

TRADUZIONE DEL TESTO DEL BREVETTO EUROPEO N. 2726508

DAL TITOLO:

“ANTICORPI NEI CONFRONTI DELLA ADP-RIBOSIL CICLASI 2”

DEPOSITATA IL:

*** **

INTRODUZIONE

La presente descrizione riguarda in generale i campi dell'immunologia e della biologia molecolare. Più specificamente, vengono qui forniti anticorpi ed altre proteine terapeutiche diretti nei confronti della ADP-ribosil ciclasi 2, acidi nucleici codificanti tali anticorpi e proteine terapeutiche, metodi per preparare anticorpi monoclonali ed altre proteine terapeutiche, e metodi per il trattamento di malattie, quali tumori mediati dall'espressione/attività della ADP-ribosil ciclasi 2 e/o associati a espressione/attività anormale di ligandi per questa.

SFONDO DELL'INVENZIONE

L'ADP-ribosil ciclasi 2 (nota anche come antigene stromale del midollo osseo 1 (BST1) o CD157) è un ectoenzima bifunzionale ancorato a lipidi che catalizza la ciclizzazione e l'idrolisi di ribonucleotidi. Essa genera i secondi messaggeri nucleotidici ADP-ribosio ciclico e ADP-ribosio che sono in grado di attivare il rilascio di calcio e la fosforilazione delle proteine (FEBS Lett. 1994, 356(2-3):244-8). È in grado di supportare la crescita di cellule pre-B in modo paracrino, probabilmente attraverso generazione di metaboliti NAD⁺ (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994, 91:5325-5329; J. Biol. Chem. 2005, 280:5343-5349).

L'ADP-ribosil ciclastasi 2 ed il suo omologo, CD38, sembrano agire come recettori, generando metaboliti di secondi messaggeri che inducono rilascio del Ca²⁺ intracellulare attraverso il recettore della rianodina (Biochem. Biophys. Res. Commun. 1996, 228(3):838-45). Essa può agire anche attraverso l'integrina CD11b per effettuare il rilascio di Ca²⁺ attraverso la via metabolica della chinasi PI-3 (J Biol Regul Homeost Agents. 2007;21(1-2):5-11). BST1 non è stato precedentemente riportato originare da membrane cellulari di leucemia mieloide acuta (LMA), cancro della mammella, cancro del colon-retto, cancro del rene, cancro del polmone o cancro del pancreas e rappresenta una proteina di nuovo valore terapeutico e diagnostico. BST1 è mostrato anche essere espresso su monociti e granulociti, i quali possono entrambi essere associati a malattie quali asma, gotta, morbo di Crohn, lupus e diabete, ed essere attivati in queste. I monociti sono anche implicati nello sviluppo di placche aterosclerotiche.

RIASSUNTO DELL'INVENZIONE

La presente descrizione fornisce anticorpi diretti contro il BST1, acidi nucleici codificanti tali anticorpi e proteine terapeutiche, metodi per preparare anticorpi anti-BST1, e uso degli anticorpi per il trattamento di malattie, quali i disturbi mediati da BST1, per esempio tumori umani, compresi leucemia mieloide acuta (LMA), leucemia linfocitica cronica dei linfociti B, cancro della mammella, cancro del colon-retto, cancro del rene, cancro della testa e del collo, cancro del polmone, cancro ovarico, cancro del pancreas indicati di seguito come 'malattie dell'invenzione'. Vengono inoltre descritti metodi per trattare malattie infiammatorie umane, compresi

asma, gotta, morbo di Crohn, lupus, sclerosi multipla, artrite reumatoide, psoriasi, diabete ed aterosclerotico.

Così, la presente descrizione fornisce anticorpi isolati, in particolare anticorpi monoclonali murini, chimerici, umanizzati e completamente umani che si legano al BST1 e mostrano una o più proprietà funzionali desiderabili. Tali proprietà includono, per esempio, legame specifico ad affinità elevata al BST1. Viene inoltre fornito l'uso degli anticorpi dell'invenzione per trattare una varietà delle malattie mediate da BST1.

In una forma di realizzazione, l'anticorpo anti-BST1 isolato possiede:

a) una regione variabile della catena pesante comprendente:

i) una prima CDR comprendente una sequenza identica almeno per l'80% alla SEQ ID NO: 10;

ii) una seconda CDR comprendente una sequenza identica almeno per l'80% alla SEQ ID NO:12 o alla SEQ ID NO:51;

iii) una terza CDR comprendente una sequenza identica almeno per l'80% alla SEQ ID NO:14; e

b) una regione variabile della catena leggera comprendente:

i) una prima CDR comprendente una sequenza identica almeno per l'80% alla SEQ ID NO:16;

ii) una seconda CDR comprendente una sequenza identica almeno per l'80% alla SEQ ID NO:18;

iii) una terza CDR comprendente una sequenza identica almeno per l'80% alla SEQ ID NO: 20.

In un ulteriore esempio, l'anticorpo anti-BST1 isolato possiede:

a) una regione variabile della catena pesante comprendente:

i) una prima CDR comprendente una sequenza identica almeno per l'80% alla SEQ ID NO: 9;

ii) una seconda CDR comprendente una sequenza identica almeno per l'80% alla SEQ ID NO:11;

iii) una terza CDR comprendente una sequenza identica almeno per l'80% alla SEQ ID NO:13; e

b) una regione variabile della catena leggera comprendente:

i) una prima CDR comprendente una sequenza identica almeno per l'80% alla SEQ ID NO:15;

ii) una seconda CDR comprendente una sequenza identica almeno per l'80% alla SEQ ID NO:17;

iii) una terza CDR comprendente una sequenza identica almeno per l'80% alla SEQ ID NO:19.

In un ulteriore esempio, l'anticorpo anti-BST1 isolato possiede:

a) una regione variabile della catena pesante comprendente:

i) una prima CDR comprendente una sequenza identica almeno per l'80% alla SEQ ID NO:56;

ii) una seconda CDR comprendente una sequenza identica almeno per l'80% alla SEQ ID NO:57;

iii) una terza CDR comprendente una sequenza identica almeno per l'80% alla SEQ ID NO:58; e

b) una regione variabile della catena leggera comprendente:

i) una prima CDR comprendente una sequenza identica almeno per l'80% alla SEQ ID NO:59;

ii) una seconda CDR comprendente una sequenza identica almeno per l'80% alla SEQ ID NO: 60;

iii) una terza CDR comprendente una sequenza identica almeno per l'80% alla SEQ ID NO: 61.

L'epitopo/Gli epitopi riconosciuto/i dagli anticorpi dell'invenzione si trova/no all'interno della sequenza polipeptidica della SEQ ID NO: 44.

In un ulteriore esempio, gli anticorpi comprendono CDR variabili rispetto agli anticorpi progenitori qui descritti. Così, la descrizione fornisce anticorpi varianti comprendenti regioni variabili varianti di un anticorpo progenitore, in cui l'anticorpo progenitore comprende una prima vhCDR comprendente la SEQ ID NO: 10, una seconda vhCDR comprendente una sequenza scelta nel gruppo composto dalle SEQ ID NO:12 e SEQ ID NO:51, una terza vhCDR comprendente la SEQ ID NO:14, una prima vICDR comprendente la SEQ ID NO:16, una seconda vICDR comprendente la SEQ ID NO:18; ed una terza vICDR comprendente una SEQ ID NO:20, ed in cui l'anticorpo variante ha 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sostituzioni amminoacidiche collettivamente nella serie della prima vhCDR, della seconda vhCDR, della terza vhCDR, della prima vICDR, della seconda vICDR e della terza vICDR, con da 1 a 4 sostituzioni di uso particolare, ed in cui l'anticorpo mantiene il legame specifico a BST1. In modo simile, l'anticorpo progenitore può comprendere una prima vhCDR comprendente la SEQ ID NO:9, una seconda vhCDR comprendente la SEQ ID NO:11, una terza vhCDR comprendente la SEQ ID NO:13; una

prima vICDR comprendente la SEQ ID NO:15, una seconda vICDR comprendente la SEQ ID NO:17 ed una terza vICDR comprendente una SEQ ID NO:19. Inoltre, l'anticorpo progenitore può comprendere una prima vhCDR comprendente la SEQ ID NO:56, una seconda vhCDR comprendente la SEQ ID NO:57, una terza vhCDR comprendente la SEQ ID NO:58, una prima vICDR comprendente la SEQ ID NO:59, una seconda vICDR comprendente la SEQ ID NO:60 ed una terza vICDR comprendente una SEQ ID NO:61.

In un'ulteriore forma di realizzazione, l'anticorpo anti-BST1 isolato possiede la sequenza della regione variabile della catena pesante come rappresentato dalla SEQ ID NO:2 e la sequenza della regione variabile della catena leggera come rappresentato dalla SED ID NO: 4.

In un altro esempio, l'anticorpo anti-BST1 isolato possiede la sequenza della regione variabile della catena pesante come rappresentato dalla SEQ ID NO: 45 e la sequenza della regione variabile della catena leggera come rappresentato dalla SEQ ID NO: 49.

In un altro esempio, l'anticorpo anti-BST1 isolato possiede la sequenza della regione variabile della catena pesante come rappresentato dalla SEQ ID NO:1 e la sequenza della regione variabile della catena leggera come rappresentato dalla SED ID NO: 3.

In un ulteriore esempio, l'anticorpo anti-BST1 isolato possiede la sequenza della regione variabile della catena pesante come rappresentato dalla SEQ ID NO:52 e la sequenza della regione variabile della catena leggera come rappresentato dalla SED ID NO: 53.

In una forma di realizzazione, qualsiasi dei precedenti anticorpi possiede un dominio Fc. In alcune forme di realizzazione, il dominio Fc è umano. In altre forme di realizzazione, il dominio Fc è un dominio Fc umano variante.

In un'altra forma di realizzazione, qualsiasi dei precedenti anticorpi descritti sono anticorpi monoclonali.

In una forma di realizzazione, qualsiasi dei precedenti anticorpi descritti possiede inoltre un agente coniugato. In alcune forme di realizzazione l'agente coniugato è un agente citotossico. In altre forme di realizzazione, l'agente coniugato è un polimero. In un'altra forma di realizzazione, il polimero è un polietilenglicole (PEG). In un'altra forma di realizzazione, il PEG è un derivato del PEG.

In un esempio, l'anticorpo isolato è un anticorpo che compete con qualsiasi dei precedenti anticorpi per il legame ad BST1.

In un'altra forma di realizzazione, viene descritto un metodo per preparare qualsiasi dei precedenti anticorpi, il metodo essendo l'ottenere una cellula ospite che contiene una o più molecole di acido nucleico codificanti gli anticorpi precedenti, il far crescere la cellula ospite in una coltura di cellule ospiti, il fornire condizioni di coltura della cellula ospite in cui l'una o più molecole di acido nucleico vengono espresse, ed il recuperare l'anticorpo dalla cellula ospite o dalla coltura della cellula ospite.

In un esempio, qualsiasi degli anticorpi descritti anti-BST1 viene fornito in una composizione farmaceutica.

In un altro esempio, un metodo per il trattamento o per la prevenzione di una malattia associata a BST1, il metodo essendo il somministrare ad un soggetto che lo richiede qualsiasi dei precedenti anticorpi in una quantità efficace.

La presente descrizione fornisce un anticorpo monoclonale isolato, o una sua porzione legante l'antigene, un frammento anticorpale, o un anticorpo mimetico che si lega ad un epitopo sul BST1 umano riconosciuto da un anticorpo comprendente una regione variabile della catena pesante comprendente una sequenza amminoacidica esposta in una SEQ ID NO: scelta nel gruppo consistente di 2, 1 e 52 ed una regione variabile della catena leggera comprendente una sequenza amminoacidica esposta in una SEQ ID NO: scelta nel gruppo consistente di 4, 3 e 53. In alcuni esempi l'anticorpo isolato è un anticorpo a lunghezza intera di un isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo della presente invenzione viene scelto nel gruppo consistente di: un anticorpo intero, una porzione legante l'antigene, un anticorpo umanizzato, un anticorpo a catena singola, un immunoconiugato, un anticorpo defucosilato, ed un anticorpo bispecifico. Vengono inoltre descritti frammenti anticorpali, questi possono essere scelti dal gruppo consistente di: un UniBody, un anticorpo a dominio ed un nanobody. In alcune forme di realizzazione, gli immunoconiugati dell'invenzione comprendono un agente terapeutico. In un altro aspetto dell'invenzione, l'agente terapeutico è una citotossina o un isotopo radioattivo.

In alcuni esempi, l'anticorpo viene scelto nel gruppo consistente di: un Affibody, un DARPin, un'anticalina, un avimer, un versabody ed una duocalina.

In forme di realizzazione alternative, composizioni della presente invenzione comprendono un anticorpo isolato o una porzione legante l'antigene ed un veicolante farmaceuticamente accettabile.

Anticorpi qui descritti possono essere una composizione comprendente l'anticorpo isolato o una porzione legante l'antigene ed un veicolante farmaceuticamente accettabile.

In alcune forme di realizzazione, l'invenzione comprende una molecola di acido nucleico isolata codificante la catena pesante e leggera dell'anticorpo isolato o una porzione legante l'antigene. Altri aspetti dell'invenzione comprendono vettori di espressione comprendenti tali molecole di acido nucleico, e cellule ospiti comprendenti tali vettori di espressione.

In alcune forme di realizzazione, la presente invenzione fornisce un metodo per preparare un anticorpo anti-BST1, il suddetto metodo comprendendo le fasi di: ottenere una cellula ospite che contiene una o più molecole di acido nucleico codificanti l'anticorpo dell'invenzione; far crescere la cellula ospite in una coltura di cellule ospiti; fornire condizioni di coltura della cellula ospite in cui l'una o più molecole di acido nucleico vengono espresse; e recuperare l'anticorpo dalla cellula ospite o dalla coltura della cellula ospite.

Vengono qui descritti metodi per trattare o per prevenire una malattia associata a cellule bersaglio esprimenti il BST1, il suddetto

metodo comprendendo la fase di somministrare ad un soggetto un anticorpo anti-BST1, o sua porzione legante l'antigene, in una quantità efficace per trattare o per prevenire la malattia. In alcuni esempi, la malattia trattata o prevenuta dagli anticorpi o dalla sua porzione legante l'antigene, è il cancro umano.

Vengono inoltre descritti metodi per trattare o per prevenire una malattia associata a cellule bersaglio esprimenti il BST1, il suddetto metodo comprendendo la fase di somministrare ad un soggetto un anticorpo anti-BST1, o una sua porzione legante l'antigene, in una quantità efficace per trattare o per prevenire la malattia. In alcuni esempi, la malattia trattata o prevenuta dagli anticorpi o dalla porzione legante l'antigene è il cancro umano.

In altre forme di realizzazione, l'invenzione è diretta ad un anticorpo anti-BST1, o ad sua porzione legante l'antigene, per uso nel trattamento di una malattia associata a cellule bersaglio esprimenti il BST1. In alcuni aspetti, la malattia trattata o prevenuta dagli anticorpi o da una sua porzione legante l'antigene dell'invenzione è il cancro umano. In alcune forme di realizzazione, le malattie trattate o prevenute dagli anticorpi della presente invenzione sono le malattie dell'invenzione.

Viene inoltre descritto l'uso di un anticorpo anti-BST1, o di una sua porzione legante l'antigene, per la preparazione di un medicamento per uso nel trattamento o nella prevenzione di una malattia associata a cellule bersaglio esprimenti il BST1. In alcuni esempi, la malattia trattata o prevenuta dal medicamento dell'invenzione è il cancro umano. In alcuni

esempi, le malattie trattate o prevenute dal medicamento della presente invenzione sono le malattie dell'invenzione.

Viene inoltre descritto un anticorpo monoclonale isolato o una sua porzione legante l'antigene, un frammento anticorpale, o un anticorpo mimetico che si lega ad un epitopo sul BST1 umano riconosciuto da un anticorpo comprendente una regione variabile della catena pesante ed una regione variabile della catena leggera scelto nel gruppo consistente della sequenza amminoacidica della regione variabile della catena pesante esposta nella SEQ ID NO:2 e la sequenza amminoacidica della regione variabile della catena leggera esposta nella SEQ ID NO: 4; la sequenza amminoacidica della regione variabile della catena pesante esposta nella SEQ ID NO:1 e la sequenza amminoacidica della regione variabile della catena leggera esposta nella SEQ ID NO: 3; la sequenza amminoacidica della regione variabile della catena pesante esposta nella SEQ ID NO:52 e la sequenza amminoacidica della regione variabile della catena leggera esposta nella SEQ ID NO:53. In alcuni esempi, l'anticorpo viene scelto nel gruppo consistente di: un anticorpo intero, un frammento anticorpale, un anticorpo umanizzato, un anticorpo a catena singola, un immunoconiugato, un anticorpo defucosilato, ed un anticorpo bispecifico. In ulteriori esempi, il frammento anticorpale viene scelto nel gruppo consistente di: un UniBody, un anticorpo a dominio, ed un nanobody. In alcuni esempi, l'anticorpo mimetico viene scelto nel gruppo consistente di: un Affibody, un DARPin, un'anticalina, un avimer, un versabody, ed una duocalina. In ulteriori forme di realizzazione, la composizione comprende

l'anticorpo isolato o sua porzione legante l'antigene ed un veicolante farmaceuticamente accettabile.

In alcune forme di realizzazione, la presente invenzione è una molecola di acido nucleico isolata codificante le catene pesante e leggera dell'anticorpo isolato o la loro porzione legante l'antigene dell'anticorpo dell'invenzione, ed in ulteriori aspetti può includere un vettore di espressione comprendente tali acidi nucleici, e cellule ospiti comprendenti tali vettori di espressione.

Un'altra forma di realizzazione della presente invenzione è un ibridoma esprimente l'anticorpo o una sua porzione legante l'antigene di uno qualsiasi degli anticorpi dell'invenzione.

Vengono inoltre descritti metodi per preparare gli anticorpi della descrizione, comprendenti le fasi di:

immunizzare un animale con un peptide BST1;

recuperare l'mRNA dai linfociti B del suddetto animale;

convertire il suddetto mRNA in cDNA;

far esprimere il suddetto cDNA in fagi in modo tale che gli anticorpi anti-BST1 codificati dal suddetto cDNA vengano presentati sulla superficie dei suddetti fagi;

selezionare i fagi che presentano anticorpi anti-BST1;

recuperare le molecole di acido nucleico dai suddetti fagi scelti che codificano le suddette immunoglobuline anti-BST1;

far esprimere le suddette molecole di acido nucleico recuperate in una cellula ospite; e

recuperare dalla suddetta cellula ospite gli anticorpi che si legano al BST1.

In alcuni esempi, l'anticorpo monoclonale isolato, o una sua porzione legante l'antigene, si legano ad un epitopo sul polipeptide BST1 avente una sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 44 riconosciuta da un anticorpo comprendente una regione variabile della catena pesante comprendente una sequenza amminoacidica esposta in una SEQ ID NO: scelta nel gruppo consistente di 2, 1 o 52, ed una regione variabile della catena leggera comprendente una sequenza amminoacidica esposta in una SEQ ID NO: scelta nel gruppo consistente di 4, 3 o 53.

Altre caratteristiche e vantaggi della presente invenzione saranno evidenti dalla seguente descrizione dettagliata e dagli esempi che non dovrebbero essere intesi come limitanti.

BREVE DESCRIZIONE DELLE FIGURE

La Figura 1a mostra l'allineamento delle sequenze nucleotidiche delle regioni CDR1 della catena pesante di A1 (SEQ ID NO:21) con i nucleotidi 138392-138424 della sequenza dei nucleotidi V_H 1-80 della linea germinale di topo (SEQ ID NO:33); l'allineamento delle sequenze nucleotidiche delle regioni CDR1 della catena pesante di A2 (SEQ ID NO:22) con i nucleotidi 153362-153394 della sequenza dei nucleotidi V_H 1-39 della linea germinale di topo (SEQ ID NO:35).

La Figura 1b mostra l'allineamento delle sequenze nucleotidiche delle regioni CDR2 della catena pesante di A1 (SEQ ID NO:23) con i nucleotidi 138461-138511 della sequenza dei nucleotidi V_H 1-80 della linea germinale di topo (SEQ ID NO:34); l'allineamento delle sequenze

nucleotidiche delle regioni CDR2 della catena pesante di A2 (SEQ ID NO:24) con i nucleotidi 153431-153481 della sequenza dei nucleotidi V_H 1-39 della linea germinale di topo (SEQ ID NO:36).

La Figura 2a mostra l'allineamento delle sequenze nucleotidiche delle regioni CDR1 della catena leggera di A1 (SEQ ID NO:27) con i nucleotidi 496-531 della sequenza nucleotidica V_K 4-74 della linea germinale di topo (SEQ ID NO:37); l'allineamento delle sequenze nucleotidiche delle regioni CDR1 della catena leggera di A2 (SEQ ID NO:28) con nucleotidi 523-552 della sequenza nucleotidica V_K 4-55 della linea germinale di topo (SEQ ID NO:40).

La Figura 2b mostra l'allineamento delle sequenze nucleotidiche delle regioni CDR2 della catena leggera di A1 (SEQ ID NO:29) con i nucleotidi 577-597 della sequenza nucleotidica V_K 4-74 della linea germinale di topo (SEQ ID NO:38); l'allineamento delle sequenze nucleotidiche delle regioni CDR2 della catena leggera di A2 (SEQ ID NO:30) con i nucleotidi 598-618 della sequenza nucleotidica V_K 4-55 della linea germinale di topo (SEQ ID NO:41).

La Figura 2c mostra l'allineamento delle sequenze nucleotidiche delle regioni della catena leggera CDR3 di A1 (SEQ ID NO:31) con i nucleotidi 691-718 della sequenza nucleotidica V_K 4-74 della linea germinale di topo (SEQ ID NO:39); l'allineamento delle sequenze nucleotidiche delle regioni CDR3 della catena leggera di A2 (SEQ ID NO:32) con i nucleotidi 715-739 della sequenza nucleotidica V_K 4-55 della linea germinale di topo (SEQ ID NO:42).

