Minoja

FIGURA 2



Il Mandatario
(Minoia Fabrizio)
dello Studio Consulenza Brevettuale s.r.l.

F. Minoia