Le Figure 3a e 3b mostrano i risultati dell'analisi di flusso citometrico di BST1 su cellule A549 e H226.

Le Figure 4a e 4b mostrano l'internalizzazione di anticorpi monoclonali anti-BST1 da parte di cellule A549 e H226, utilizzando il saggio MabZAP.

La Figura 5 mostra l'allineamento dei residui 21-137 della SEQ ID NO:2 (SEQ ID NO: 45), catena V_H umanizzata con le regioni CDR (evidenziate in grassetto) della SEQ ID NO:2 trasferite nelle posizioni corrispondenti della linea germinale umana BF238102 VH (SEQ ID NO: 46), con la linea germinale umana BF238102 VH (SEQ ID NO: 47). I residui che mostrano contatto significativo con regioni CDR sono stati messi al posto dei residui umani corrispondenti. Queste sostituzioni (sottolineate) sono state eseguite alle posizioni 30, 48, 67, 71 e 100.

La Figura 6 mostra l'allineamento dei residui 22-128 della SEQ ID NO: 4 (SEQ ID NO: 48), catena VL umanizzata con le regioni CDR (evidenziate in grassetto) della SEQ ID NO: 4 trasferite nelle posizioni corrispondenti della VL della linea germinale umana X72441 (SEQ ID NO: 49), con la VL della linea germinale umana X72441 (SEQ ID NO:50). I residui che mostrano contatto significativo con regioni CDR sono stati messi al posto dei residui umani corrispondenti. Una sostituzione (sottolineata) è stata eseguita alla posizione 71.

La Figura 7 mostra l'allineamento della regione CDR2 della catena pesante A2 (SEQ ID NO:12) con possibili sostituzioni amminoacidiche (SEQ ID NO:51) senza perdere l'affinità di legame per l'antigene.

La Figura 8 mostra BST1_A2 e BST1_A2_NF che stimolano una risposta di citotossicità cellulare dipendente dagli anticorpi (ADCC) in presenza di cellule effettrici.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

La presente descrizione riguarda anticorpi isolati, compresi, ma senza limitazione, anticorpi monoclonali, per esempio, che si legano specificamente al BST1 con affinità elevata come qui descritto. In certi esempi, gli anticorpi forniti possiedono caratteristiche strutturali particolari quali regioni CDR con sequenze amminoacidiche particolari. Questa descrizione fornisce anticorpi isolati (che, come descritto sotto, comprendono un'ampia varietà di strutture, derivati, mimetici e coniugati ben noti), metodi per preparare le suddette molecole, e composizioni farmaceutiche comprendenti le suddette molecole ed un veicolante farmaceutico. Questa descrizione riguarda anche metodi per utilizzare le molecole, come per rilevare il BST1, così come per trattare malattie associate all'espressione del BST1, quale il BST1 espresso in tumori ed in malattie infiammatorie, comprese le malattie dell'invenzione.

Affinché la presente descrizione possa essere più facilmente compresa, vengono prima definiti certi termini. Ulteriori definizioni sono esposte in ogni parte della descrizione dettagliata.

Anticorpi umanizzati e murini di questa descrizione possono, in certi casi, reagire in modo incrociato con il BST1 da una specie diversa dall'uomo. In certi esempi, gli anticorpi possono essere completamente specifici per uno o più BST1 umani e possono non mostrare reattività incrociata di specie o altri tipi di reattività incrociata non umana.

Il termine “risposta immunitaria” si riferisce all’azione, per esempio, di linfociti, cellule presentanti l’antigene, fagociti, granulociti, e macromolecole solubili prodotte dalle suddette cellule o dal fegato (compresi anticorpi, citochine e complemento) che risulta in danno selettivo a, distruzione di, o eliminazione dal corpo umano di agenti patogeni invasori, cellule o tessuti infettati con agenti patogeni, cellule cancerose o, in casi di autoimmunità o infiammazione patologica, cellule o tessuti umani normali.

Una “via di trasduzione del segnale” si riferisce alla relazione biochimica tra varie molecole di trasduzione del segnale che svolgono un ruolo nella trasmissione di un segnale da una porzione di una cellula ad un’altra porzione di una cellula. Come utilizzata qui, la frase “recettore cellulare superficiale” include, per esempio, molecole e complessi di molecole in grado di ricevere un segnale e la trasmissione di un tale segnale attraverso la membrana plasmatica di una cellula. Un esempio di un “recettore cellulare superficiale” è il BST1.

Il termine “anticorpo” come indicato qui include, al minimo, un frammento che lega un antigene (cioè “porzione legante l’antigene”) di un’immunoglobulina.

La definizione di “anticorpo” include, ma senza limitazione, anticorpi a lunghezza intera, frammenti anticorpali, anticorpi a catena singola, anticorpi bispecifici, minibody, dominio anticorpale, anticorpi sintetici (talvolta indicati qui come “mimetici anticorpali”), anticorpi chimerici, anticorpi umanizzati, fusioni con anticorpi (talvolta indicate come “coniugati anticorpali”) e frammenti e/o derivati di ciascuno,

rispettivamente. In generale, un anticorpo a lunghezza intera (talvolta indicato qui come "anticorpo intero") si riferisce ad una glicoproteina che può comprendere almeno due catene pesanti (H) e due catene leggere (L) interconnesse mediante legami disolfuro. Ciascuna catena pesante è costituita da una regione variabile della catena pesante (abbreviata qui come V_H) e da una regione costante della catena pesante. La regione costante della catena pesante è costituita da tre domini, C_{H1} , C_{H2} e C_{H3} . Ciascuna catena leggera è costituita da una regione variabile della catena leggera (abbreviata qui come V_L o V_K) e da una regione costante della catena leggera. La regione costante della catena leggera è costituita da un dominio, C_L . Le regioni V_H e V_L/V_K possono essere ulteriormente suddivise in regioni di ipervariabilità, chiamate regioni determinanti la complementarità (CDR), intervallate con regioni che sono più conservate, chiamate regioni cornice (FR). Ciascuna V_H e V_L/V_K è costituita da tre CDR e quattro FR, disposte dal dominio amminoterminale al dominio carbossiterminale nell'ordine seguente: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Le regioni variabili delle catene pesanti e leggere contengono un dominio di legame che interagisce con un antigene. Le regioni costanti degli anticorpi possono mediare il legame dell'immunoglobulina a tessuti o fattori dell'ospite, compresi varie cellule del sistema immunitario (per esempio cellule effettrici) ed il primo componente (C1q) del sistema del complemento classico.

In un esempio, l'anticorpo è un frammento anticorpale. Frammenti anticorpali specifici includono, ma senza limitazione, (i) il frammento Fab composto dai domini V_L , V_H , C_L e C_{H1} , (ii) il frammento Fd consistente dei

domini V_H e C_{H1} , (iii) il frammento F_v consistente dei domini V_L e V_H di un singolo anticorpo, (iv) il frammento dAb , che consiste di un dominio variabile singolo, (v) regioni CDR isolate, (vi) frammenti $F(ab')_2$, un frammento bivalente comprendente due frammenti Fab legati (vii) molecole F_v a catena singola ($scFv$), in cui un dominio V_H ed un dominio V_L sono legati da un gruppo di collegamento peptidico che permette ai due domini di associarsi per formare un sito legante l'antigene, (viii) dimeri F_v a catena singola bispecifici, e (ix) "diabody" o "triabody", frammenti multivalenti o multispecifici costruiti mediante fusione genica. I frammenti anticorpali possono essere modificati. Per esempio, le molecole possono essere stabilizzate mediante l'incorporazione di ponti disolfuro che collegano i domini V_H e V_L . Esempi di formati e strutture anticorpali vengono descritti in Holliger & Hudson (2006) *Nature Biotechnology* 23(9): 1126-1136, e Carter (2006) *Nature Reviews Immunology* 6:343-357, e nei riferimenti ivi citati.

La presente descrizione fornisce analoghi anticorpali. Tali analoghi possono comprendere una varietà di strutture, compresi, ma senza limitazione, anticorpi a lunghezza intera, frammenti anticorpali, anticorpi bispecifici, minibody, anticorpi a dominio, anticorpi sintetici (talvolta indicati qui come "mimetici anticorpali"), fusioni con anticorpi, anticorpo coniugato, e frammenti di ciascuno, rispettivamente.

In un esempio, l'immunoglobulina comprende un frammento anticorpale. Frammenti anticorpali specifici includono, ma senza limitazione, (i) il frammento Fab composto dai domini V_L , V_H , C_L e C_{H1} , (ii) il frammento F_d consistente dei domini V_H e C_{H1} , (iii) il frammento F_v

consistente dei domini V_L e V_H di un singolo anticorpo; (iv) il frammento dAb, che consiste di una singola variabile, (v) regioni CDR isolate, (vi) frammenti $F(ab')_2$, un frammento bivalente comprendente due frammenti Fab collegati (vii) molecole Fv a catena singola (scFv), in cui un dominio V_H ed un dominio V_L sono collegati da un gruppo di collegamento peptidico che permette ai due domini di associarsi per formare un sito legante l'antigene, (viii) dimeri Fv a catena singola bispecifici, e (ix) "diabody" o "triabody", frammenti multivalenti o multispecifici costruiti mediante fusione genica. I frammenti anticorpali possono essere modificati. Per esempio, le molecole possono essere stabilizzate mediante l'incorporazione di ponti disolfuro che collegano i domini V_H e V_L . Esempi di formati e strutture anticorpali vengono descritti in Holliger & Hudson, 2006, Nature Biotechnology 23(9):1126-1136, e Carter 2006, Nature Reviews Immunology 6:343-357 e nei riferimenti ivi citati.

I geni immunoglobulinici riconosciuti, per esempio, nell'uomo includono i loci genetici kappa (κ), lambda (λ) e della catena pesante, che insieme comprendono i numerosissimi geni per la regione variabile, ed i geni delle regioni costanti mu (μ), delta (δ), gamma (γ), sigma (σ), ed alfa (α) che codificano gli isotipi IgM, IgD, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4), IgE, e IgA (IgA1 e IgA2) rispettivamente. Anticorpo qui è inteso includere anticorpi a lunghezza intera e frammenti anticorpali, e può riferirsi ad un anticorpo naturale da qualsiasi organismo, un anticorpo geneticamente modificato, o un anticorpo generato per via ricombinante per scopi sperimentali, terapeutici o per altri scopi.

In una forma di realizzazione, un anticorpo qui descritto può essere un anticorpo multispecifico, ed in particolare un anticorpo bispecifico, talvolta indicato anche come “diabody”. Questi sono anticorpi che si legano a due (o più) antigeni differenti. I diabody possono essere prodotti in una varietà di modi noti nell’arte, per esempio preparati chimicamente o da ibridomi ibridi. In un esempio, l’anticorpo è un minibody. I minibody sono proteine simili ad anticorpi minimizzate comprendenti un scFv unito ad un dominio C_H3. In alcuni casi, l’scFv può essere unito alla regione Fc, e può includere alcune o tutte le regioni a cerniera. Per una descrizione di anticorpi multispecifici, si vedano Holliger e Hudson (2006) *Nature Biotechnology* 23(9): 1126-1136 e nei riferimenti ivi citati.

Con “CDR” come utilizzato qui si intende una “regione determinante la complementarietà” di un dominio variabile anticorpale. L’identificazione sistematica dei residui inclusi nelle CDR è stata sviluppata da Kabat (Kabat *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edizione, United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda) ed in alternativa da Chothia [Chothia e Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917; Chothia *et al.* (1989) *Nature* 342: 877-883; Al-Lazikani *et al.* (1997) *J. Mol. Biol.* 273: 927-948]. Per gli scopi della presente invenzione, le CDR vengono definite come una serie leggermente più piccola di residui rispetto alle CDR definite da Chothia. Le CDR di V_L sono qui definite per includere i residui nelle posizioni 27-32 (CDR1), 50-56 (CDR2) e 91-97 (CDR3), in cui la numerazione è secondo Chothia. Poiché le CDR di V_L come definite da

Chothia e Kabat sono identiche, la numerazione di queste posizioni delle CDR di V_L è anche secondo Kabat. Le CDR di V_H sono qui definite per includere residui nelle posizioni 27-33 (CDR1), 52-56 (CDR2) e 95-102 (CDR3), in cui la numerazione è secondo Chothia. Queste posizioni delle CDR di V_H corrispondono alle posizioni di Kabat 27-35 (CDR1), 52-56 (CDR2) e 95-102 (CDR3).

Come sarà apprezzato da parte di coloro che sono esperti nell'arte, le CDR qui descritte possono includere anche varianti, per esempio, quando si retromutano le CDR qui descritte in regioni cornice differenti. Generalmente, l'identità di acido nucleico tra le singole CDR varianti è almeno dell'80% alle sequenze qui descritte, e più tipicamente con identità preferibilmente crescenti almeno dell'85%, del 90%, del 91%, del 92%, del 93%, del 94%, del 95%, del 96%, del 97%, del 98%, del 99% e quasi del 100%. In modo simile, "identità di sequenza percentuale dell'acido nucleico (%)" in relazione alla sequenza dell'acido nucleico delle proteine di legame identificate qui viene definita come la percentuale dei residui nucleotidici in una sequenza candidata che sono identici ai residui nucleotidici nella sequenza codificante della proteina legante l'antigene. Un metodo specifico utilizza il modulo BLASTN di WU-BLAST-2 impostato ai parametri preimpostati, con estensione della sovrapposizione e frazione della sovrapposizione impostate a 1 e 0,125, rispettivamente e nessun filtro scelto.

In generale, l'identità della sequenza dell'acido nucleico tra le sequenze nucleotidiche codificanti singole CDR varianti e le sequenze nucleotidiche qui descritte è almeno dell'80%, e più tipicamente con

identità preferibilmente crescenti almeno dell'80%, dell'81%, dell'82%, dell'83%, dell'84%, dell'85%, dell'86%, dell'87%, dell'88%, dell'89%, del 90%, del 91%, del 92%, del 93%, del 94%, del 95%, del 96%, del 97%, del 98%, o del 99% e quasi del 100%.

Così, una "CDR variante" è una con l'omologia, la somiglianza o l'identità specificate alla CDR progenitrice dell'invenzione, e condivide la funzione biologica, compresi, ma senza limitazione, almeno l'80%, l'81%, l'82%, l'83%, l'84%, l'85%, l'86%, l'87%, l'88%, l'89%, il 90%, il 91%, il 92%, il 93%, il 94%, il 95%, il 96%, il 97%, il 98%, o il 99% della specificità e/o dell'attività della CDR progenitrice.

Anche se il sito o la regione per introdurre una variazione della sequenza amminoacidica sono predeterminati, la mutazione come tale non necessita di essere predeterminata. Per esempio, allo scopo di ottimizzare la prestazione di una mutazione ad un dato sito, la mutagenesi casuale può essere condotta al codone o alla regione bersaglio e le varianti delle CDR delle proteine leganti l'antigene espresse possono essere esaminate per la combinazione ottimale dell'attività desiderata. Le tecniche per effettuare mutazioni di sostituzione in siti predeterminati nel DNA avente una sequenza nota sono ben note, per esempio, mutagenesi con innesco M13 e mutagenesi tramite PCR. Lo screening dei mutanti viene effettuato utilizzando saggi di attività di proteine leganti l'antigene come qui descritto.

Le sostituzioni amminoacidiche sono tipicamente di singoli residui; le inserzioni solitamente saranno dell'ordine da circa uno (1) a circa venti (20) residui amminoacidici, sebbene possano essere tollerate inserzioni

considerevolmente più grandi. Le delezioni variano da circa uno (1) a circa venti (20) residui amminoacidici, sebbene in alcuni casi le delezioni possano essere molto superiori.

Sostituzioni, delezioni, inserzioni o qualsiasi loro combinazione possono essere utilizzate per arrivare ad un derivato o ad una variante finali. Generalmente queste variazioni vengono effettuate su alcuni amminoacidi per minimizzare l'alterazione della molecola, in particolare l'immunogenicità e la specificità della proteina legante l'antigene. Tuttavia, variazioni più grandi possono essere tollerate in certe circostanze.

Con "Fab" o "regione Fab" come utilizzati qui si intende il polipeptide che comprende i domini immunoglobulinici V_H , C_{H1} , V_L , e C_L . Fab può riferirsi a questa regione in isolamento, o a questa regione nel contesto di un anticorpo a lunghezza intera, di un frammento anticorpale o di una proteina di fusione con Fab, o qualsiasi altra forma di realizzazione di anticorpo come qui descritto.

Con "Fv" o "frammento Fv" o "regione Fv" come utilizzati qui si intende un polipeptide che comprende i domini V_L e V_H di un singolo anticorpo.

Con "cornice" come utilizzato qui si intende la regione di un dominio variabile anticorpale esclusivo di quelle regioni definite come CDR. Ciascuna cornice del dominio variabile anticorpale può essere ulteriormente suddivisa nelle regioni contigue separate dalle CDR (FR1, FR2, FR3 ed FR4).

Il termine "porzione legante l'antigene" di un anticorpo (o semplicemente "porzione anticorpale"), come utilizzato qui, si riferisce ad

uno o più frammenti di un anticorpo che mantengono la capacità di legarsi specificamente ad un antigene (per esempio BST1). È stato mostrato che la funzione di legame all'antigene di un anticorpo può essere svolta da frammenti di un anticorpo a lunghezza intera. Esempi di frammenti leganti compresi all'interno del termine "porzione legante l'antigene" di un anticorpo includono (i) un frammento Fab, un frammento monovalente consistente dei domini V_L/V_K , V_H , C_L e C_{H1} ; (ii) un frammento $F(ab')_2$, un frammento bivalente comprendente due frammenti Fab collegati da un ponte disolfuro a livello della regione cerniera; (iii) un frammento Fab', che è essenzialmente un Fab con parte della regione cerniera (si veda, FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY (a cura di Paul, terza edizione 1993); (iv) un frammento Fd consistente dei domini V_H e C_{H1} ; (v) un frammento Fv consistente dei domini V_L e V_H di un singolo braccio di un anticorpo; (vi) un frammento dAb [Ward *et al.* (1989) *Nature* 341:544-546], che consiste di un dominio V_H ; (vii) una regione determinante la complementarità (CDR) isolata; e (viii) un nanobody, una regione variabile della catena pesante contenente un dominio variabile singolo e due domini costanti. Inoltre, sebbene i due domini del frammento Fv, V_L/V_K e V_H , siano codificati da geni distinti, essi possono essere uniti, utilizzando metodi ricombinanti, da un gruppo di collegamento sintetico che permette loro di essere prodotti come catena proteica singola in cui le regioni V_L/V_K e V_H si appaiano per formare molecole monovalenti (noto come Fv a catena singola (scFv); si vedano per esempio Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; e Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883. Tali anticorpi a catena singola sono anche intesi essere compresi all'interno del termine

“porzione legante l’antigene” di un anticorpo. Questi frammenti anticorpali vengono ottenuti utilizzando tecniche convenzionali note a coloro che sono esperti nell’arte, ed i frammenti vengono esaminati per l’utilità nello stesso modo degli anticorpi intatti.

Un “anticorpo isolato” come utilizzato qui è inteso riferirsi ad un anticorpo che è sostanzialmente privo di altri anticorpi aventi specificità antigenica differente (per esempio un anticorpo isolato che si lega specificamente al BST1 è sostanzialmente privo di anticorpi che si legano specificamente ad antigeni diversi dal BST1). Un anticorpo isolato che si lega specificamente al BST1 può, tuttavia, avere reattività incrociata per altri antigeni, quali molecole BST1 da altre specie. Inoltre, e/o in alternativa, un anticorpo isolato può essere sostanzialmente privo di altro materiale cellulare e/o sostanze chimiche, che è in una forma non normalmente ritrovata in natura.

In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi dell’invenzione sono proteine ricombinanti, proteine isolate o proteine sostanzialmente pure. Una proteina “isolata” è non accompagnata da almeno una parte del materiale con cui è normalmente associata nel suo stato naturale, per esempio costituente almeno circa il 5%, o almeno circa il 50% in peso del contenuto proteico totale in un dato campione. Si intende che la proteina isolata possa costituire dal 5% al 99,9% in peso del contenuto proteico totale in relazione alle circostanze. Per esempio, la proteina può essere preparata ad una concentrazione significativamente maggiore attraverso l’uso di un promotore inducibile o di un promotore ad espressione elevata, in modo tale che la proteina venga prodotta a livelli di concentrazione

aumentati. Nel caso di proteine ricombinanti, la definizione comprende la produzione di un anticorpo in un'ampia varietà di organismi e/o cellule ospiti che sono noti nell'arte in cui non è naturalmente prodotto.

I termini "anticorpo monoclonale" o "composizione di anticorpo monoclonale" come utilizzati qui si riferiscono ad una preparazione di molecole anticorpali di una singola composizione molecolare. Una composizione di anticorpo monoclonale mostra una singola specificità ed affinità di legame per un epitopo particolare. Come utilizzato qui, un "anticorpo policlonale" si riferisce ad anticorpi prodotti da diversi cloni di linfociti B come sarebbe il caso in un animale intero.

Come utilizzato qui, "isotipo" si riferisce alla classe anticorpale (per esempio IgM o IgG1) che viene codificata dai geni della regione costante della catena pesante.

Le frasi "un anticorpo che riconosce un antigene" e "un anticorpo specifico per un antigene" vengono qui utilizzate in modo intercambiabile con il termine "un anticorpo che si lega specificamente ad un antigene".

Il termine "derivati anticorpali" si riferisce a qualsiasi forma modificata dell'anticorpo, per esempio un coniugato (in generale un legame chimico) dell'anticorpo ed un altro agente o anticorpo. Per esempio, gli anticorpi della presente invenzione possono essere coniugati ad agenti, compresi, ma senza limitazione, polimeri (per esempio PEG) tossine, marcatori, ecc. come viene descritto in modo più completo sotto. Gli anticorpi della presente invenzione possono essere non umani, chimerici, umanizzati, o completamente umani. Per una descrizione dei concetti di anticorpi chimerici ed umanizzati, si vedano Clark *et al.* (2000)

ed i riferimenti ivi citati (Clark, 2000, *Immunol. Today* 21:397-402). Gli anticorpi chimerici comprendono la regione variabile di un anticorpo non umano, per esempio domini V_H e V_L di origine da topo o da ratto, legati operabilmente alla regione costante di un anticorpo umano (si veda, per esempio, il brevetto US 4,816,567). In una forma di realizzazione preferita, gli anticorpi della presente invenzione sono umanizzati. Con anticorpo "umanizzato" come qui utilizzato si intende un anticorpo comprendente una regione cornice umana (FR) ed una o più regioni determinanti la complementarità (CDR) da un anticorpo non umano (solitamente di topo o di ratto). L'anticorpo non umano che fornisce le CDR viene chiamato "donatore" e l'immunoglobulina umana che fornisce la cornice viene chiamata "accettore". L'umanizzazione risiede principalmente nell'innesto delle CDR del donatore sulle regioni cornice di V_L e V_H dell'accettore (umano) (brevetto US 5,225,539). Questa strategia viene indicata come "innesto di CDR". La "retromutazione" di residui scelti della regione cornice dell'accettore nei residui del donatore corrispondenti è spesso richiesta per riacquistare l'affinità che è persa nel costrutto innestato iniziale (US 5,530,101, US 5,585,089, US 5,693,761, US 5,693,762, US 6,180,370, US 5,859,205, US 5,821,337, US 6,054,297, US 6,407,213). L'anticorpo umanizzato comprenderà in modo ottimale anche almeno una porzione di una regione costante dell'immunoglobulina, tipicamente quella di un'immunoglobulina umana, e così comprenderà tipicamente una regione Fc umana. Metodi per umanizzare anticorpi non umani sono ben noti nell'arte, e possono essere essenzialmente eseguiti secondo il metodo di Winter e collaboratori [Jones *et al.* (1986) *Nature* 321:522-525;

Riechmann *et al.* (1988) *Nature* 332:323-329; Verhoeyen *et al.* (1988) *Science*, 239:1534-1536]. Ulteriori esempi di anticorpi monoclonali murini umanizzati sono noti anche nell'arte, per esempio anticorpi leganti la proteina umana C (O'Connor *et al.*, 1998, *Protein Eng* 11:321-8), il recettore dell'interleuchina 2 [Queen *et al.* (1989) *Proc Natl Acad Sci, USA* 86:10029-33] ed il recettore del fattore di crescita epidermico umano 2 [Carter *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285-9]. In una forma di realizzazione alternativa, gli anticorpi della presente invenzione possono essere completamente umani, cioè le sequenze degli anticorpi sono completamente o sostanzialmente umane. Sono noti nell'arte diversi metodi per generare anticorpi completamente umani, compreso l'uso di topi transgenici [Bruggemann *et al.* (1997) *Curr Opin Biotechnol.* 8:455-458] o di librerie anticorpali umane accoppiate a metodi di selezione [Griffiths *et al.* (1998) *Curr Opin Biotechnol.* 9:102-108].

Il termine "anticorpo umanizzato" intende includere anticorpi in cui sequenze delle CDR derivate dalla linea germinale di un'altra specie di mammifero, quale un topo, sono state innestate su sequenze cornice umane. Ulteriori modifiche della regione cornice possono essere apportate all'interno delle sequenze cornice umane, quali modifiche amminoacidiche del dominio Fc, come viene descritto qui.

Il termine "anticorpo chimerico" è inteso riferirsi ad anticorpi in cui le sequenze di regioni variabili sono derivate da una specie e le sequenze della regione costante sono derivate da un'altra specie, quale un anticorpo in cui le sequenze delle regioni variabili sono derivate da un anticorpo di

topo e le sequenze della regione costante sono derivate da un anticorpo umano.

Il termine “si lega specificamente” (o “si lega immunospecificamente”) non è inteso indicare che un anticorpo si lega esclusivamente al suo bersaglio designato, sebbene in molte forme di realizzazione questo sarà vero; cioè, un anticorpo “si lega specificamente” al suo bersaglio e si lega non in modo rilevabile o sostanziale ad altri componenti nel campione, nella cellula o nel paziente. Tuttavia, in alcune forme di realizzazione, un anticorpo “si lega specificamente” se la sua affinità per il suo bersaglio designato è circa 5 volte maggiore rispetto alla sua affinità per una molecola non bersaglio. Opportunamente non vi sono significativi reazioni incrociata o legame incrociato con sostanze indesiderate, specialmente proteine o tessuti presenti in natura di una persona o un animale sani. L'affinità dell'anticorpo sarà, per esempio, almeno circa 5 volte, quale 10 volte, quale 25 volte, specialmente 50 volte, ed in particolare 100 volte o più, maggiore per una molecola bersaglio rispetto alla sua affinità per una molecola non bersaglio. In alcune forme di realizzazione, il legame specifico tra un anticorpo o un altro agente legante ed un antigene significa un'affinità di legame di almeno 10^6 M^{-1} . Gli anticorpi possono, per esempio, legarsi con affinità di circa almeno 10^7 M^{-1} , come tra circa 10^8 M^{-1} e circa 10^9 M^{-1} , da circa 10^9 M^{-1} a circa 10^{10} M^{-1} , o da circa 10^{10} M^{-1} a circa 10^{11} M^{-1} . Gli anticorpi possono, per esempio, legarsi con un' EC_{50} di 50 nM o inferiore, 10 nM o inferiore, 1 nM o inferiore, 100 pM o inferiore, o più preferibilmente 10 pM o inferiore.

Il termine “sostanzialmente non si lega” ad una proteina o a cellule, come qui utilizzato, significa non si lega o non si lega con un’affinità elevata alla proteina o alle cellule, cioè si lega alla proteina o alle cellule con una K_D di 1×10^{-6} M o superiore, più preferibilmente 1×10^{-5} M o superiore, più preferibilmente 1×10^{-4} M o superiore, più preferibilmente 1×10^{-3} M o superiore, ancora più preferibilmente 1×10^{-2} M o superiore.

Il termine “ EC_{50} ” come utilizzato qui, è inteso riferirsi alla potenza di un composto quantificando la concentrazione che porta al 50% di risposta/effetto massimali. L’ EC_{50} può essere determinata mediante Scratchard o FACS.

Il termine “ K_{assoc} ” o “ K_a ”, come utilizzato qui, è inteso riferirsi alla velocità di associazione di una particolare interazione anticorpo-antigene, mentre il termine “ K_{dis} ” o “ K_d ”, come utilizzato qui, è inteso riferirsi alla velocità di dissociazione di una particolare interazione anticorpo-antigene. Il termine “ K_D ”, come utilizzato qui, è inteso riferirsi alla costante di affinità, che viene ottenuta dal rapporto di K_d rispetto a K_a (cioè K_d/K_a) e viene espressa come concentrazione molare (M). Valori di K_D per gli anticorpi possono essere determinati utilizzando metodi ben stabiliti nell’arte. Un metodo preferito per determinare la K_D di un anticorpo consiste nell’utilizzare la risonanza plasmonica di superficie, utilizzando preferibilmente un sistema di biosensori quale il sistema Biacore®.

Come utilizzato qui, il termine “affinità elevata” per un anticorpo IgG si riferisce ad un anticorpo avente una K_D di 1×10^{-7} M o inferiore, più preferibilmente 5×10^{-8} M o inferiore, ancora più preferibilmente 1×10^{-8} M o

inferiore, ancora più preferibilmente 5×10^{-9} M o inferiore ed ancora più preferibilmente 1×10^{-9} M o inferiore per un antigene bersaglio. Tuttavia, legame ad “affinità elevata” può variare per altri isotipi anticorpali. Per esempio, legame ad “affinità elevata” per un isotipo IgM si riferisce ad un anticorpo avente una K_D di 10^{-6} M o inferiore, più preferibilmente 10^{-7} M o inferiore, ancora più preferibilmente 10^{-8} M o inferiore.

Il termine “epitopo” o “determinante antigenico” si riferisce ad un sito su un antigene a cui un’immunoglobulina o un anticorpo si lega specificamente. Gli epitopi possono essere formati sia da amminoacidi contigui che da amminoacidi non contigui giustapposti mediante ripiegamento terziario di una proteina. Epitopi formati da amminoacidi contigui vengono tipicamente conservati durante l’esposizione a solventi denaturanti, mentre epitopi formati mediante ripiegamento terziario vengono tipicamente persi a seguito di trattamento con solventi denaturanti. Un epitopo comprende tipicamente almeno 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 amminoacidi in un’unica conformazione spaziale. Metodi per determinare la conformazione spaziale degli epitopi includono tecniche nell’arte e quelle qui descritte, per esempio, cristallografia a raggi X e risonanza magnetica nucleare bidimensionale [si veda, per esempio Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, a cura di G. E. Morris (1996)].

Conseguentemente, vengono qui descritti anche anticorpi che si legano a (cioè riconoscono) lo stesso epitopo degli anticorpi qui descritti (cioè BST1_A2, BST1_A1 e BST1_A3). Gli anticorpi che si legano allo stesso epitopo possono essere identificati mediante la loro capacità di

competere in modo incrociato con (cioè inibire in modo competitivo il legame di) un anticorpo di riferimento ad un antigene bersaglio in un modo statisticamente significativo. L'inibizione competitiva può avvenire, per esempio, se gli anticorpi si legano a epitopi identici o strutturalmente simili (per esempio epitopi sovrapposti), o epitopi spazialmente prossimali che, quando legati, causano ingombro sterico tra gli anticorpi.

L'inibizione competitiva può essere determinata utilizzando saggi di routine in cui l'immunoglobulina in esame inibisce il legame specifico di un anticorpo di riferimento ad un antigene comune. Sono noti numerosi tipi di saggi di legame competitivo, per esempio: dosaggio radioimmunologico diretto o indiretto su fase solida (RIA), dosaggio immunoenzimatico diretto o indiretto su fase solida (EIA), saggio di competizione a sandwich [si veda Stahl *et al.* (1983) *Methods in Enzymology* 9:242]; EIA diretto con biotina-avidina su fase solida [si veda Kirkland *et al.* (1986) *J. Immunol.* 137:3614]; saggio marcato diretto su fase solida, dosaggio a sandwich diretto marcato su fase solida [si veda Harlow e Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press]; RIA diretto con marcatore su fase solida utilizzando il marcatore I-125 [si veda Morel *et al.* (1988) *Mol. Immunol.* 25(1):7]; EIA diretto con biotina-avidina su fase solida [Cheung *et al.* (1990) *Virology* 176:546]; e RIA marcato diretto. [Moldenhauer *et al.* (1990) *Scand. J. Immunol.* 32:77]. Tipicamente, un tale saggio implica l'uso di antigene purificato legato ad una superficie solida o a cellule recanti ciascuno di questi, di un'immunoglobulina in esame non marcata e di un'immunoglobulina di riferimento marcata. L'inibizione competitiva viene misurata determinando la quantità di

marcatore legato sulla superficie solida o a cellule in presenza dell'immunoglobulina in esame. Di solito l'immunoglobulina in esame è presente in eccesso. Di solito, quando un anticorpo che compete è presente in eccesso, esso inibirà il legame specifico di un anticorpo di riferimento ad un antigene comune almeno del 50%-55%, 55%-60%, 60%-65%, 65%-70% 70%-75% o maggiore.

Altre tecniche includono, per esempio, metodi di mappatura degli epitopi, quali analisi a raggi X di cristalli dei complessi antigene:anticorpo che fornisce risoluzione atomica dell'epitopo. Altri metodi monitorano il legame dell'anticorpo a frammenti antigenici o a variazioni mutate dell'antigene dove la perdita di legame dovuta ad una modifica di un residuo amminoacidico all'interno della sequenza dell'antigene è spesso considerata un'indicazione di un componente dell'epitopo. Inoltre, per la mappatura degli epitopi si possono anche utilizzare metodi computazionali combinatoriali. Questi metodi si basano sulla capacità dell'anticorpo d'interesse di isolare per affinità brevi peptidi specifici da librerie peptidiche combinatoriali ad esposizione fagica. I peptidi sono quindi considerati come guide per la definizione dell'epitopo corrispondente all'anticorpo utilizzato per valutare la libreria peptidica. Per la mappatura degli epitopi, sono anche stati sviluppati algoritmi computazionali che sono stati mostrati mappare epitopi discontinui conformazionali.

Come utilizzato qui, il termine "soggetto" comprende qualsiasi animale umano o diverso dall'uomo. Il termine "animale diverso dall'uomo" comprende tutti i vertebrati, per esempio mammiferi e non mammiferi,

quali primati diversi dall'uomo, pecore, cani, gatti, cavalli, mucche, polli, anfibi, rettili, ecc.

La descrizione viene descritta in ulteriore dettaglio nelle seguenti sottosezioni.

Anticorpi anti-BST1

Gli anticorpi dell'invenzione sono caratterizzati da caratteristiche o proprietà funzionali particolari degli anticorpi. Per esempio, gli anticorpi si legano specificamente al BST1 umano. Preferibilmente, un anticorpo dell'invenzione si lega al BST1 con affinità elevata, per esempio, con una K_D di 8×10^{-7} M o inferiore, ancora più tipicamente 1×10^{-8} M o inferiore. Gli anticorpi anti-BST1 dell'invenzione mostrano preferibilmente una o più delle seguenti caratteristiche, gli anticorpi esibenti entrambe trovando uso particolare:

si legano al BST1 umano con una EC_{50} di 50 nM o inferiore, 10 nM o inferiore, 1 nM o inferiore, 100 pM o inferiore, o più preferibilmente 10 pM o inferiore;

si legano a cellule umane esprimenti il BST1.

In una forma di realizzazione, gli anticorpi preferibilmente si legano ad un epitopo antigenico presente nel BST1, il quale epitopo non è presente in altre proteine. Preferibilmente, gli anticorpi non si legano a proteine correlate, per esempio, gli anticorpi sostanzialmente non si legano ad altre molecole di adesione cellulare. In una forma di realizzazione, l'anticorpo può essere internalizzato in una cellula esprime il BST1. Saggi standard per valutare l'internalizzazione

dell'anticorpo sono noti nell'arte, compresi, per esempio, saggi di internalizzazione MabZap o HumZap.

Saggi standard per valutare la capacità di legame degli anticorpi verso il BST1 possono essere effettuati sulla proteina o a livello cellulare e sono noti nell'arte, compresi per esempio, saggi ELISA, Western blot, RIA, BIAcore® ed analisi di citometria a flusso. Saggi adatti vengono descritti in dettaglio negli Esempi. La cinetica del legame (per esempio l'affinità di legame) degli anticorpi può anche essere valutata mediante saggi standard noti nell'arte, come mediante l'analisi con sistema Biacore®. Per valutare il legame a cellule tumorali dei linfociti B Raji o Daudi, cellule Raji (numero di deposito dell'ATCC CCL-86) o Daudi (numero di deposito dell'ATCC CCL-213) possono essere ottenute da fonti pubblicamente disponibili, quali l'American Type Culture Collection, ed utilizzate in saggi convenzionali, quali l'analisi di citometria a flusso.

Anticorpi monoclonali dell'invenzione

L'anticorpo dell'invenzione è l'anticorpo monoclonale BST1_A2. Viene inoltre descritto l'anticorpo BST1_A1 isolato e strutturalmente caratterizzato come descritto negli Esempi 1-4. Le sequenze amminoacidiche di V_H di BST1_A2, BST1_A1 e BST1_A3 vengono mostrate nelle SEQ ID NO:2, 1 e 52, rispettivamente. Le sequenze amminoacidiche di V_K di BST1_A2, BST1_A1 e BST1_A3 vengono mostrate nelle SEQ ID NO: 4, 3 e 53, rispettivamente.

Dato che ciascuno di questi anticorpi può legarsi al BST1, le sequenze di V_H e V_K possono essere "miscelate ed accoppiate" per creare altre molecole leganti anti-BST1. Il legame a BST1 di tali anticorpi

“miscelati ed accoppiati” può essere testato utilizzando i saggi di legame descritti sopra e negli Esempi (per esempio saggi ELISA). Preferibilmente, quando le catene V_H e V_K vengono miscelate e accoppiate, una sequenza V_H da un particolare accoppiamento V_H/V_K è sostituita con una sequenza V_H strutturalmente simile. In modo simile, preferibilmente una sequenza V_K da un particolare accoppiamento V_H/V_K è sostituita con una sequenza V_K strutturalmente simile.

Conseguentemente, in un aspetto, l'invenzione fornisce un anticorpo, comprendente:

una regione variabile della catena pesante comprendente una sequenza amminoacidica esposta in una SEQ ID NO:2, ed una regione variabile della catena leggera comprendente una sequenza amminoacidica esposta in una SEQ ID NO: 4; in cui l'anticorpo si lega specificamente al BST1, preferibilmente il BST1 umano.

Altre combinazioni di catene pesanti e leggere qui descritte includono:

una regione variabile della catena pesante comprendente la sequenza amminoacidica della SEQ ID NO:1 ed una regione variabile della catena leggera comprendente la sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 3; o

una regione variabile della catena pesante comprendente la sequenza amminoacidica della SEQ ID NO:52 ed una regione variabile della catena leggera comprendente la sequenza amminoacidica della SEQ ID NO:53.

In un altro aspetto, l'invenzione fornisce anticorpi che comprendono le CDR1, le CDR2 e le CDR3 delle catene pesanti e leggere di BST1_A2. Sono inoltre descritti anticorpi che comprendono le CDR1, le CDR2 e le CDR3 delle catene pesanti e leggere di BST1_A1 e BST1_A3, o loro combinazioni. Le sequenze amminoacidiche delle CDR1 di V_H di BST1_A2, BST1_A1 e BST1_A3 vengono mostrate nelle SEQ ID NO: 10, 9 e 56, rispettivamente. Le sequenze amminoacidiche delle CDR2 di V_H di BST1_A2, BST1_A1 e BST1_A3 vengono mostrate nelle SEQ ID NO:12 o 51, 11 e 57, rispettivamente. Le sequenze amminoacidiche delle CDR3 di V_H di BST1_A2, BST1_A1 e BST1_A3 vengono mostrate nelle SEQ ID NO:14, 13 e 58, rispettivamente. Le sequenze amminoacidiche delle CDR1 di V_K di BST1_A2, BST1_A1 e BST1_A3 vengono mostrate nella SEQ ID NO:16, 15 e 59, rispettivamente. Le sequenze amminoacidiche delle CDR2 di V_K di BST1_A2, BST1_A1 e BST1_A3 vengono mostrate nelle SEQ ID NO:18, 17 e 60, rispettivamente. Le sequenze amminoacidiche delle CDR3 di V_K di BST1_A2, BST1_A1 e BST1_A3 vengono mostrate nelle SEQ ID NO: 20, 19 e 61, rispettivamente. Le regioni CDR sono delineate utilizzando il sistema di Kabat [Kabat, E. A. *et al.* (1991) Sequence of proteins of immunological interest, quinta edizione, Dipartimento della Salute e dei Servizi Umani degli Stati Uniti, pubblicazione NIH No. 91-3242].

Dato che ciascuno di questi anticorpi può legarsi al BST1 e che la specificità di legame all'antigene viene fornita principalmente dalle regioni CDR1, CDR2 e CDR3, le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di V_H e le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di V_K possono essere "miscelate e

accoppiate" (cioè le CDR da anticorpi differenti possono essere miscelate e accoppiate, sebbene ciascun anticorpo contenga in generale una CDR1, CDR2 e CDR3 di V_H ed una CDR1, CDR2 e CDR3 di V_K) per creare altre molecole leganti anti-BST1.

Il legame a BST1 di tali anticorpi "miscelati ed accoppiati" può essere testato utilizzando i saggi di legame descritti sopra e negli Esempi (per esempio saggi ELISA, analisi Biacore®). Preferibilmente, quando sequenze delle CDR di V_H vengono miscelate e accoppiate, la sequenza delle CDR1, CDR2 e/o CDR3 da una particolare sequenza di V_H è sostituita con una sequenza/e delle CDR strutturalmente simile/i. In modo simile, quando sequenze delle CDR di V_K vengono miscelate e accoppiate, la sequenza delle CDR1, CDR2 e/o CDR3 da una particolare sequenza di V_K è preferibilmente sostituita con una sequenza/e delle CDR strutturalmente simile/i. Sarà facilmente evidente al tecnico di esperienza ordinaria che nuove sequenze di V_H e V_K possono essere generate sostituendo una o più sequenze delle regioni CDR di V_H e/o V_L / V_K con sequenze strutturalmente simili dalle sequenze delle CDR qui descritte per gli anticorpi monoclonali BST1_A2, BST1_A1 e BST1_A3.

Conseguentemente, viene qui descritto un anticorpo monoclonale isolato, o una sua porzione legante l'antigene comprendente:

una CDR1 della regione variabile della catena pesante comprendente una sequenza amminoacidica scelta nel gruppo composto dalle SEQ ID NO: 10, 9 e 56;

una CDR2 della regione variabile della catena pesante comprendente una sequenza amminoacidica scelta nel gruppo composto dalle SEQ ID NO:12 o 51, 11 e 57;

una CDR3 della regione variabile della catena pesante comprendente una sequenza amminoacidica scelta nel gruppo composto dalle SEQ ID NO:14, 13 e 58;

una CDR1 della regione variabile della catena leggera comprendente una sequenza amminoacidica scelta nel gruppo composto dalle SEQ ID NO:16, 15 e 59;

una CDR2 della regione variabile della catena leggera comprendente una sequenza amminoacidica scelta nel gruppo composto dalle SEQ ID NO:18, 17 e 60; e

una CDR3 della regione variabile della catena leggera comprendente una sequenza amminoacidica scelta nel gruppo composto dalle SEQ ID NO: 20, 19 e 61;

essendo possibili tutte le combinazioni possibili, in cui l'anticorpo si lega specificamente al BST1, preferibilmente al BST1 umano.

In una forma di realizzazione preferita, l'anticorpo possiede:

una CDR1 della regione variabile della catena pesante comprendente la SEQ ID NO: 10;

una CDR2 della regione variabile della catena pesante comprendente la SEQ ID NO:12 o la SEQ ID NO:51;

una CDR3 della regione variabile della catena pesante comprendente la SEQ ID NO:14; e

una CDR1 della regione variabile della catena leggera
comprendente la SEQ ID NO:16;

una CDR2 della regione variabile della catena leggera
comprendente la SEQ ID NO:18;

una CDR3 della regione variabile della catena leggera
comprendente la SEQ ID NO: 20.

In un altro esempio, l'anticorpo possiede:

una CDR1 della regione variabile della catena pesante
comprendente la SEQ ID NO: 9;

una CDR2 della regione variabile della catena pesante
comprendente la SEQ ID NO:11;

una CDR3 della regione variabile della catena pesante
comprendente la SEQ ID NO:13; e

una CDR1 della regione variabile della catena leggera
comprendente la SEQ ID NO:15;

una CDR2 della regione variabile della catena leggera
comprendente la SEQ ID NO:17;

una CDR3 della regione variabile della catena leggera
comprendente la SEQ ID NO:19.

In un altro esempio, l'anticorpo possiede:

una CDR1 della regione variabile della catena pesante
comprendente la SEQ ID NO:56;

una CDR2 della regione variabile della catena pesante
comprendente la SEQ ID NO:57;

una CDR3 della regione variabile della catena pesante comprendente la SEQ ID NO:58; e

una CDR1 della regione variabile della catena leggera comprendente la SEQ ID NO:59;

una CDR2 della regione variabile della catena leggera comprendente la SEQ ID NO: 60;

una CDR3 della regione variabile della catena leggera comprendente la SEQ ID NO: 61.

È ben noto nell'arte che il dominio CDR3, indipendentemente dall/i dominio/i CDR1 e/o CDR2, da solo può determinare la specificità di legame di un anticorpo per un antigene affine e che possono prevedibilmente essere generati anticorpi multipli aventi la stessa specificità di legame basata su una sequenza CDR3 comune. Si vedano, per esempio, Klimka *et al.* (2000) *British J. of Cancer* 83(2):252-260 (che descrive la produzione di un anticorpo umanizzato anti-CD30 utilizzando solo la CDR3 del dominio variabile della catena pesante dell'anticorpo murino anti-CD30 Ki-4); Beiboer *et al.* (2000) *J. Mol. Biol.* 296:833-849 (che descrive anticorpi ricombinanti per la glicoproteina-2 epiteliale (EGP-2) utilizzando solo la sequenza CDR3 della catena pesante dell'anticorpo anti-EGP-2 murino progenitore MOC-31); Rader *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:8910-8915 (che descrive un pannello di anticorpi umanizzati anti-integrina $\alpha_v\beta_3$ utilizzando un dominio CDR3 della catena pesante e leggera variabile di un anticorpo murino anti-integrina $\alpha_v\beta_3$ LM609 in cui ciascun membro anticorpo comprende una sequenza distinta all'esterno del dominio CDR3 ed in grado di legarsi allo stesso epitopo

dell'anticorpo murino progenitore con affinità uguali o superiori all'anticorpo murino progenitore); Barbas *et al.* (1994) *J. Am. Chem. Soc.* 116:2161-2162 (che descrive che il dominio CDR3 fornisce il contributo più significativo al legame all'antigene); Barbas *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:2529-2533 (che descrive l'innesto delle sequenze CDR3 della catena pesante di tre Fab (SI-1, SI-40, e SI-32) nei confronti del DNA placentare umano sulla catena pesante di un Fab anti-tossoide del tetano sostituendo quindi le CDR3 della catena pesante esistenti e dimostrando che il dominio CDR3 da solo ha conferito specificità di legame); e Ditzel *et al.* (1996) *J. Immunol.* 157:739-749 (che descrive studi di innesto in cui il trasferimento della sola CDR3 della catena pesante di un Fab progenitore polispecifico LNA3 ad una catena pesante di un anticorpo Fab IgG monospecifico legante il tosside tetanico p313 è stato sufficiente per mantenere la specificità di legame del Fab progenitore).

Conseguentemente, la presente descrizione fornisce anticorpi monoclonali comprendenti uno o più domini CDR3 delle catene pesante e/o leggera da un anticorpo derivato da un essere umano o da un animale diverso dall'uomo, in cui l'anticorpo monoclonale è in grado di legarsi specificamente al BST1. All'interno di certi esempi, la presente descrizione fornisce anticorpi monoclonali comprendenti uno o più domini CDR3 della catena pesante e/o leggera da un anticorpo non umano, quale un anticorpo di topo o di ratto, in cui l'anticorpo monoclonale è in grado di legarsi specificamente al BST1. All'interno di alcuni esempi, tali anticorpi dell'invenzione comprendenti uno o più domini CDR3 della catena pesante

e/o leggera da un anticorpo non umano (a) sono in grado di competere per il legame con; (b) mantengono le caratteristiche funzionali di; (c) si legano allo stesso epitopo di; e/o (d) hanno un'affinità di legame simile all'anticorpo progenitore non umano corrispondente.

All'interno di altri esempi, la presente descrizione fornisce anticorpi monoclonali comprendenti uno o più domini CDR3 delle catene pesante e/o leggera da un anticorpo umano quale, per esempio, un anticorpo umano ottenuto da un animale diverso dall'uomo, in cui l'anticorpo umano è in grado di legarsi specificamente al BST1. All'interno di altri esempi, la presente descrizione fornisce anticorpi monoclonali comprendenti uno o più domini CDR3 della catena pesante e/o leggera da un primo anticorpo umano quale, per esempio, un anticorpo umano ottenuto da un animale diverso dall'uomo, in cui il primo anticorpo umano è in grado di legarsi specificamente al BST1 ed in cui il dominio CDR3 dal primo anticorpo umano sostituisce un dominio CDR3 in un anticorpo umano che è mancante di specificità di legame per il BST1 per generare un secondo anticorpo umano che è in grado di legarsi specificamente al BST1. All'interno di alcuni esempi, tali anticorpi dell'invenzione comprendenti uno o più domini CDR3 della catena pesante e/o leggera dal primo anticorpo umano (a) sono in grado di competere per il legame con; (b) mantengono le caratteristiche funzionali di; (c) si legano allo stesso epitopo di; e/o (d) hanno un'affinità di legame simile al primo anticorpo umano progenitore corrispondente.

Anticorpi aventi sequenze della linea germinale particolari

In alcune forme di realizzazione, un anticorpo dell'invenzione comprende una regione variabile della catena pesante da un particolare gene immunoglobulinico della catena pesante della linea germinale e/o una regione variabile della catena leggera da un particolare gene immunoglobulinico della catena leggera della linea germinale.

Per esempio, in una forma di realizzazione preferita, l'invenzione fornisce un anticorpo monoclonale isolato, o una sua porzione legante l'antigene, comprendenti una regione variabile della catena pesante che è il prodotto di o è derivata da un gene V_H 1-39 murino, un gene V_H 1-80 murino o un gene V_H 69-1 murino, in cui l'anticorpo si lega specificamente al BST1. In ancora un'altra forma di realizzazione preferita, l'invenzione fornisce un anticorpo monoclonale isolato, o una sua porzione legante l'antigene, comprendente una regione variabile della catena leggera che è il prodotto di o è derivata da un gene murino V_K 4-55, un gene murino V_K 4-74 o un gene murino V_K 44-1, in cui l'anticorpo si lega specificamente al BST1.

In ancora un'altra forma di realizzazione preferita, l'invenzione fornisce un anticorpo monoclonale isolato, o una sua porzione legante l'antigene, in cui l'anticorpo:

comprende una regione variabile della catena pesante che è il prodotto di o è derivata da un gene V_H 1-39 murino (il quale gene comprende la sequenza nucleotidica esposta nelle SEQ ID NO: 35 e 36); comprende una regione variabile della catena leggera che è il prodotto di o è derivata da un gene V_K 4-55 murino (il quale gene comprende le sequenze nucleotidiche esposte nelle SEQ ID NO: 40, 41 e 42); e si lega

specificamente al BST1, preferibilmente il BST1 umano. Esempi di anticorpi aventi geni V_H 1-39 e V_K 4-55, con le sequenze descritte sopra, sono BST1_A2.

In ancora un'altra forma di realizzazione preferita, l'invenzione fornisce un anticorpo monoclonale isolato, o una sua porzione legante l'antigene, in cui l'anticorpo:

comprende una regione variabile della catena pesante che è il prodotto di o è derivata da un gene V_H 1-80 murino (il quale gene comprende la sequenza nucleotidica esposta nelle SEQ ID NO: 33 e 34); comprende una regione variabile della catena leggera che è il prodotto di o è derivata da un gene V_K 4-74 murino (il quale gene comprende le sequenze nucleotidiche esposte nelle SEQ ID NO: 37, 38 e 39); e si lega specificamente al BST1, preferibilmente il BST1 umano. Un esempio di un anticorpo avente geni V_H 1-80 e V_K 4-74, con le sequenze descritte sopra, è BST1_A1.

In ancora un'altra forma di realizzazione preferita, l'invenzione fornisce un anticorpo monoclonale isolato, o una sua porzione legante l'antigene, in cui l'anticorpo:

comprende una regione variabile della catena pesante che è il prodotto di o è derivata da un gene V_H 69-1 murino (il quale gene comprende la sequenza nucleotidica esposta nelle SEQ ID NO: 68 e 69); comprende una regione variabile della catena leggera che è il prodotto di o è derivata da un gene V_K 44-1 murino (il quale gene comprende le sequenze nucleotidiche esposte nelle SEQ ID NO: 70, 71 e 72); e si lega specificamente al BST1, preferibilmente il BST1 umano. Un esempio di un

anticorpo avente geni V_H e V_K , con le sequenze descritte sopra, è BST1_A3.

Come utilizzato qui, un anticorpo comprende regioni variabili della catena pesante o leggera che sono "il prodotto di" o "derivate da" una particolare sequenza della linea germinale se le regioni variabili dell'anticorpo sono ottenute da un sistema che utilizza geni immunoglobulinici della linea germinale murina. Tali sistemi includono lo screening di una libreria genica immunoglobulinica murina mostrata su fago con l'antigene d'interesse. Un anticorpo che è "il prodotto di" o "derivato da" una sequenza immunoglobulinica della linea germinale murina può essere identificata come tale confrontando la sequenza nucleotidica o amminoacidica dell'anticorpo con le sequenze nucleotidiche o amminoacidiche di immunoglobuline della linea germinale murina e selezionando la sequenza immunoglobulinica della linea germinale murina che è più vicina nella sequenza (cioè ha l'identità % superiore) alla sequenza dell'anticorpo. Un anticorpo che è "il prodotto di" o "derivato da" una particolare sequenza immunoglobulinica della linea germinale murina può contenere differenze di amminoacidi rispetto alla sequenza della linea germinale, a causa, per esempio, di mutazioni somatiche presenti in natura o dell'introduzione intenzionale di una mutazione sito-diretta. Tuttavia, un anticorpo scelto tipicamente è identico per almeno il 90% nella sequenza amminoacidica ad una sequenza amminoacidica codificata da un gene immunoglobulinico della linea germinale murina e contiene residui amminoacidici che identificano l'anticorpo come essere murino quando confrontato con le sequenze amminoacidiche

immunoglobuliniche della linea germinale di altre specie (per esempio sequenze della linea germinale umana). In certi casi, un anticorpo può essere identico almeno per il 95%, o perfino almeno per il 96%, il 97%, il 98%, o il 99% nella sequenza amminoacidica alla sequenza amminoacidica codificata dal gene immunoglobulinico della linea germinale. Tipicamente, un anticorpo derivato da una particolare sequenza della linea germinale murina mostrerà non più di 10 differenze di amminoacidi dalla sequenza amminoacidica codificata dal gene immunoglobulinico della linea germinale murina. In certi casi, l'anticorpo può mostrare non più di 5, o perfino non più di 4, 3, 2, o 1 differenze amminoacidiche dalla sequenza amminoacidica codificata dal gene immunoglobulinico della linea germinale.

Anticorpi omologhi

In ancora un altro esempio, un anticorpo della descrizione comprende regioni variabili della catena pesante e leggera comprendenti sequenze amminoacidiche che sono omologhe alle sequenze amminoacidiche degli anticorpi preferiti qui descritti, ed in cui gli anticorpi mantengono le proprietà funzionali desiderate degli anticorpi anti-BST1 dell'invenzione.

Per esempio, la descrizione fornisce un anticorpo monoclonale isolato, o una sua porzione legante l'antigene, comprendente una regione variabile della catena pesante ed una regione variabile della catena leggera, in cui: la regione variabile della catena pesante comprende una sequenza amminoacidica che è almeno identica all'80% ad una sequenza amminoacidica scelta nel gruppo composto dalle SEQ ID NO:2, 1 e 52; la

regione variabile della catena leggera comprende una sequenza amminoacidica che è identica almeno per l'80% ad una sequenza amminoacidica scelta nel gruppo composto dalle SEQ ID NO: 4, 3 e 53; e l'anticorpo si lega al BST1 umano. Tali anticorpi possono legarsi al BST1 umano con una EC_{50} di 50 nM o inferiore, 10 nM o inferiore, 1 nM o inferiore, 100 pM o inferiore, o più preferibilmente 10 pM o inferiore.

L'anticorpo può anche legarsi a cellule CHO trasfettate con il BST1 umano.

In varie forme di realizzazione, l'anticorpo può essere, per esempio, un anticorpo umano, un anticorpo umanizzato o un anticorpo chimerico.

In altre forme di realizzazione, le sequenze amminoacidiche di V_H e/o V_K possono essere omologhe per il 95%, il 96%, il 97%, il 98% o il 99% alle sequenze esposte sopra. Un anticorpo avente regioni V_H e V_K aventi identità elevata (cioè dell'80% o più) alle regioni V_H e V_K delle sequenze esposte sopra, può essere ottenuto mediante mutagenesi (per esempio mutagenesi sito-diretta o mediata da PCR) di molecole di acido nucleico codificanti le SEQ ID NO: 6, 5, 8, 7, 54 e 55 cui segue il test dell'anticorpo modificato codificato per la funzione conservata utilizzando i saggi funzionali qui descritti.

La percentuale di identità tra le due sequenze è una funzione del numero delle posizioni identiche condivise dalle sequenze (cioè % di omologia = # di posizioni identiche/# totale di posizioni x 100), prendendo in considerazione il numero di interruzioni, e la lunghezza di ciascuna interruzione, che deve essere introdotto per l'allineamento ottimale delle

due sequenze. Il confronto di sequenze e la determinazione della percentuale di identità tra due sequenze possono essere realizzati utilizzando un algoritmo matematico, come descritto negli esempi non limitanti sotto.

La percentuale di identità tra due sequenze amminoacidiche può essere determinata utilizzando l'algoritmo di E. Meyers e W. Miller [*Comput. Appl. Biosci.* (1988) 4:11-17] che è stato incorporato nel programma ALIGN (versione 2.0), utilizzando una tabella di peso dei residui PAM120, una penalità per la lunghezza di interruzione di 12 ed una penalità per l'interruzione di 4. Inoltre, la percentuale di identità tra due sequenze amminoacidiche può essere determinata utilizzando l'algoritmo di Needleman e Wunsch [*J. Mol. Biol.* (1970) 48:444-453] che è stato incorporato nel programma GAP nel pacchetto di programmi GCG (disponibile in <http://www.gcg.com>), utilizzando una matrice Blosum 62 o una matrice PAM250, ed un peso per le interruzioni di 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 ed un peso per le lunghezze di 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

In aggiunta o in alternativa, le sequenze proteiche della presente invenzione possono inoltre essere utilizzate come "sequenza di interrogazione" per eseguire una ricerca nei confronti di banche dati pubbliche, per esempio, per identificare sequenze correlate. Tali ricerche possono essere eseguite utilizzando il programma XBLAST (versione 2.0) di Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Le ricerche proteiche con BLAST possono essere eseguite con il programma XBLAST, punteggio = 50, lunghezza della parola = 3 per ottenere sequenze amminoacidiche omologhe alle molecole anticorpali dell'invenzione. Per ottenere

allineamenti interrotti per scopi di confronto, si può utilizzare Gapped BLAST come descritto in Altschul *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. Quando si utilizzano i programmi BLAST e Gapped BLAST, si possono utilizzare i parametri preimpostati dei rispettivi programmi (per esempio XBLAST e NBLAST). Si veda www.ncbi.nlm.nih.gov.

Anticorpi con modifiche conservative

In certi esempi, un anticorpo della descrizione comprende una regione variabile della catena pesante comprendente sequenze di CDR1, CDR2 e CDR3 ed una regione variabile della catena leggera comprendente sequenze di CDR1, CDR2 e CDR3, in cui una o più tra queste sequenze delle CDR comprendono sequenze amminoacidiche specificate in base agli anticorpi preferiti qui descritti (per esempio BST1_A2, BST1_A1 e BST1_A3), o loro modifiche conservative, ed in cui gli anticorpi mantengono le proprietà funzionali desiderate degli anticorpi anti-BST1 dell'invenzione. Conseguentemente, la descrizione fornisce un anticorpo monoclonale isolato, o una sua porzione legante l'antigene, comprendente una regione variabile della catena pesante comprendente sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 ed una regione variabile della catena leggera comprendente sequenze CDR1, CDR2 e CDR3, in cui: la sequenza CDR3 della regione variabile della catena pesante comprende una sequenza amminoacidica scelta nel gruppo composto dalle sequenze amminoacidiche della SEQ ID NO:14, 13 e 58, e loro modifiche conservative; la sequenza CDR3 della regione variabile della catena leggera comprende una sequenza amminoacidica scelta nel gruppo

consistente della sequenza amminoacidica delle SEQ ID NO: 20, 19 e 61, e loro modifiche conservative; e l'anticorpo si lega al BST1 umano con una EC_{50} di 50 nM o inferiore, 10 nM o inferiore, 1 nM o inferiore, 100 pM o inferiore, o più preferibilmente 10 pM o inferiore.

L'anticorpo può anche legarsi a cellule CHO trasfettate con BST1 umano.

In una forma di realizzazione preferita, la sequenza della CDR2 della regione variabile della catena pesante comprende una sequenza amminoacidica scelta nel gruppo composto dalle sequenze amminoacidiche delle SEQ ID NO:12 o 51, e loro modifiche conservative; e la sequenza della CDR2 della regione variabile della catena leggera comprende una sequenza amminoacidica della SEQ ID NO:18, e sue modifiche conservative. In un'altra forma di realizzazione preferita, la sequenza della CDR1 della regione variabile della catena pesante comprende una sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 10, e sue modifiche conservative; e la sequenza della CDR1 della regione variabile della catena leggera comprende una sequenza amminoacidica della SEQ ID NO:16, e sue modifiche conservative. In un'altra forma di realizzazione preferita, la sequenza CDR3 della regione variabile della catena pesante comprende una sequenza amminoacidica della SEQ ID NO:14, e sue modifiche conservative; e la sequenza CDR3 della regione variabile della catena leggera comprende una sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 20, e sue modifiche conservative.

In una forma di realizzazione preferita, la sequenza della CDR2 della regione variabile della catena pesante comprende una sequenza

amminoacidica delle SEQ ID NO:12 o 51, e loro modifiche conservative; e la sequenza della CDR2 della regione variabile della catena leggera comprende una sequenza amminoacidica della SEQ ID NO:18, e sue modifiche conservative. In un'altra forma di realizzazione preferita, la sequenza della CDR1 della regione variabile della catena pesante comprende una sequenza amminoacidica della SEQ ID NO: 10, e sue modifiche conservative; e la sequenza della CDR1 della regione variabile della catena leggera comprende una sequenza amminoacidica scelta nel gruppo composto dalle sequenze amminoacidiche della SEQ ID NO:16, e loro modifiche conservative.

In varie forme di realizzazione, l'anticorpo può essere, per esempio, anticorpi umani, anticorpi umanizzati o anticorpi chimerici.

Come utilizzato qui, il termine "modifiche conservative di sequenza" è inteso riferirsi alle modifiche amminoacidiche che non influenzano o modificano significativamente le caratteristiche di legame dell'anticorpo contenente la sequenza amminoacidica. Tali modifiche conservative includono sostituzioni, addizioni e delezioni amminoacidiche. Le modifiche possono essere introdotte in un anticorpo dell'invenzione mediante tecniche standard note nell'arte, quali mutagenesi sito-specifica e mutagenesi mediata da PCR. Sostituzioni amminoacidiche conservative sono quelle in cui il residuo amminoacidico è sostituito con un residuo amminoacidico avente una catena laterale simile. Famiglie di residui amminoacidici aventi catene laterali simili sono state definite nell'arte. Queste famiglie includono amminoacidi con catene laterali basiche (per esempio lisina, arginina, istidina), catene laterali acide (per esempio acido

aspartico, acido glutammico), catene laterali polari non cariche (per esempio glicina, asparagina, glutammina, serina, treonina, tirosina, cisteina, triptofano), catene laterali non polari (per esempio alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), catene laterali beta-ramificate (per esempio treonina, valina, isoleucina) e catene laterali aromatiche (per esempio tirosina, fenilalanina, triptofano, istidina). Così, uno o più residui amminoacidici all'interno delle regioni CDR di un anticorpo dell'invenzione possono essere sostituiti con altri residui amminoacidici dalla famiglia con la stessa catena laterale e l'anticorpo modificato può essere testato per la funzione conservata utilizzando i saggi funzionali qui descritti.

Le sequenze della CDR1 della catena pesante delle SEQ ID NO: 10, 9 e 56 possono comprendere una o più modifiche conservative di sequenza, quali uno, due, tre, quattro, cinque o più sostituzioni, addizioni o delezioni amminoacidiche; le sequenze della CDR1 della catena leggera delle SEQ ID NO:16, 15 e 59 possono comprendere una o più modifiche conservative di sequenza, quali uno, due, tre, quattro, cinque o più sostituzioni, addizioni o delezioni amminoacidiche; le sequenze della CDR2 della catena pesante mostrate nelle SEQ ID NO:12 o 51, 11 e 57 possono comprendere una o più modifiche conservative di sequenza, quali uno, due, tre, quattro, cinque o più sostituzioni, addizioni o delezioni amminoacidiche; le sequenze della CDR2 della catena leggera mostrate nelle SEQ ID NO:18, 17 e 60 possono comprendere una o più modifiche conservative di sequenza, quali uno, due, tre, quattro, cinque o più sostituzioni, addizioni o delezioni amminoacidiche; le sequenze della

CDR3 della catena pesante mostrate nelle SEQ ID NO:14, 13 e 58 possono comprendere una o più modifiche conservative di sequenza, quali uno, due, tre, quattro, cinque o più sostituzioni, addizioni o delezioni amminoacidiche; e/o le sequenze della CDR3 della catena leggera mostrate nelle SEQ ID NO: 20, 19 e 61 possono comprendere una o più modifiche conservative di sequenza, quali uno, due, tre, quattro, cinque o più sostituzioni, addizioni o delezioni amminoacidiche.

Anticorpi che si legano allo stesso epitopo di anticorpi anti-BST1 dell'invenzione

In un altro esempio, la descrizione fornisce anticorpi che si legano allo stesso epitopo sul BST1 umano di qualsiasi degli anticorpi monoclonali nei confronti di BST1 dell'invenzione (cioè anticorpi che hanno la capacità di competere in modo incrociato per il legame al BST1 con qualsiasi degli anticorpi monoclonali dell'invenzione). In un esempio, l'anticorpo di riferimento per studi di competizione incrociata può essere l'anticorpo monoclonale BST1_A2 (avente sequenze di V_H e V_K come mostrato nelle SEQ ID NO:2 e 4, rispettivamente), l'anticorpo monoclonale BST1_A1 (avente le sequenze di V_H e V_K come mostrato nelle SEQ ID NO:1 e 3, rispettivamente), l'anticorpo monoclonale BST1_A3 (avente sequenze di V_H e V_K come mostrato nelle SEQ ID NO:52 e 53, rispettivamente).

Tali anticorpi che competono in modo incrociato possono essere identificati sulla base della loro capacità di competere in modo incrociato con BST1_A2, BST1_A1 e BST1_A3 in saggi di legame a BST1 standard. Per esempio, l'analisi BIAcore, saggi ELISA o citometria a flusso possono

essere utilizzati per dimostrare la competizione in modo incrociato con gli anticorpi della presente invenzione. La capacità di un anticorpo in esame di inibire il legame, per esempio, di BST1_A2, BST1_A1 e BST1_A3, al BST1 umano dimostra che l'anticorpo in esame può competere con BST1_A2, BST1_A1 o BST1_A3 per il legame a BST1 umano e così si lega allo stesso epitopo su BST1_A2, BST1_A1 o BST1_A3 umani.

Anticorpi ingegnerizzati e modificati

Un anticorpo dell'invenzione può essere preparato utilizzando un anticorpo avente una o più delle sequenze V_H e/o V_L qui descritte che può essere utilizzato come materiale di partenza per ingegnerizzare un anticorpo modificato, il quale anticorpo modificato può avere proprietà alterate rispetto all'anticorpo di partenza. Un anticorpo può essere ingegnerizzato modificando uno o più amminoacidi all'interno di una o di entrambe le regioni variabili (cioè V_H e/o V_L), per esempio, all'interno di una o più regioni CDR e/o all'interno di una o più regioni cornice. In aggiunta o in alternativa, un anticorpo può essere ingegnerizzato modificando residui all'interno della/e regione/i costante/i, per esempio per alterare la/e funzione/i effettrice/i dell'anticorpo.

In alcune forme di realizzazione, l'innesto su CDR può essere utilizzato per ingegnerizzare le regioni variabili anticorpali. Gli anticorpi interagiscono con antigeni bersaglio prevalentemente attraverso residui amminoacidici che sono localizzati nelle sei regioni determinanti la complementarità (CDR) della catena pesante e leggera. Per questa ragione, le sequenze amminoacidiche all'interno delle CDR sono più diverse tra singoli anticorpi rispetto a sequenze all'esterno delle CDR.

Poiché le sequenze delle CDR sono responsabili della maggior parte delle interazioni anticorpo-antigene, è possibile esprimere anticorpi ricombinanti che mimano le proprietà di specifici anticorpi presenti in natura costruendo vettori di espressione che includono sequenze delle CDR dall'anticorpo specifico presente in natura innestate su sequenze cornice da un anticorpo differente con proprietà differenti (si vedano, per esempio Riechmann, L. *et al.* (1998) *Nature* 332:323-327; Jones, P. *et al.* (1986) *Nature* 321:522-525; Queen, C. *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:10029-10033; brevetto US 5,225,539 a Winter, ed il brevetto US 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 e 6,180,370 a Queen *et al.*).

Conseguentemente, un'altra forma di realizzazione dell'invenzione si riferisce ad un anticorpo monoclonale isolato, o ad una sua porzione legante l'antigene, comprendente una regione variabile della catena pesante comprendente sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 comprendenti una sequenza amminoacidica delle SEQ ID NO: 10; 12 o 51; e 14, rispettivamente, ed una regione variabile della catena leggera comprendente le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 comprendenti una sequenza amminoacidica delle SEQ ID NO:16; 18; e 20, rispettivamente. Così, tali anticorpi contengono le sequenze di V_H e di V_K delle CDR di anticorpi monoclonali BST1_A2, tuttavia possono contenere sequenze cornice differenti da questi anticorpi.

Tali sequenze cornice possono essere ottenute da banche dati di DNA pubbliche o riferimenti pubblicati che includono sequenze geniche anticorpali della linea germinale. Per esempio, sequenze di DNA della linea germinale per geni murini della regione variabile delle catene pesanti

e leggere possono essere trovate nella banca dati delle sequenze della linea germinale murina IMGT (International ImMunoGeneTics) (disponibile nel protocollo di trasferimento di un ipertesto//www.imgt.cines.fr/?), così come in Kabat, E. A., *et al.* (1991) *Sequence of proteins of immunological interest*, quinta edizione, Dipartimento della Salute e dei Servizi Umani degli Stati Uniti, pubblicazione NIH No. 91-3242). Come altro esempio, le sequenze di DNA della linea germinale per geni murini della regione variabile delle catene pesanti e leggere possono essere trovate nella banca dati Genbank.

Le sequenze proteiche anticorpali vengono confrontate rispetto ad una banca dati di sequenze proteiche compilata utilizzando uno dei metodi di ricerca per similarità di sequenza chiamato Gapped BLAST [Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402], che è ben noto a coloro che sono esperti nell'arte. BLAST è un algoritmo euristico in quanto un allineamento statisticamente significativo tra la sequenza anticorpale e la sequenza della banca dati con una certa probabilità contiene coppie di segmenti con punteggio elevato (HSP) di parole allineate. Le coppie di segmenti i cui punteggi non possono essere migliorati mediante estensione o taglio vengono chiamate hit. In breve, le sequenze nucleotidiche nella banca dati vengono tradotte e la regione della regione cornice FR1 ad FR3, e comprendente queste, è conservata. Le sequenze della banca dati hanno una lunghezza media di 98 residui. Le sequenze duplicate che sono accoppiamenti esatti per l'intera lunghezza della proteina vengono rimosse. Una ricerca in BLAST per proteine utilizzando il programma blastp con parametri predefiniti e standard eccetto il filtro di

bassa complessità, che è spento, e la matrice di sostituzioni di BLOSUM62, filtra le 5 migliori hit che danno corrispondenze di sequenza. Le sequenze nucleotidiche sono tradotte in tutte le sei cornici di lettura e la cornice senza alcun codone di arresto nel segmento di appaiamento della sequenza della banca dati viene considerata la hit potenziale. Questo è a sua volta confermato utilizzando il programma BLAST tblastx, che traduce la sequenza anticorpale in tutte le sei cornici di lettura e confronta quelle traduzioni con le sequenze nucleotidiche nella banca dati dinamicamente tradotte in tutte le sei cornici di lettura.

Le identità sono appaiamenti amminoacidici esatti tra la sequenza anticorpale e la banca dati di proteine per l'intera lunghezza della sequenza. I risultati positivi (identità + appaiamento delle sostituzioni) non sono identici ma sostituzioni amminoacidiche guidate dalla matrice di sostituzioni BLOSUM62. Se la sequenza anticorpale appaia due delle sequenze di banca dati con la stessa identità, la hit con i risultati più positivi sarebbe decisa essere la hit della sequenza corrispondente.

Sequenze cornice preferite per uso negli anticorpi dell'invenzione sono quelle che sono strutturalmente simili alle sequenze cornice utilizzate da anticorpi scelti dell'invenzione, per esempio, simili alla sequenza cornice di V_H 1-80, alla sequenza cornice di V_H 1-39, alla sequenza cornice di V_K 4-74 e/o alle sequenze cornice V_K 4-55 utilizzate da anticorpi monoclonali preferiti dell'invenzione. Le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di V_H , e le sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 di V_K , possono essere innestate su regioni cornice che hanno la sequenza identica come quella trovata nel gene immunoglobulinico della linea germinale da cui la

sequenza cornice deriva, o le sequenze delle CDR possono essere innestate su regioni cornice che contengono una o più mutazioni rispetto alle sequenze della linea germinale. Per esempio, è stato trovato che in certi casi è vantaggioso mutare i residui all'interno delle regioni cornice per mantenere o aumentare la capacità di legare l'antigene dell'anticorpo (si vedano, per esempio, i brevetti US 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 e 6,180,370 a Queen *et al.*).

Un altro tipo di modifica della regione variabile consiste nel mutare residui amminoacidici all'interno delle regioni CDR1, CDR2 e/o CDR3 V_H e/o V_K per migliorare quindi una o più proprietà di legame (per esempio affinità) dell'anticorpo d'interesse. La mutagenesi sito-specifica o la mutagenesi mediata da PCR possono essere eseguite per introdurre la/e mutazione/i e l'effetto sul legame dell'anticorpo, o altre proprietà funzionali d'interesse, possono essere valutate in saggi *in vitro* o *in vivo* come qui descritto e fornito negli Esempi. In alcuni esempi, vengono introdotte modifiche conservative (come discusso sopra). In alternativa, possono essere effettuate modifiche non conservative. Le mutazioni possono essere sostituzioni, addizioni o delezioni amminoacidiche, ma sono preferibilmente sostituzioni. Inoltre, tipicamente non più di uno, due, tre, quattro o cinque residui all'interno di una regione CDR sono alterati, sebbene, come sarà apprezzato da parte di quelli nell'arte, varianti in altre aree (regioni cornice per esempio) possono essere maggiori.

Conseguentemente, in un altro esempio, la presente descrizione fornisce anticorpi monoclonali anti-BST1 isolati, o loro porzioni leganti l'antigene, comprendenti una regione variabile della catena pesante

comprendente: (a) una regione CDR1 della V_H comprendente una sequenza amminoacidica scelta nel gruppo composto dalle SEQ ID NO: 10, 9 e 56 o una sequenza amminoacidica avente una, due, tre, quattro o cinque sostituzioni, delezioni o addizioni amminoacidiche rispetto alle SEQ ID NO: 10, 9 e 56; (b) una regione CDR2 della V_H comprendente una sequenza amminoacidica scelta nel gruppo composto dalle SEQ ID NO:12 o 51, 11 e 57, o una sequenza amminoacidica avente una, due, tre, quattro o cinque sostituzioni, delezioni o addizioni amminoacidiche rispetto alle SEQ ID NO:12 o 51, 11 e 57; (c) una regione CDR3 della V_H comprendente una sequenza amminoacidica scelta nel gruppo composto dalle SEQ ID NO:14, 13 e 58, o una sequenza amminoacidica avente una, due, tre, quattro o cinque sostituzioni, delezioni o addizioni amminoacidiche rispetto alle SEQ ID NO:14, 13 e 58; (d) una regione CDR1 della V_K comprendente una sequenza amminoacidica scelta nel gruppo composto dalle SEQ ID NO:16, 15 e 59, o una sequenza amminoacidica avente una, due, tre, quattro o cinque sostituzioni, delezioni o addizioni amminoacidiche rispetto alle SEQ ID NO:16, 15 e 59; (e) una regione CDR2 della V_K comprendente una sequenza amminoacidica scelta nel gruppo composto dalle SEQ ID NO:18, 17 e 60, o una sequenza amminoacidica avente una, due, tre, quattro o cinque sostituzioni, delezioni o addizioni amminoacidiche rispetto alle SEQ ID NO:18, 17 e 60; e (f) una regione CDR3 della V_K comprendente una sequenza amminoacidica scelta nel gruppo composto dalle SEQ ID NO: 20, 19 e 61, o una sequenza amminoacidica avente una, due, tre, quattro

o cinque sostituzioni, delezioni o addizioni amminoacidiche rispetto alle SEQ ID NO: 20, 19 e 61.

Anticorpi ingegnerizzati della descrizione includono quelli in cui sono state apportate modifiche ai residui della regione cornice all'interno di V_H e/o V_K , per esempio per migliorare le proprietà dell'anticorpo. Tipicamente tali modifiche della regione cornice vengono effettuate per diminuire l'immunogenicità dell'anticorpo. Per esempio, un approccio è di "retromutare" uno o più residui della regione cornice nella corrispondente sequenza della linea germinale. Più specificamente, un anticorpo che ha subito mutazione somatica può contenere residui della regione cornice che differiscono dalla sequenza della linea germinale da cui l'anticorpo è derivato. Tali residui possono essere identificati confrontando le sequenze cornice anticorpali con le sequenze della linea germinale da cui l'anticorpo è derivato.

Un altro tipo di modifica delle cornici implica la mutazione di uno o più residui all'interno della regione cornice, o perfino all'interno di una o più regioni CDR, per rimuovere epitopi dei linfociti T per ridurre quindi la potenziale immunogenicità dell'anticorpo. Questo approccio viene indicato anche come "deimmunizzazione" e viene descritto in ulteriore dettaglio nella pubblicazione del brevetto US 2003/0153043.

In aggiunta o in alternativa alle modifiche effettuate all'interno delle regioni cornice o CDR, gli anticorpi dell'invenzione possono essere ingegnerizzati per includere modifiche all'interno della regione Fc, tipicamente per alterare una o più proprietà funzionali dell'anticorpo, quali emivita nel siero, fissazione del complemento, legame al recettore Fc, e/o

citotossicità cellulare dipendente dall'antigene. Inoltre, un anticorpo dell'invenzione può essere modificato chimicamente (per esempio uno o più gruppi funzionali chimici possono essere attaccati all'anticorpo) o essere modificato per alterare la sua glicosilazione, ancora per alterare una o più proprietà funzionali dell'anticorpo. Ciascuna di queste forme di realizzazione viene descritta in ulteriore dettaglio sotto. La numerazione dei residui nella regione Fc è quella dell'indice EU di Kabat.

In una forma di realizzazione, la regione cerniera di C_H1 viene modificata in modo tale che il numero dei residui di cisteina nella regione cerniera sia alterato, per esempio aumentato o ridotto. Questo approccio viene descritto ulteriormente nel brevetto US 5,677,425. Il numero dei residui di cisteina nella regione cerniera di C_H1 è alterato, per esempio, per facilitare l'assemblamento delle catene leggere e pesanti o per incrementare o ridurre la stabilità dell'anticorpo.

In un'altra forma di realizzazione, la regione a cerniera dell'Fc di un anticorpo è mutata per ridurre l'emivita biologica dell'anticorpo. Più specificamente, una o più mutazioni amminoacidiche vengono introdotte nella regione all'interfaccia dei domini C_H2-C_H3 del frammento a cerniera della Fc in modo tale che l'anticorpo abbia il legame alla proteina A di stafilococco (SpA) danneggiato rispetto al legame alla SpA del dominio a cerniera della Fc nativa. Questo approccio viene descritto in ulteriore dettaglio nel brevetto US 6,165,745.

In un'altra forma di realizzazione, l'anticorpo viene modificato per incrementare la sua emivita biologica. Sono possibili vari approcci. Per esempio, una o più delle seguenti mutazioni possono essere introdotte:

T252L, T254S, T256F, come descritto nel brevetto US 6,277,375. In alternativa, per incrementare l'emivita biologica, l'anticorpo può essere modificato all'interno della regione C_{H1} o C_L per contenere un epitopo legante il recettore di salvataggio preso da due anse di un dominio C_{H2} di una regione Fc di un'IgG, come descritto nel brevetto US 5,869,046 e 6,121,022.

In un'altra forma di realizzazione, l'anticorpo viene prodotto come UniBody come descritto in WO 2007/059782.

In ancora altre forme di realizzazione, la regione Fc è alterata sostituendo almeno un residuo amminoacidico con un residuo amminoacidico differente per alterare la/e funzione/i effettrice/i dell'anticorpo. Per esempio, uno o più amminoacidi scelti tra i residui amminoacidici 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 e 322 possono essere sostituiti con un residuo amminoacidico differente in modo tale che l'anticorpo abbia un'affinità alterata per un ligando effetore ma mantenga la capacità di legare l'antigene dell'anticorpo progenitore. Il ligando effetore verso cui l'affinità è alterata può essere, per esempio, un recettore per l'Fc o il componente C1 del complemento. Questo approccio viene descritto in ulteriore dettaglio nei brevetti US 5,624,821 e 5,648,260.

In un altro esempio, uno o più amminoacidi scelti tra i residui amminoacidici 329, 331 e 322 possono essere sostituiti con un residuo amminoacidico differente in modo tale che l'anticorpo abbia un legame alterato a C1q e/o una citotossicità dipendente dal complemento (CDC) ridotta o abolita. Questo approccio viene descritto in ulteriore dettaglio nel brevetto US 6,194,551.

In un altro esempio, uno o più residui amminoacidici all'interno delle posizioni amminoacidiche 231 e 239 sono alterati per modificare quindi la capacità dell'anticorpo di fissare il complemento. Questo approccio viene descritto ulteriormente nella pubblicazione PCT WO 94/29351.

In ancora un altro esempio, la regione Fc viene modificata per incrementare la capacità dell'anticorpo di mediare la citotossicità cellulare dipendente dagli anticorpi (ADCC) e/o incrementare l'affinità dell'anticorpo per un recettore di Fcγ modificando uno o più amminoacidi nelle seguenti posizioni: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439. Questo approccio viene descritto ulteriormente nella pubblicazione PCT WO 00/42072 di Presta. Inoltre, i siti di legame sull'IgG1 umana per FcγR1, FcγR2, FcγR3 e FcRn sono stati mappati e sono state descritte varianti con legame migliorato (si veda Shields, R.L. *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604). È stato mostrato che mutazioni specifiche nelle posizioni 256, 290, 298, 333, 334 e 339 migliorano il legame all'FcγR3. Inoltre, è stato mostrato che i seguenti mutanti di combinazione migliorano il legame all'FcγR3: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A e S298A/E333A/K334A. Inoltre, varianti di ADCC vengono descritte per esempio in WO2006/019447.

In ancora un altro esempio, la regione Fc viene modificata per incrementare l'emivita dell'anticorpo, in generale aumentando il legame al recettore FcRn, come descritto per esempio in PCT/US2008/088053, US 7,371,826, US 7,670,600 e WO97/34631. In un'altra forma di realizzazione, l'anticorpo viene modificato per incrementare la sua emivita biologica. Sono possibili vari approcci. Per esempio, una o più delle seguenti mutazioni possono essere introdotte: T252L, T254S, T256F, come descritto nel brevetto US 6,277,375 di Ward. In alternativa, per incrementare l'emivita biologica, l'anticorpo può essere modificato all'interno della regione C_{H1} o C_L per contenere un epitopo legante il recettore di salvataggio preso da due anse di un dominio C_{H2} di una regione Fc di un'IgG, come descritto nei brevetti US 5,869,046 e 6,121,022.

In ancora un'altra forma di realizzazione, viene modificata la glicosilazione di un anticorpo. Per esempio, può essere prodotto un anticorpo non glicosilato (cioè l'anticorpo che è privo di glicosilazione). La glicosilazione può essere modificata, per esempio, per incrementare l'affinità dell'anticorpo per l'antigene. Tali modifiche carboidratiche possono essere realizzate, per esempio, alterando uno o più siti di glicosilazione all'interno della sequenza anticorpale. Per esempio, si possono apportare una o più sostituzioni amminoacidiche che risultano nell'eliminazione di uno o più siti di glicosilazione della cornice della regione variabile per eliminare quindi la glicosilazione a quel sito. Tale aglicosilazione può incrementare l'affinità dell'anticorpo per l'antigene. Un tale approccio viene descritto in ulteriore dettaglio nei brevetti US

5,714,350 e 6,350,861 di Co *et al.*, e può essere realizzato rimuovendo l'asparagina in posizione 297.

In aggiunta o in alternativa, può essere prodotto un anticorpo che ha un tipo modificato di glicosilazione, quale un anticorpo ipofucosilato avente quantità ridotte di residui di fucosile o un anticorpo avente strutture di GlcNac bisecanti aumentate. Questo è talvolta indicato nell'arte come "glicofoma ingegnerizzata". Tali profili di glicosilazione modificata sono stati dimostrati incrementare la capacità di ADCC degli anticorpi. Tali modifiche carboidratiche possono in generale essere realizzate in due modi; per esempio, in alcune forme di realizzazione, l'anticorpo viene espresso in una cellula ospite con un macchinario di glicosilazione modificato. Le cellule con un macchinario di glicosilazione modificato sono state descritte nell'arte e possono essere utilizzate come cellule ospiti in cui esprimere anticorpi ricombinanti dell'invenzione per produrre quindi un anticorpo con glicosilazione modificata. Si fa riferimento alla tecnologia POTELLIGENT®. Per esempio, le linee cellulari Ms704, Ms705, e Ms709 mancano del gene della fucosiltransferasi, FUT8 (alfa (1,6) fucosiltransferasi), in modo tale che gli anticorpi espressi nelle linee cellulari Ms704, Ms705 ed Ms709 siano privi di fucosio sui loro carboidrati. Le linee cellulari Ms704, Ms705 e Ms709 FUT8^{-/-} sono state generate mediante la distruzione mirata del gene FUT8 in cellule CHO/DG44 utilizzando due vettori di sostituzione [si veda la pubblicazione del brevetto US 2004/0110704, il brevetto US 7,517,670 e Yamane-Ohnuki *et al.* (2004) *Biotechnol. Bioeng.* 87:614-22]. Come altro esempio, EP 1,176,195 di Hanai *et al.* descrive una linea cellulare con un gene FUT8

funzionalmente disgregato, che codifica una fucosiltransferasi, in modo tale che gli anticorpi espressi in una tale linea cellulare mostrino ipofucosilazione riducendo o eliminando l'enzima correlato al legame alfa 1,6. Hanai *et al.* descrivono anche linee cellulari che hanno una bassa attività enzimatica per aggiungere fucosio all'N-acetilglucosammina che si lega alla regione Fc dell'anticorpo o non ha l'attività enzimatica, per esempio la linea di cellule di mieloma di ratto YB2/0 (ATCC CRL 1662). In alternativa, glicofornie ingegnerizzate, in particolare afucosilazione, possono essere realizzate utilizzando inibitori a piccola molecola di enzimi della via metabolica della glicosilazione [si vedano, per esempio, Rothman *et al.* (1989) *Mol. Immunol.* 26(12): 113-1123; Elbein (1991) *FASEB J.* 5:3055; PCT/US2009/042610 ed il brevetto US 7,700,321]. La pubblicazione PCT WO 03/035835 descrive una linea cellulare CHO variante, cellule Lec13, con ridotta capacità di attaccare il fucosio a carboidrati legati all'Asn(297), risultando anche in ipofucosilazione di anticorpi espressi in quella cellula ospite [si veda anche Shields, R.L. *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740]. La pubblicazione PCT WO99/54342 descrive linee cellulari ingegnerizzate per esprimere glicosiltransferasi che modificano le glicoproteine (per esempio beta(1,4)-N-acetilglucosamminiltransferasi III (GnTIII)) in modo tale che gli anticorpi espressi nelle linee cellulari ingegnerizzate mostrino strutture di GlcNac bisecanti aumentate che risulta in attività di ADCC aumentata degli anticorpi [si veda anche Umana *et al.* (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180].

In alternativa, i residui di fucosio dell'anticorpo possono essere rimossi per scissione utilizzando un enzima fucosidasi. Per esempio, la

fucosidasi alfa-L-fucosidasi rimuove i residui di fucosile dagli anticorpi [Tarentino, A.L. *et al.* (1975) *Biochem.* 14:5516-23].

Un'altra modifica degli anticorpi qui che è contemplata dall'invenzione è la PEGilazione. Un anticorpo può essere PEGilato, per esempio, per incrementare l'emivita biologica (per esempio sierica) dell'anticorpo. Per PEGilare un anticorpo, l'anticorpo, o un suo frammento, vengono fatti reagire tipicamente con polietilenglicole (PEG), quale un derivato estereo o aldeidico reattivo di PEG, in condizioni in cui uno o più gruppi PEG diventano attaccati all'anticorpo o al frammento anticorpale. Preferibilmente, la PEGilazione viene realizzata attraverso una reazione di acilazione o una reazione di alchilazione con una molecola di PEG reattiva (o un polimero idrosolubile reattivo analogo). Come utilizzato qui, il termine "polietilenglicole" è inteso comprendere qualsiasi delle forme di PEG che sono state utilizzate per derivatizzare altre proteine, quali mono (C1-C10) alcossipolietilenglicole o arilossipolietilenglicole o polietilenglicole-maleimmide. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo da PEGilare è un anticorpo aglicosilato. Metodi per PEGilare proteine sono noti nell'arte e possono essere applicati agli anticorpi dell'invenzione. Si vedano, per esempio, EP 0154316 ed EP 0401384.

In ulteriori forme di realizzazione, per esempio nell'uso degli anticorpi della descrizione per scopi diagnostici o di rilevamento, gli anticorpi possono comprendere un marcatore. Con "marcato" qui si intende che un composto ha almeno un elemento, un isotopo o un composto chimico attaccati per permettere il rilevamento del composto. In generale, i marcatori rientrano in tre classi: a) marcatori isotopici, che

possono essere isotopi radioattivi o pesanti; b) magnetici, elettrici, termici; e c) coloranti colorati o luminescenti; sebbene i marcatori includano enzimi e particelle quali anche particelle magnetiche. Marcatori preferiti includono, ma senza limitazione, complessi di lantanidi fluorescenti (compresi quelli di europio e terbio), e marcatori fluorescenti compresi, ma senza limitazione, punti quantici, fluoresceina, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, cumarina, metilcumarina, pirene, verde Malacite, stilbene, giallo Lucifer, Cascade Blue, rosso Texas, i coloranti Alexa, i coloranti Cy, ed altri descritti nella sesta edizione del Molecular Probes Handbook da Richard P. Haugland.

Gruppi di collegamento

La presente invenzione fornisce coniugati anticorpo-partner dove l'anticorpo è legato al partner attraverso un gruppo di collegamento chimico. In alcuni esempi, il gruppo di collegamento è un gruppo di collegamento peptidico, altri gruppi di collegamento includono gruppi di collegamento idrazinici e disolfuro. Oltre ai gruppi di collegamento come essere attaccati al partner, la presente descrizione fornisce anche bracci di gruppi di collegamento scindibili che sono appropriati per l'attacco a essenzialmente qualsiasi specie molecolare. Il braccio del gruppo di collegamento può essere qui esemplificato come riferimento al loro attacco ad un gruppo funzionale terapeutico. Sarà, tuttavia, facilmente evidente a coloro che sono esperti nell'arte che i gruppi di collegamento possono essere attaccati a specie diverse compresi, ma senza limitazione, agenti diagnostici, agenti analitici, biomolecole, agenti di indirizzamento a bersaglio, traccianti rilevabili e simili.

L'uso di peptidile e di altri gruppi di collegamento in coniugati anticorpo-partner viene descritto nelle domande di brevetto provvisionali US 60/295 196, 60/295 259, 60/295342, 60/304 908, 60/572 667, 60/661 174, 60/669 871, 60/720 499, 60/730 804, e 60/735 657 e nelle domande di brevetto US 10/160 972, 10/161 234, 11/134 685, 11/134 826, e 11/398 854 e nel brevetto US 6,989,452 e nella domanda di brevetto PCT PCT/US2006/37793. Ulteriori gruppi di collegamento vengono descritti nel brevetto US 6,214,345, nella domanda di brevetto US 2003/0096743 e nella domanda di brevetto US 2003/0130189, de Groot et al., J. Med. Chem. 42,5277 (1999), de Groot et al., J. Org. Chem. 43, 3093 (2000), de Groot et al., J. Med. Chem. 66, 8815, (2001), WO 02/083180, Carl et al., J. Med. Chem. Lett. 24, 479, (1981), Dubowchik et al., Bioorg & Med. Chem. Lett. 8, 3347 (1998), e nella domanda del brevetto US provvisoriale 60/891 028.

In un esempio, la presente descrizione riguarda gruppi di collegamento che sono utili per attaccare gruppi bersaglio ad agenti terapeutici e marcatori. In un altro esempio, questa descrizione fornisce gruppi di collegamento che conferiscono stabilità ai composti, riducono la loro tossicità *in vivo*, o altrimenti influenzano in modo favorevole le loro farmacocinetica, biodisponibilità e/o farmacodinamica. In generale si preferisce che in tali esempi il gruppo di collegamento venga scisso, rilasciando il farmaco attivo, una volta che il farmaco viene rilasciato al suo sito d'azione. Così, in una forma di realizzazione, i gruppi di collegamento della presente descrizione non lasciano traccia, in modo tale che una volta rimossi dall'agente terapeutico o dal marcatore (come durante

l'attivazione), non rimanga alcuna traccia della presenza del gruppo di collegamento. In un'altra forma di realizzazione, i gruppi di collegamento sono caratterizzati dalla loro capacità di essere scissi in un sito in una cellula bersaglio, o vicino a questa, quale il sito d'azione terapeutica o di attività del marcatore. Tale scissione può essere enzimatica in natura. Questa caratteristica aiuta a ridurre l'attivazione sistemica dell'agente terapeutico o del marcatore, riducendo la tossicità e gli effetti collaterali sistemici. Gruppi scindibili preferiti per scissione enzimatica includono legami peptidici, legami esterei, e legami disolfuro. In altre forme di realizzazione, i gruppi di collegamento sono sensibili al pH e vengono scissi attraverso variazioni nel pH.

Un aspetto della presente descrizione è la capacità di controllare la velocità con cui i gruppi di collegamento si scindono. Spesso è desiderato un gruppo di collegamento che si scinde velocemente. In alcune forme di realizzazione, tuttavia, può essere preferito un gruppo di collegamento che si scinde più lentamente. Per esempio, in una formulazione a rilascio prolungato o in una formulazione con un componente sia a rilascio veloce sia a rilascio lento, può essere utile il fornire un gruppo di collegamento che si scinde più lentamente. WO 02/096910 fornisce diversi complessi specifici ligando-farmaco aventi un gruppo di collegamento idrazinico. Tuttavia, non vi è alcun modo di "regolare" la composizione del gruppo di collegamento in modo dipendente dalla velocità di ciclizzazione richiesta, e i composti particolari descritti scindono il ligando dal farmaco ad una velocità più bassa rispetto a quanto si preferisca per molti coniugati farmaci-gruppo di collegamento.

Al contrario, i gruppi di collegamento idrazinici della presente descrizione contemplano un intervallo di velocità di ciclizzazione, da molto veloce a molto lenta, permettendo quindi la selezione di una particolare gruppo di collegamento idrazinico in base alla velocità di ciclizzazione desiderata.

Per esempio, una ciclizzazione molto veloce può essere ottenuta con gruppi di collegamento idrazinici che producono un anello singolo a 5 termini dopo la scissione. Velocità di ciclizzazione preferite per un rilascio mirato di un agente citotossico alle cellule vengono ottenute utilizzando gruppi di collegamento idrazinici che producono, dopo la scissione, due anelli a 5 termini o un anello singolo a 6 termini risultante da un gruppo di collegamento avente due metili alla posizione geminale. L'effetto del gem-dimetile è stato mostrato accelerare la velocità della reazione di ciclizzazione rispetto ad un anello singolo a 6 termini senza i due metili alla posizione geminale. Questo risulta dalla tensione che viene liberata nell'anello. Talvolta, tuttavia, i sostituenti possono rallentare la reazione invece che renderla più veloce. Spesso le ragioni per il ritardo possono essere individuate nell'ingombro sterico. Per esempio, la sostituzione con gem-dimetile permette che avvenga una reazione di ciclizzazione molto più veloce rispetto a quando il carbonio geminale è un CH_2 .

È importante notare, tuttavia, che in alcune forme di realizzazione, un gruppo di collegamento che si scinde più lentamente può essere preferito. Per esempio, in una formulazione a rilascio prolungato o in una formulazione con un componente sia a rilascio veloce sia a rilascio lento, può essere utile il fornire un gruppo di collegamento che si scinde più lentamente. In alcune forme di realizzazione, una bassa velocità di

ciclizzazione è ottenuta utilizzando un gruppo di collegamento idrazinico che produce, dopo la scissione, un anello singolo a 6 termini, senza la sostituzione gem-dimetile, o un anello singolo a 7 termini. I gruppi di collegamento servono anche per stabilizzare l'agente terapeutico o il marcatore nei confronti della degradazione mentre in circolazione. Questa caratteristica fornisce un beneficio significativo poiché tale stabilizzazione risulta nel prolungare l'emivita in circolo dell'agente o del marcatore attaccati. Il gruppo di collegamento serve anche ad attenuare l'attività dell'agente o del marcatore attaccati così che il coniugato sia relativamente favorevole mentre è in circolazione ed abbia l'effetto desiderato, per esempio sia tossico, dopo attivazione al sito d'azione desiderato. Per coniugati con l'agente terapeutico, questa caratteristica del gruppo di collegamento serve a migliorare l'indice terapeutico dell'agente.

I gruppi stabilizzanti vengono scelti preferibilmente per limitare l'eliminazione ed il metabolismo dell'agente terapeutico o del marcatore mediante enzimi che possono essere presenti nel sangue o in un tessuto non bersaglio e sono inoltre scelti per limitare il trasporto dell'agente o del marcatore nelle cellule. I gruppi stabilizzanti servono a bloccare la degradazione dell'agente o del marcatore e possono agire anche nel fornire altre caratteristiche fisiche dell'agente o del marcatore. Il gruppo stabilizzatore può anche migliorare la stabilità dell'agente o del marcatore durante l'immagazzinamento in una forma formulata o non formulata.

Idealmente, il gruppo stabilizzatore è utile per stabilizzare un agente terapeutico o un marcatore se esso serve a proteggere l'agente o il

marcatore da una degradazione quando testato mediante immagazzinamento dell'agente o del marcatore nel sangue umano a 37°C per 2 ore e risulta in meno del 20%, preferibilmente meno del 10%, più preferibilmente meno del 5% ed ancora più preferibilmente meno del 2%, di scissione dell'agente o del marcatore mediante gli enzimi presenti nel sangue umano nelle condizioni di saggio date. La presente descrizione riguarda anche coniugati contenenti questi gruppi di collegamento. Più in particolare, la descrizione riguarda l'uso di profarmaci che possono essere utilizzati per il trattamento di una malattia, specialmente per la chemioterapia del cancro. Specificamente, l'uso dei gruppi di collegamento qui descritti fornisce profarmaci che mostrano una specificità d'azione elevata, una tossicità ridotta, ed una stabilità migliorata nel sangue rispetto a profarmaci di struttura simile. I gruppi di collegamento della presente descrizione come qui descritto possono essere presenti ad una varietà di posizioni all'interno della molecola partner.

Così, viene qui fornito un gruppo di collegamento che può contenere qualsiasi di una varietà di gruppi come parte della sua catena che si scinderà *in vivo*, per esempio nel circolo sanguigno, ad una velocità che è aumentata rispetto a quella di costrutti che sono privi di tali gruppi. Vengono inoltre forniti coniugati dei bracci del gruppo di collegamento con agenti terapeutici e diagnostici. I gruppi di collegamento sono utili per formare analoghi di profarmaco di agenti terapeutici e per legare reversibilmente un agente terapeutico o diagnostico ad un agente bersaglio, un tracciante rilevabile, o un supporto solido. I gruppi di

collegamento possono essere incorporati in complessi che includono citotossine.

L'attacco di un profarmaco ad un anticorpo può dare ulteriori vantaggi di sicurezza rispetto a coniugati di anticorpi convenzionali di farmaci citotossici. L'attivazione di un profarmaco può essere ottenuta da parte di un'esterasi, sia all'interno di cellule tumorali sia in diversi tessuti normali, compreso il plasma. Il livello di attività di esterasi pertinente nell'uomo è stato mostrato essere molto simile a quello osservato nei ratti ed in primati diversi dall'uomo, sebbene inferiore a quello osservato in topi. L'attivazione di un profarmaco può anche essere ottenuta mediante scissione mediante glucuronidasi. Oltre al gruppo peptide, idrazina, o disolfuro scindibile, uno o più gruppi di collegamento autoimmolativi sono facoltativamente introdotti tra la citotossina e l'agente bersaglio. Questi gruppi di collegamento possono anche essere descritti come gruppi spaziatori e contengono almeno due gruppi funzionali reattivi. Tipicamente, una funzionalità chimica del gruppo spaziatore si lega ad una funzionalità chimica dell'agente terapeutico, per esempio citotossina, mentre l'altra funzionalità chimica del gruppo spaziatore viene utilizzata per legarsi ad una funzionalità chimica dell'agente bersaglio o al gruppo di collegamento scindibile. Esempi di funzionalità chimiche di gruppi spaziatori includono gruppi idrossi, mercapto, carbonile, carbossi, ammino, chetone e mercapto.

I gruppi di collegamento autoimmolativi sono in generale un alchile sostituito o non sostituito, arile sostituito o non sostituito, eteroarile sostituito o non sostituito o un gruppo eteroalchile sostituito o non

sostituito. In una forma di realizzazione, i gruppi alchilici o arilici possono comprendere tra 1 e 20 atomi di carbonio. Possono comprendere anche un gruppo funzionale di polietilenglicole.

Gruppi spaziatori esemplari includono, per esempio, 6-amminoesanolo, 6-mercaptoesanolo, acido 10-idrossidecanoico, glicina ed altri amminoacidi, 1,6-esandiolo, β -alanina, 2-amminoetanololo, cisteamina (2-amminoetantiolo), acido 5-amminopentanoico, acido 6-amminoesanoico, acido 3-maleimmidobenzoico, ftalide, derivati ftalidici sostituiti in α , il gruppo carbonile, esteri animali, acidi nucleici, peptidi e simili.

Lo spaziatore può servire ad introdurre ulteriore massa molecolare e funzionalità chimica nel complesso citotossina-agente bersaglio. Generalmente, le ulteriori massa e funzionalità influenzeranno l'emivita nel siero ed altre proprietà del complesso. Così, attraverso attenta selezione di gruppi spaziatori, possono essere prodotti complessi delle citotossine con un intervallo delle emivite sieriche.

Quando sono presenti molteplici spaziatori, possono essere utilizzati spaziatori identici o differenti.

Può essere utilizzato un ulteriore gruppo di collegamento che preferibilmente conferisce una proprietà di solubilità aumentata o di aggregazione diminuita ai coniugati utilizzando un gruppo di collegamento che contiene il gruppo funzionale o modifica la velocità di idrolisi del coniugato, tali gruppi di collegamento non devono essere autoimmolativi. In una forma di realizzazione, il gruppo di collegamento è alchile sostituito, alchile non sostituito, arile sostituito, arile non sostituito, eteroalchile

sostituito, o eteroalchile non sostituito, qualsiasi dei quali può essere lineare, ramificato, o ciclico. Le sostituzioni possono essere, per esempio, un alchile inferiore (C_1-C_6), alcossi, alchiltio, alchilammino, o dialchilammino. In alcune forme di realizzazione, gruppi di collegamento comprendono un gruppo funzionale non ciclico. In un'altra forma di realizzazione, gruppi di collegamento comprendono qualsiasi polimero di amminoacidi carico positivamente o negativamente, quale polilisina o poliarginina. Gruppi di collegamento possono comprendere un polimero quale un gruppo funzionale di polietilenglicole. Inoltre il gruppo di collegamento può comprendere, per esempio, sia un componente polimerico sia un piccolo gruppo chimico. In una forma di realizzazione preferita, tali gruppi di collegamento comprendono un gruppo funzionale di polietilenglicole (PEG).

La porzione di PEG può essere lunga tra 1 e 50 unità. Preferibilmente, il PEG avrà 1-12 unità di ripetizione, più preferibilmente 3-12 unità di ripetizione, più preferibilmente 2-6 unità di ripetizione, o ancora più preferibilmente 3-5 unità di ripetizione ed il più preferibilmente 4 unità di ripetizione. Un gruppo di collegamento può consistere unicamente del gruppo PEG, oppure può contenere anche un ulteriore alchile o eteroalchile sostituiti o non sostituiti. È utile combinare PEG come parte del gruppo funzionale per aumentare la solubilità in acqua del complesso. Inoltre, il gruppo PEG riduce il grado di aggregazione che può avvenire durante la coniugazione del farmaco all'anticorpo.

Per ulteriore discussione dei tipi di citotossine, gruppi di collegamento ed altri metodi per coniugare agenti terapeutici ad anticorpi,

si veda anche la pubblicazione PCT WO 2007/059404 a Gangwar et al. ed intitolata "Cytotoxic Compounds and Conjugates", Saito, G. et al. (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199-215; Trail, P.A. et al. (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337; Payne, G. (2003) Cancer Cell 3:207-212; Allen, T.M. (2002) Nat. Rev. Cancer 2:750-763; Pastan, I. e Kreitman, R. J. (2002) Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1089-1091; Senter, P.D. e Springer, C.J. (2001) Adv. Drug Deliv. Rev. 53:247-264.

Molecole partner

La presente invenzione comprende un anticorpo coniugato ad una molecola partner, quale una citotossina, un farmaco (per esempio un immunosoppressore) o una radiotossina. Tali coniugati vengono indicati anche qui come "immunoconiugati". Gli immunoconiugati che includono una o più citotossine vengono indicati come "immunotossine". Una citotossina o un agente citotossico comprendono qualsiasi agente che sia dannoso per le cellule (per esempio le uccide).

Esempi di molecole partner della presente descrizione includono taxolo, citocalasina B, gramicidina D, bromuro di etidio, emetina, mitomicina, etoposide, teniposide, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, diidrossiantracindione, mitoxantrone, mitramicina, actinomicina D, 1-deidrotosterone, glucocorticoidi, procaina, tetracaina, lidocaina, propranololo, e puromicina e suoi analoghi o omologhi. Esempi di molecole partner includono anche, per esempio, antimetaboliti (per esempio metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil dacarbazina), agenti alchilanti (per esempio mecloretamina, tiotepa clorambucile, melfalan, carmustina (BSNU) e

lomustina (CCNU), ciclofosfamide, busulfano, dibromomannitolo, streptozotocina, mitomicina C, e cis-diclorodiammina platino(II) (DDP cisplatino), antracicline (per esempio daunorubicina (in passato daunomicina) e doxorubicina), antibiotici (per esempio dactinomomicina (in passato actinomomicina), bleomicina, mitramicina, ed antramicina (AMC)), ed agenti antimitotici (per esempio vincristina e vinblastina).

Altri esempi preferiti di molecole partner che possono essere coniugati ad un anticorpo dell'invenzione includono duocarmicine, calicheamicine, maitansine ed auristatine, e loro derivati. Un esempio di un anticorpo coniugato alla calicheamicina è disponibile in commercio (Mylotarg®; American Home Products).

Esempi preferiti di molecola partner sono CC-1065 e le duocarmicine. CC-1065 è stato isolato per la prima volta da *Streptomyces zelensis* nel 1981 dalla Upjohn Company (Hanka et al., *J. Antibiot.* 31:1211 (1978); Martin et al., *J. Antibiot.* 33: 902 (1980); Martin et al., *J. Antibiot.* 34: 1119 (1981)) ed è risultato avere potente attività antitumorale ed antimicrobica sia in vitro sia in animali da esperimento (Li et al., *Cancer Res.* 42: 999 (1982)). CC-1065 si lega a B-DNA a doppio filamento all'interno della scanalatura minore (Swenson et al., *Cancer Res.* 42: 2821 (1982)) con la preferenza di sequenza di 5'-d(A/GNTTA)-3' e 5'-d(AAAAA)-3' ed alchila la posizione N3 della 3'-adenina mediante la sua unità CPI di sinistra presente nella molecola (Hurley et al., *Science* 226: 843 (1984)).

Nonostante la sua attività antitumorale potente ed ampia, CC-1065 non può essere utilizzato nell'uomo poiché esso causa morte

ritardata in animali da esperimento. Molti analoghi e derivati di CC-1065 e le duocarmicine sono noti nell'arte. La ricerca nella struttura, nella sintesi e nelle proprietà di molti dei composti è stata esaminata. Si vedano, per esempio, Boger et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 35: 1438 (1996); e Boger et al., *Chem. Rev.* 97: 787 (1997). Un gruppo a Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. ha preparato un certo numero di derivati di CC-1065. Si vedano, per esempio, il brevetto US 5,101,038, 5,641,780, 5,187,186, 5,070,092, 5,703,080, 5,070,092, 5,641,780, 5,101,038, e 5,084,468, e la domanda PCT pubblicata, WO 96/10405 e la domanda europea pubblicata 0 537 575 A1. La Upjohn Company (Farmacia Upjohn) è anche stata attiva nel preparare derivati di CC-1065. Si vedano, per esempio, il brevetto US 5,739,350, 4,978,757, 5,332, 837 e 4,912,227.

Proprietà fisiche anticorpali

Gli anticorpi della presente invenzione possono essere ulteriormente caratterizzati dalle varie proprietà fisiche degli anticorpi anti-BST1. Possono essere utilizzati vari saggi per rilevare e/o differenziare classi differenti di anticorpi basati su queste proprietà fisiche.

In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi della presente invenzione possono contenere uno o più siti di glicosilazione nella regione variabile delle catene leggera o pesante. La presenza di uno o più siti di glicosilazione nella regione variabile può portare a immunogenicità aumentata dell'anticorpo o ad un'alterazione della pK dell'anticorpo a causa di legame all'antigene alterato [Marshall *et al.* (1972) *Annu Rev Biochem* 41:673-702; Gala FA e Morrison SL (2004) *J. Immunol.* 172:5489-94; Wallick *et al.* (1988) *J Exp Med* 168:1099-109; Spiro RG

(2002) *Glycobiology* 12:43R-56R; Parekh *et al.* (1985) *Nature* 316:452-7; Mimura *et al.* (2000) *Mol Immunol* 37:697-706]. È noto che la glicosilazione avviene in motivi strutturali contenenti una sequenza N-X-S/T. La glicosilazione della regione variabile può essere testata utilizzando un saggio glicoblot, che scinde l'anticorpo per produrre un Fab, e quindi effettua un test per la glicosilazione utilizzando un saggio che misura l'ossidazione di periodato e la formazione di una base di Schiff. In alternativa, la glicosilazione della regione variabile può essere testata utilizzando cromatografia Dionex leggera (Dionex-LC), che scinde i saccaridi da un Fab in monosaccaridi ed analizza il contenuto di singoli saccaridi. In alcuni esempi, si preferisce avere un anticorpo anti-BST1 che non contenga glicosilazione della regione variabile. Questo può essere ottenuto selezionando anticorpi non contenenti il motivo strutturale di glicosilazione nella regione variabile o mutando residui all'interno del motivo strutturale di glicosilazione utilizzando tecniche standard ben note nell'arte.

In una forma di realizzazione preferita, gli anticorpi della presente invenzione non contengono siti di isomeria dell'asparagina. Una deammidazione oppure un effetto con acido isoaspartico può avvenire sulle sequenze N-G o D-G, rispettivamente. La deammidazione oppure l'effetto con l'acido isoaspartico risultano nella creazione di acido isoaspartico che riduce la stabilità di un anticorpo creando una struttura piegata fuori dal carbossiterminale della catena laterale piuttosto che alla catena principale. La creazione di acido isoaspartico può essere misurata

utilizzando un saggio iso-quant, che utilizza un'HPLC a fase inversa per effettuare un test per l'acido isoaspartico.

Ciascun anticorpo avrà un punto isoelettrico (pI) unico, ma in generale gli anticorpi rientreranno nell'intervallo di pH tra 6 e 9,5. Il pI per un anticorpo IgG1 tipicamente rientra nell'intervallo di pH di 7-9,5 ed il pI per un anticorpo IgG4 tipicamente rientra nell'intervallo di pH di 6-8. Gli anticorpi possono avere un pI che è all'esterno di questo intervallo. Sebbene gli effetti siano in generale non noti, vi è speculazione che gli anticorpi con un pI al di fuori dell'intervallo normale possono avere un certo dispiegamento ed instabilità in condizioni *in vivo*. Il punto isoelettrico può essere testato utilizzando un saggio di focalizzazione isoelettrica capillare, che crea un gradiente di pH e può utilizzare la focalizzazione laser per un'aumentata accuratezza [Janini et al. (2002) *Electrophoresis* 23:1605-11; Ma et al. (2001) *Chromatographia* 53:S75-89; Hunt et al. (1998) *J Chromatogr A* 800:355-67]. In alcuni esempi, si preferisce avere un anticorpo anti-BST1 che contiene un valore di pI che rientra nell'intervallo normale. Questo può essere ottenuto selezionando anticorpi con un pI nell'intervallo normale, o mutando residui di superficie carichi utilizzando tecniche standard ben note nell'arte.

Ciascun anticorpo avrà una temperatura di fusione che è indicativa di stabilità termica [Krishnamurthy R. e Manning M.C. (2002) *Curr Pharm Biotechnol.* 3:361-71]. Una stabilità termica superiore indica maggiore stabilità anticorpale complessiva *in vivo*. Il punto di fusione di un anticorpo può essere misurato utilizzando tecniche quali calorimetria differenziale a scansione [Chen et al. (2003) *Pharm Res* 20:1952-60;

Ghirlando *et al.* (1999) *Immunol Lett* 68:47-52]. T_{M1} indica la temperatura del dispiegamento iniziale dell'anticorpo. T_{M2} indica la temperatura del dispiegamento completo dell'anticorpo. Generalmente, si preferisce che la T_{M1} di un anticorpo della presente invenzione sia superiore a 60°C, preferibilmente superiore a 65°C, ancora più preferibilmente superiore a 70°C. In alternativa, la stabilità termica di un anticorpo può essere misurata utilizzando dicroismo circolare [Murray *et al.* (2002) *J. Chromatogr Sci* 40:343-9].

In una forma di realizzazione preferita, vengono scelti anticorpi che non si degradano rapidamente. La frammentazione di un anticorpo anti-BST1 può essere misurata utilizzando elettroforesi capillare (EC) e MALDI-MS, com'è ben inteso nell'arte [Alexander AJ e Hughes DE (1995) *Anal. Chem.* 67:3626-32].

In un'altra forma di realizzazione preferita, vengono scelti anticorpi che hanno effetti di aggregazione minimi. L'aggregazione può condurre all'innescò di una risposta immunitaria indesiderata e/o a proprietà farmacocinetiche alterate o sfavorevoli. Generalmente, sono accettabili anticorpi con aggregazione del 25% o inferiore, preferibilmente del 20% o inferiore, ancora più preferibilmente del 15% o inferiore, ancora più preferibilmente del 10% o inferiore ed ancora più preferibilmente del 5% o inferiore. L'aggregazione può essere misurata mediante diverse tecniche ben note nell'arte, comprese cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) con colonna ad esclusione dimensionale (SEC), e diffusione della luce per identificare monomeri, dimeri, trimeri o multimeri.

Metodi per ingegnerizzare gli anticorpi

Come discusso sopra, gli anticorpi anti-BST1 aventi sequenze di V_H e V_K qui descritte possono essere utilizzati per creare nuovi anticorpi anti-BST1 modificando le sequenze di V_H e/o V_K , o la/e regione/i costante/i attaccata/e a questa. Così, in un altro esempio, le caratteristiche strutturali di un anticorpo anti-BST1 della descrizione, per esempio BST1_A2, BST1_A1 o BST1_A3, vengono utilizzate per creare anticorpi anti-BST1 strutturalmente correlati che mantengono almeno una proprietà funzionale degli anticorpi dell'invenzione, quali legame al BST1 umano. Per esempio, una o più regioni CDR di BST1_A2, BST1_A1 o BST1_A3, o loro mutazioni, possono essere combinate per via ricombinante con regioni cornice note e/o con altre CDR per creare ulteriori anticorpi anti-BST1 ingegnerizzati per via ricombinante della descrizione, come discusso sopra. Altri tipi di modifiche includono quelle descritte nella sezione precedente. Il materiale di partenza per il metodo di ingegneria è una o più delle sequenze di V_H e/o V_K qui fornite, o una o più loro regioni CDR. Per creare l'anticorpo ingegnerizzato, non è necessario preparare effettivamente (cioè farlo esprimere come proteina) un anticorpo avente una o più delle sequenze di V_H e/o V_K qui fornite, o una o più loro regioni CDR. Piuttosto, le informazioni contenute nella/e sequenza/e vengono utilizzate come materiale di partenza per creare una sequenza/e di "seconda generazione" derivata/e dalla/e sequenza/e originale/i e quindi la/e sequenza/e di "seconda generazione" viene/vengono preparata/e ed espressa/e come proteina.

Conseguentemente, in un altro esempio, la descrizione fornisce un metodo per preparare un anticorpo anti-BST1 comprendente: fornire:

(i) una sequenza dell'anticorpo della regione variabile della catena pesante comprendente una sequenza CDR1 scelta nel gruppo composto dalle SEQ ID NO: 10, 9 e 56, una sequenza CDR2 scelta nel gruppo composto dalle SEQ ID NO:12 o 51, 11 e 57, e/o una sequenza CDR3 scelta nel gruppo composto dalle SEQ ID NO:14, 13 e 58; e/o (ii) una sequenza dell'anticorpo della regione variabile della catena leggera comprendente una sequenza CDR1 scelta nel gruppo composto dalle SEQ ID NO:16, 15 e 59, una sequenza CDR2 scelta nel gruppo composto dalle SEQ ID NO:18, 17 e 60 e/o una sequenza CDR3 scelta nel gruppo composto dalla SEQ ID NO: 20, 19 e 61, alterando almeno un residuo amminoacidico all'interno della sequenza dell'anticorpo della regione variabile della catena pesante e/o la sequenza dell'anticorpo della regione variabile della catena leggera per creare almeno una sequenza anticorpale modificata; ed esprimere la sequenza anticorpale modificata come proteina.

Tecniche di biologia molecolare standard possono essere utilizzate per preparare ed esprimere la sequenza anticorpale modificata.

Preferibilmente, l'anticorpo codificato dalla/e sequenza/e anticorpale/i modificata/e è uno che mantiene una, alcune o tutte le proprietà funzionali degli anticorpi anti-BST1 qui descritti, le quali proprietà funzionali includono, ma senza limitazione: (a) si lega al BST1 umano con una K_D di 1×10^{-7} M o inferiore; (b) si lega alle cellule CHO umane trasfettate con il BST1.

Le proprietà funzionali degli anticorpi modificati possono essere valutate utilizzando saggi standard disponibili nell'arte e/o descritti qui,

come quelli esposti negli Esempi (per esempio citometria a flusso, saggi di legame).

In certi esempi dei metodi per ingegnerizzare gli anticorpi della descrizione, mutazioni possono essere introdotte casualmente o selettivamente lungo tutta o parte di una sequenza codificante anticorpi anti-BST1 ed i risultanti anticorpi anti-BST1 modificati possono essere sottoposti a screening per l'attività di legame e/o per altre proprietà funzionali come qui descritto. Metodi mutazionali sono stati descritti nell'arte. Per esempio, la pubblicazione PCT WO 02/092780 descrive metodi per creare e selezionare mutazioni anticorpali utilizzando mutagenesi per saturazione, assemblaggio di ligazione sintetico, o una loro combinazione. In alternativa, la pubblicazione PCT WO 03/074679 descrive metodi per utilizzare metodi di screening computazionali per ottimizzare le proprietà chimico-fisiche degli anticorpi.

Molecole di acido nucleico codificanti anticorpi dell'invenzione

Un altro aspetto dell'invenzione si riferisce a molecole di acido nucleico che codificano gli anticorpi dell'invenzione. Gli acidi nucleici possono essere presenti in cellule intere, in un lisato cellulare, o in una forma parzialmente purificata o sostanzialmente pura. Un acido nucleico è "isolato" o "reso sostanzialmente puro" quando purificato da altri componenti cellulari o altri contaminanti, per esempio altri acidi nucleici o proteine cellulari, mediante tecniche standard, compresi trattamento alcalino/con SDS, bandeggio con CsCl, cromatografia su colonna, elettroforesi su gel di agarosio ed altri ben noti nell'arte. Si veda, Current Protocols in Molecular Biology (1987), a cura di F. Ausubel, *et al.*, Greene

Publishing e Wiley Interscience, N. Y. Un acido nucleico dell'invenzione può essere, per esempio, DNA o RNA e può o non può contenere sequenze introniche. In una forma di realizzazione preferita, l'acido nucleico è una molecola di cDNA.

Acidi nucleici dell'invenzione possono essere ottenuti utilizzando tecniche di biologia molecolare standard. Per gli anticorpi espressi da ibridomi, i cDNA codificanti le catene leggera e pesante dell'anticorpo prodotto dall'ibridoma possono essere ottenuti mediante amplificazione standard con la PCR o tecniche di clonaggio del cDNA. Per gli anticorpi ottenuti da una libreria genica immunoglobulinica (per esempio utilizzando tecniche di esposizione fagica), acidi nucleici codificanti l'anticorpo possono essere recuperati dalla libreria.

Molecole di acidi nucleici preferite della descrizione sono quelle codificanti le sequenze di V_H e di V_K degli anticorpi monoclonali BST1_A2, BST1_A1 o BST1_A3. Sequenze di DNA codificanti le sequenze di V_H di BST1_A2, BST1_A1 o BST1_A3 vengono mostrate nelle SEQ ID NO: 6, 5 e 54, rispettivamente. Sequenze di DNA codificanti le sequenze di V_K di BST1_A2, BST1_A1 o BST1_A3 vengono mostrate nelle SEQ ID NO: 8, 7 e 55, rispettivamente.

Altri acidi nucleici preferiti della descrizione sono acidi nucleici aventi almeno l'80% di identità di sequenza, come almeno l'85%, almeno il 90%, almeno il 95%, almeno il 98% o almeno il 99% di identità di sequenza, con una delle sequenze mostrate nelle SEQ ID NO: 6, 5, 8, 7, 54 e 55, i quali acidi nucleici codificano un anticorpo dell'invenzione, o una sua porzione legante l'antigene.

La percentuale di identità tra due sequenze di acidi nucleici è il numero delle posizioni nella sequenza in cui il nucleotide è identico, prendendo in considerazione il numero di interruzioni e la lunghezza di ciascuna interruzione, che devono essere introdotti per l'allineamento ottimale delle due sequenze. Il confronto delle sequenze e la determinazione della percentuale di identità tra due sequenze possono essere realizzati utilizzando un algoritmo matematico, quale l'algoritmo di Meyers e Miller o il programma XBLAST di Altschul descritto sopra.

Ancora inoltre, acidi nucleici preferiti della descrizione comprendono una o più porzioni codificanti le CDR delle sequenze di acidi nucleici mostrate nelle SEQ ID NO: 6, 5, 8, 7, 54 e 55. In questo esempio, l'acido nucleico può codificare la sequenza di CDR1, CDR2 e/o CDR3 della catena pesante e leggera di BST1_A2, BST1_A1 o BST1_A3.

Acidi nucleici che hanno almeno l'80%, come almeno l'85%, almeno il 90%, almeno il 95%, almeno il 98% o almeno il 99% di identità di sequenza, con una tale porzione codificante la CDR delle SEQ ID NO: 6, 5, 8, 7, 54 e 55 (sequenze di V_H e V_K) sono anche acidi nucleici preferiti della descrizione. Tali acidi nucleici possono differire dalla porzione corrispondente delle SEQ ID NO: 6, 5, 8, 7, 54 e 55 in una regione non codificante CDR e/o in una regione codificante la CDR. Dove la differenza è in una regione codificante la CDR, la regione CDR dell'acido nucleico codificata dall'acido nucleico comprende tipicamente una o più modifiche conservative di sequenza come definito qui rispetto alla corrispondente sequenza della CDR di BST1_A2, BST1_A1 o BST1_A3.

Una volta che vengono ottenuti frammenti di DNA codificanti segmenti V_H e V_K , questi frammenti di DNA possono essere ulteriormente manipolati mediante tecniche del DNA ricombinante standard, per esempio, per convertire i geni per la regione variabile in geni della catena anticorpale a lunghezza intera, a geni di frammenti Fab, o ad un gene di scFv. In queste manipolazioni, un frammento di DNA codificante V_K o V_H è collegato operativamente ad un altro frammento di DNA codificante un'altra proteina, quale una regione costante anticorpale o un gruppo di collegamento flessibile. Il termine "legato operabilmente", come utilizzato in questo contesto, intende significare che i due frammenti di DNA sono uniti in modo tale che le sequenze amminoacidiche codificate dai due frammenti di DNA rimangano in fase di lettura.

Il DNA isolato codificante la regione V_H può essere convertito in un gene a lunghezza intera della catena pesante legando operabilmente il DNA codificante V_H ad un'altra molecola di DNA codificante regioni costanti della catena pesante (C_H1 , C_H2 e C_H3). Le sequenze di geni murini della regione costante della catena pesante sono noti nell'arte [si veda per esempio Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequence of proteins of immunological interest, quinta edizione, Dipartimento della Salute e dei Servizi Umani degli Stati Uniti, pubblicazione NIH No. 91-3242] e frammenti di DNA comprendenti queste regioni possono essere ottenuti mediante amplificazione standard mediante PCR. La regione costante della catena pesante può essere una regione costante di IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, ma il più preferibilmente è una regione costante di IgG1 o IgG4. Per un gene della catena pesante del frammento

Fab, il DNA codificante V_H può essere legato operativamente ad un'altra molecola di DNA codificante solo la regione costante C_{H1} della catena pesante.

Il DNA isolato codificante la regione V_L/V_K può essere convertito in un gene della catena leggera a lunghezza intera (così come un gene della catena leggera di Fab) legando operabilmente il DNA codificante V_L ad un'altra molecola di DNA codificante la regione costante della catena leggera, C_L . Le sequenze di geni murini della regione costante della catena leggera sono note nell'arte [si veda, per esempio Kabat, E. A., *et al.* (1991) *Sequence of proteins of immunological interest*, quinta edizione, Dipartimento della Salute e dei Servizi Umani degli Stati Uniti, pubblicazione NIH No. 91-3242] e frammenti di DNA comprendenti queste regioni possono essere ottenuti mediante amplificazione standard mediante PCR. In forme di realizzazione preferite, la regione costante della catena leggera può essere una regione costante kappa o lambda.

Per creare un gene di scFv, i frammenti codificanti V_H e V_L/V_K di DNA sono legati operabilmente ad un altro frammento codificante un gruppo di collegamento flessibile, per esempio codificante la sequenza amminoacidica $(Gly_4-Ser)_3$, in modo tale che le sequenze di V_H e V_L/V_K possano essere espresse come proteina contigua a catena singola, con le regioni V_L/V_K e V_H unite dal gruppo di collegamento flessibile [si vedano per esempio Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty *et al.*, (1990) *Nature* 348:552-554].

Produzione di anticorpi monoclonali

Secondo l'invenzione il BST1 o un suo frammento o un suo derivato possono essere utilizzati come immunogeno per generare anticorpi che si legano immunospecificamente ad un tale immunogeno. Tali immunogeni possono essere isolati mediante qualsiasi mezzo conveniente. Un esperto nell'arte riconoscerà che molte procedure sono disponibili per la produzione di anticorpi, per esempio, come descritto in *Antibodies, A Laboratory Manual*, Ed Harlow e David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988), Cold Spring Harbor, New York. Un esperto nell'arte comprenderà anche che frammenti leganti o frammenti Fab che mimano anticorpi possono anche essere preparati da informazioni genetiche mediante varie procedure [*Antibody Engineering: A Practical Approach* (a cura di Borrebaeck, C.), 1995, Oxford University Press, Oxford; *J. Immunol.* 149, 3914-3920 (1992)].

In un esempio, vengono prodotti anticorpi nei confronti di un dominio specifico del BST1. In un esempio specifico, vengono utilizzati frammenti idrofilici del BST1 come immunogeni per la produzione di anticorpi.

Nella produzione di anticorpi, lo screening per l'anticorpo desiderato può essere realizzato mediante tecniche note nell'arte, per esempio ELISA (dosaggio immunoenzimatico). Per esempio, per selezionare anticorpi che riconoscono un dominio specifico del BST1, si può sottoporre a saggio ibridomi generati per un prodotto che si lega ad un frammento di BST1 contenente un tale dominio. Per la selezione di un anticorpo che si lega specificamente ad un primo omologo di BST1 ma che non si lega specificamente (o si lega meno avidamente) ad un

secondo omologo di BST1, si può effettuare una selezione sulla base di un legame positivo al primo omologo di BST1 e di una mancanza di legame (o legame ridotto) al secondo omologo di BST1. In modo simile, per la selezione di un anticorpo che si lega specificamente al BST1 ma che non si lega specificamente (o si lega meno avidamente) a un'isoforma differente della stessa proteina (quale una glicofoma differente avente lo stesso peptide del core del BST1), si può effettuare una selezione sulla base del legame positivo al BST1 e di una mancanza di legame (o legame ridotto) all'isoforma differente (per esempio una glicofoma differente). Così, la presente descrizione fornisce un anticorpo (quale un anticorpo monoclonale) che si lega con affinità maggiore (per esempio un'affinità maggiore di almeno 2 volte, quale almeno 5 volte, in particolare almeno 10 volte) al BST1 rispetto ad un'isoforma o a isoforme differenti (per esempio glicofome) del BST1.

Anticorpi policlonali che possono essere utilizzati nei metodi della descrizione sono popolazioni eterogenee di molecole anticorpali derivate dai sieri di animali immunizzati. Può anche essere utilizzato del siero immune non frazionato. Varie procedure note nell'arte possono essere utilizzate per la produzione di anticorpi policlonali per il BST1, di un frammento del BST1, di un polipeptide correlato a BST1, o di un frammento di un polipeptide correlato a BST1. Per esempio, un modo consiste nel purificare polipeptidi d'interesse o nel sintetizzare i polipeptidi d'interesse utilizzando, per esempio metodi di sintesi peptidica in fase solida ben noti nell'arte. Si vedano, per esempio *Guide to protein purification*, a cura di Murray P. Deutcher, *Meth. Enzymol.* Vol 182 (1990);

Solid Phase Peptide Synthesis, a cura Greg B. Fields, *Meth. Enzymol.* Vol 289 (1997); Kiso *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo) 38: 1192-99, 1990; Mostafavi *et al.*, *Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids* 1: 255-60, 1995; Fujiwara *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo) 44: 1326-31, 1996. I polipeptidi scelti possono quindi essere utilizzati per immunizzare mediante iniezione vari animali ospiti, compresi, ma senza limitazione, conigli, topi, ratti, ecc., per generare anticorpi policlonali o monoclonali. Vari adiuvanti (cioè immunostimolanti) possono essere utilizzati per aumentare la risposta immunologica, in relazione alla specie ospite, compresi, ma senza limitazione, adiuvante di Freund completo o incompleto, un gel minerale quale idrossido di alluminio, agente tensioattivo quale lisolecitina, poliolo Pluronic, un polianione, un peptide, un'emulsione oleosa, emocianina di patella, dinitrofenolo, ed un adiuvante quale BCG (bacillo di Calmette-Guerin) o *Corynebacterium parvum*. Ulteriori adiuvanti sono anche ben noti nell'arte.

Per la preparazione di anticorpi monoclonali (mAb) diretti verso il BST1, può essere utilizzata qualsiasi tecnica che permette la produzione di molecole anticorpali mediante linee cellulari continue in coltura. Per esempio, la tecnica degli ibridomi sviluppata originariamente da Kohler e Milstein (1975, *Nature* 256:495-497), così come la tecnica del trioma, la tecnica degli ibridomi con i linfociti B umani [Kozbor *et al.* (1983) *Immunology Today* 4:72], e la tecnica degli ibridomi-EBV per produrre anticorpi monoclonali umani [Cole *et al.* (1985) in *Monoclonal antibodies and cancer therapy*, Alan R. Liss, Inc., pag. 77-96]. Tali anticorpi possono essere di qualsiasi classe di immunoglobuline comprese IgG, IgM, IgE,

IgA, IgD e qualsiasi loro sottoclasse. L'ibridoma che produce gli anticorpi monoclonali possono essere sottoposti a coltura *in vitro* o *in vivo*. In un'ulteriore forma di realizzazione dell'invenzione, anticorpi monoclonali possono essere prodotti in animali privi di germi utilizzando una tecnologia nota (PCT/US90/02545).

Il sistema animale preferito per preparare ibridomi è il sistema murino. La produzione di ibridomi nel topo è una procedura molto ben stabilita. Protocolli di immunizzazione e tecniche per l'isolamento di splenociti immunizzati per la fusione sono noti nell'arte. Sono noti anche partner di fusione (per esempio cellule murine di mieloma) e procedure di fusione.

Gli anticorpi monoclonali includono, ma senza limitazione, anticorpi monoclonali umani ed anticorpi monoclonali chimerici (per esempio chimere uomo-topo).

Anticorpi chimerici o umanizzati della presente invenzione possono essere preparati in base alla sequenza di un anticorpo monoclonale non umano preparato come descritto sopra. Il DNA codificante le immunoglobuline della catena pesante e leggera può essere ottenuto dall'ibridoma non umano d'interesse e modificato geneticamente per contenere sequenze dell'immunoglobulina non murine (per esempio umane) utilizzando tecniche di biologia molecolare standard. Per esempio, per creare un anticorpo chimerico, regioni variabili murine possono essere legate a regioni costanti umane utilizzando metodi noti nell'arte (si veda, per esempio, il brevetto US 4,816,567 a Cabilly *et al.*). Per creare un anticorpo umanizzato, regioni CDR murine possono essere inserite in una

cornice umana utilizzando metodi noti nell'arte (si vedano, per esempio, il brevetto US 5,225,539 a Winter, ed i brevetti US 5,530,101, 5,585,089, 5,693,762 e 6,180,370 a Queen *et al.*).

Anticorpi completamente umani possono essere prodotti utilizzando topi transgenici o transcromosomici che non sono in grado di esprimere geni delle catene pesanti e leggere dell'immunoglobulina endogeni, ma che possono esprimere geni umani della catena pesante e leggera. I topi transgenici vengono immunizzati nel modo normale con un antigene scelto, per esempio tutta o una porzione del BST1. Gli anticorpi monoclonali diretti contro l'antigene possono essere ottenuti utilizzando la tecnologia convenzionale dell'ibridoma. I transgeni immunoglobulinici umani ospitati nei topi transgenici si riarrangiano durante la differenziazione dei linfociti B, e successivamente subiscono un cambiamento di classe ed una mutazione somatica. Così, utilizzando tale tecnica, è possibile produrre anticorpi IgG, IgA, IgM ed IgE terapeuticamente utili. Questi topi transgenici e transcromosomici includono topi dei ceppi HuMAb Mouse[®] (Medarex[®], Inc.) e KM Mouse[®]. Il ceppo HuMAb Mouse[®] (Medarex[®], Inc.) viene descritto in Lonberg e Huszar (1995, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93). Per una discussione dettagliata di questa tecnologia per produrre anticorpi umani ed anticorpi monoclonali umani ed i protocolli per produrre tali anticorpi, si vedano, per esempio il brevetto US 5,625,126, il brevetto US 5,633,425, il brevetto US 5,569,825, il brevetto US 5,661,016, ed il brevetto US 5,545,806. Il ceppo KM Mouse[®] si riferisce ad un topo che porta un transgene della catena pesante umana ed un transcromosoma della catena leggera umana e

viene descritto in dettaglio nella pubblicazione PCT WO 02/43478 a Ishida *et al.*

Ancora inoltre, sistemi di animali transgenici alternativi esprimenti geni immunoglobulinici umani sono disponibili nell'arte e possono essere utilizzati per generare anticorpi anti-BST1 dell'invenzione. Per esempio, può essere utilizzato un sistema transgenico alternativo indicato come Xenomouse (Amgen, Inc.); tali topi vengono descritti, per esempio, nei brevetti US 5,939,598, 6,075,181, 6,114,598, 6,150,584 e 6,162,963 a Kucherlapati *et al.*

Anticorpi completamente umani che riconoscono un epitopo scelto possono essere generati utilizzando una tecnica indicata come "selezione guidata". In questo approccio un anticorpo monoclonale non umano scelto, per esempio un anticorpo di topo, viene utilizzato per guidare la selezione di un anticorpo completamente umano riconoscente lo stesso epitopo [Jespers *et al.* (1994) *Biotechnology* 12:899-903].

Inoltre, sistemi di animali transcromosomici alternativi esprimenti geni immunoglobulinici umani sono disponibili nell'arte e possono essere utilizzati per generare anticorpi anti-BST1. Per esempio, topi recanti sia un transcromosoma della catena pesante umana sia un transcromosoma della catena leggera umana, indicati come "topi TC" possono essere utilizzati; tali topi vengono descritti in Tomizuka *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727. Inoltre, mucche recanti transcromosomi delle catene pesanti e leggere umane sono state descritte nell'arte [Kuroiwa *et al.* (2002) *Nature Biotechnology* 20:889-894] e nella pubblicazione PCT

WO 2002/092812 e possono essere utilizzate per generare anticorpi anti-BST1.

Anticorpi monoclonali umani dell'invenzione possono anche essere preparati utilizzando topi con SCID in cui le cellule immunitarie umane sono state ricostituite in modo tale che si possa generare una risposta anticorpale umana in seguito all'immunizzazione. Tali topi vengono descritti, per esempio, nei brevetti US 5,476,994 e 3,698,767.

Gli anticorpi della presente invenzione possono essere generati mediante l'uso della tecnologia dell'esposizione fagica per produrre e sottoporre a screening librerie di polipeptidi per legarsi ad un bersaglio scelto [si veda, per esempio Cwirla *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6378-82, 1990; Devlin *et al.*, *Science* 249, 404-6, 1990, Scott e Smith, *Science* 249, 386-88, 1990; e Ladner *et al.*, brevetto US 5,571,698]. Un concetto di base di metodi di esposizione fagica è la costituzione di un'associazione fisica tra il DNA codificante un polipeptide da sottoporre a screening ed il polipeptide. Questa associazione fisica viene fornita dalla particella fagica, che mostra un polipeptide come parte di un capsido che racchiude il genoma fagico che codifica il polipeptide. La costituzione di un'associazione fisica tra polipeptidi ed il loro materiale genetico permette lo screening simultaneo di massa di numeri molto grandi di fagi recante polipeptidi differenti. Fagi mostranti un polipeptide con affinità ad un bersaglio si legano al bersaglio e questi fagi sono arricchiti mediante selezione di affinità al bersaglio. L'identità di polipeptidi mostrati da questi fagi può essere determinata dai loro rispettivi genomi. Utilizzando questi metodi un polipeptide identificato come avente un'affinità di legame per un

bersaglio desiderato può quindi essere sintetizzato in bulk mediante mezzi convenzionali. Si veda, per esempio il brevetto US 6,057,098. In particolare, tale fago può essere utilizzato per mostrare domini di legame all'antigene espressi da un repertorio o da una libreria combinatoriale di anticorpi (per esempio umani o murini). Il fago esprime un dominio di legame all'antigene che si lega all'antigene d'interesse può essere selezionato o identificato con l'antigene, per esempio utilizzando l'antigene marcato o l'antigene legato o catturato ad una superficie o sfera solida. I fagi utilizzati in questi metodi sono tipicamente fagi filamentosi comprendenti domini di legame a fd e M13 espressi da fagi con domini anticorpali Fab, Fv o Fv stabilizzati con disolfuro fusi per via ricombinante alla proteina del gene III o del gene VIII del fago. Metodi di esposizione fagica che possono essere utilizzati per preparare gli anticorpi della presente invenzione comprendono quelli descritti in Brinkman *et al.* (1995) *J. Immunol. Methods* 182:41-50; Ames *et al.* (1995) *J. Immunol. Methods* 184:177-186; Kettleborough *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 24:952-958 (1994); Persic *et al.* (1997) *Gene* 187 9-18; Burton *et al.* (1994) *Advances in Immunology* 57:191-280; domanda PCT PCT/GB91/01134; pubblicazioni PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; ed i brevetti US 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743 e 5,969,108.

Come descritto nei suddetti riferimenti, dopo selezione del fago, le regioni codificanti l'anticorpo dal fago possono essere isolate ed utilizzate

per generare anticorpi interi, compresi anticorpi umani, o qualsiasi altro frammento legante l'antigene desiderato, ed espresse in qualsiasi ospite desiderato, comprese cellule di mammifero, cellule di insetto, cellule vegetali, lievito, e batteri, per esempio come descritto sotto in dettaglio. Per esempio, tecniche per produrre in via ricombinante frammenti Fab, Fab' e F(ab')₂ possono essere impiegate anche utilizzando metodi noti nell'arte come quelli descritti nella pubblicazione PCT WO 92/22324; Mullinax *et al.* (1992) *BioTechniques* 12(6):864-869; e Sawai *et al.* (1995) *AJRI* 34:26-34; e Better *et al.* (1988) *Science* 240:1041-1043.

Esempi di tecniche che possono essere utilizzate per produrre Fv a catena singola ed anticorpi includono quelle descritte nei brevetti US 4,946,778 e 5,258,498; Huston *et al.* (1991), *Methods in Enzymology* 203:46-88; Shu *et al.* (1993) *PNAS* 90:7995-7999; e Skerra *et al.* (1988) *Science* 240:1038-1040.

L'invenzione fornisce frammenti, derivati o analoghi funzionalmente attivi delle molecole immunoglobuliniche anti-BST1. Funzionalmente attivo significa che il frammento, il derivato o l'analogo sono in grado di stimolare anticorpi anti-anti-idiotipo (cioè anticorpi terziari) che riconoscono lo stesso antigene che è riconosciuto dall'anticorpo da cui il frammento, il derivato o l'analogo sono derivati. Specificamente, in una forma di realizzazione particolare l'antigenicità dell'idiotipo della molecola di immunoglobulina può essere aumentata dalla delezione della cornice e di sequenze delle CDR che sono C-terminali rispetto alla sequenza della CDR che riconosce specificamente l'antigene. Per determinare quali sequenze delle CDR legano l'antigene, peptidi sintetici

contenenti le sequenze delle CDR possono essere utilizzati in saggi di legame con l'antigene mediante qualsiasi metodo di saggio di legame noto nell'arte.

La presente invenzione fornisce frammenti anticorpali quali, ma senza limitazione, frammenti $F(ab')_2$ e frammenti Fab. Frammenti anticorpali che riconoscono epitopi specifici possono essere generati mediante tecniche note. I frammenti $F(ab')_2$ consistono della regione variabile, della regione costante della catena leggera e del dominio C_{H1} della catena pesante e sono generati mediante digestione con pepsina della molecola anticorpale. I frammenti Fab sono generati riducendo i ponti disolfuro dei frammenti $F(ab')_2$. L'invenzione fornisce anche dimeri della catena pesante e leggera degli anticorpi dell'invenzione, o qualsiasi suo frammento minimo quale Fv o anticorpi a catena singola (SCA) [per esempio come descritto nel brevetto US 4,946,778; Bird, (1988) *Science* 242:423-42; Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; e Ward *et al.* (1989) *Nature* 334:544-5], o qualsiasi altra molecola con la stessa specificità dell'anticorpo dell'invenzione. Gli anticorpi a catena singola vengono formati legando i frammenti delle catene pesanti e leggere della regione Fv attraverso un ponte amminoacidico, risultando in una catena polipeptidica singola. Possono essere utilizzate le tecniche per l'assemblaggio di frammenti Fv funzionali in *E. coli* [Skerra *et al.* (1988) *Science* 242:1038-1041].

In altri esempi, la descrizione fornisce proteine di fusione delle immunoglobuline dell'invenzione (o loro frammenti funzionalmente attivi), per esempio in cui l'immunoglobulina è fusa attraverso un legame

covalente (per esempio un legame peptidico), al dominio N-terminale o C-terminale ad una sequenza amminoacidica di un'altra proteina (o di una sua porzione, preferibilmente una porzione almeno di 10, di 20 o di 50 amminoacidi della proteina) che non è l'immunoglobulina. Preferibilmente l'immunoglobulina, o un suo frammento, è legata covalentemente all'altra proteina al dominio dell'estremità N-terminale del dominio costante. Come specificato sopra, tali proteine di fusione possono facilitare la purificazione, incrementano l'emivita *in vivo*, ed aumentano il rilascio di un antigene attraverso una barriera epiteliale al sistema immunitario.

Le immunoglobuline dell'invenzione includono analoghi e derivati che sono modificati, cioè mediante l'attacco covalente di molecole di qualsiasi tipo finché tale unione covalente non danneggia il legame immunospecifico. Per esempio, ma senza limitazione, i derivati ed gli analoghi delle immunoglobuline includono quelli che sono stati modificati ulteriormente, per esempio mediante glicosilazione, acetilazione, PEGilazione, fosforilazione, ammidazione, derivatizzazione mediante gruppi protettori/bloccanti noti, scissione proteolitica, legame ad un ligando cellulare o ad un'altra proteina, ecc. Qualsiasi di numerose modifiche chimiche può essere realizzata mediante tecniche note, compresi, ma senza limitazione scissione chimica specifica, acetilazione, formilazione, ecc. Inoltre, l'analogo o il derivato possono contenere uno o più amminoacidi non classici.

Immunizzazione di topi

I topi possono essere immunizzati con una preparazione purificata o arricchita dell'antigene BST1 e/o BST1 ricombinante, o cellule

esprimenti BST1. Preferibilmente, i topi avranno 6-16 settimane di età al momento della prima infusione. Per esempio, una preparazione purificata o ricombinante (100 µg) dell'antigene BST1 può essere utilizzata per immunizzare i topi per via intraperitoneale.

L'esperienza cumulativa con vari antigeni ha mostrato che i topi rispondono quando immunizzati per via intraperitoneale (IP) con l'antigene in adiuvante completo di Freund. Tuttavia, è stato trovato che adiuvanti diversi da quello di Freund sono anche efficaci. Inoltre, si trova che le cellule intere in assenza di adiuvante sono altamente immunogeniche. La risposta immunitaria può essere monitorata nel corso del protocollo di immunizzazione, i campioni di plasma essendo ottenuti mediante prelievi retroorbitali. Il plasma può essere sottoposto ad analisi mediante ELISA (come descritto sotto) per testare titoli soddisfacenti. I topi possono essere stimolati per via endovenosa con l'antigene in 3 giorni consecutivi avvenendo il sacrificio e la rimozione della milza 5 giorni dopo. In una forma di realizzazione, possono essere utilizzati ceppi di topi A/J (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine).

Generazione di trasfettomi produttori anticorpi monoclonali

Gli anticorpi dell'invenzione possono essere prodotti in un trasfettoma cellulare ospite utilizzando, per esempio, una combinazione di tecniche del DNA ricombinante e metodi di trasfezione genica com'è ben noto nell'arte [per esempio Morrison, S. (1985) *Science* 229:1202].

Per esempio, per esprimere gli anticorpi, o loro frammenti anticorpali, i DNA codificanti catene leggere e pesanti parziali o a lunghezza intera, possono essere ottenuti mediante tecniche di biologia

molecolare standard (per esempio amplificazione mediante PCR o clonaggio del cDNA utilizzando un ibridoma che esprime l'anticorpo d'interesse) ed il DNA può essere inserito in vettori di espressione in modo tale che i geni siano legati operabilmente a sequenze di controllo trascrizionale e traduzionale. In questo contesto, il termine "operativamente legato" intende significare che un gene di un anticorpo è legato in un vettore in modo tale che sequenze di controllo trascrizionale e traduzionale all'interno del vettore svolgano la loro funzione desiderata di regolare la trascrizione e la traduzione del gene di un anticorpo. Il vettore di espressione e sequenze di controllo dell'espressione vengono scelti per essere compatibili con la cellula ospite di espressione utilizzata.

La cellula ospite può essere cotrasfettata con due vettori di espressione dell'invenzione, il primo vettore codificando un polipeptide derivato dalla catena pesante ed il secondo vettore codificando un polipeptide derivato dalla catena leggera. I due vettori possono contenere marcatori selezionabili identici che permettono uguale espressione dei polipeptidi della catena pesante e leggera. In alternativa, può essere utilizzato un singolo vettore che codifica polipeptidi sia della catena pesante sia della catena leggera. In tali situazioni, la catena leggera dovrebbe essere posta davanti alla catena pesante per evitare un eccesso di catena pesante libera tossica [Proudfoot (1986) *Nature* 322:52; Kohler (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:2197]. Le sequenze codificanti per le catene pesanti e leggere possono comprendere cDNA o DNA genomico.

I geni anticorpali vengono inseriti nel vettore di espressione mediante metodi standard (per esempio ligazione di siti di restrizione

complementari sul frammento del gene anticorpale e sul vettore, o ligazione con estremità piatte se non sono presenti siti di restrizione). Le regioni variabili delle catene leggera e pesante degli anticorpi qui descritti possono essere utilizzate per creare geni di anticorpi a lunghezza intera di qualsiasi isotipo anticorpale inserendoli in vettori di espressione già codificanti regioni costanti della catena pesante e costanti della catena leggera dell'isotipo desiderato in modo tale che il segmento V_H sia collegato operativamente al/ai segmento/i C_H all'interno del vettore ed il segmento V_K è collegato operativamente al segmento C_L all'interno del vettore. In aggiunta o in alternativa, il vettore di espressione ricombinante può codificare un peptide segnale che facilita la secrezione della catena anticorpale da una cellula ospite. Il gene della catena anticorpale può essere clonato nel vettore in modo tale che il peptide segnale sia legato in fase al terminale amminico del gene della catena anticorpale. Il peptide segnale può essere un peptide segnale immunoglobulinico o un peptide segnale eterologo (cioè un peptide segnale da una proteina non immunoglobulinica).

Oltre ai geni della catena anticorpale, i vettori di espressione ricombinanti dell'invenzione trasportano sequenze regolatrici che controllano l'espressione dei geni della catena anticorpale in una cellula ospite. Il termine "sequenza di regolazione" intende includere promotori, potenziatori ed altri elementi di controllo dell'espressione (per esempio segnali di poliadenilazione) che controllano la trascrizione o la traduzione dei geni della catena anticorpale. Tali sequenze regolatrici sono descritte, per esempio, in Goeddel (Gene Expression Technology, *Methods in*

Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California (1990). Sarà compreso da parte di coloro che sono esperti nell'arte che la progettazione del vettore di espressione, compresa la selezione di sequenze regolatrici, può dipendere da fattori quali la scelta della cellula ospite da trasformare, il livello di espressione della proteina desiderata, ecc. Sequenze regolatrici preferite per l'espressione in cellule ospiti di mammifero includono elementi virali che dirigono livelli elevati di espressione della proteina in cellule di mammifero, quali promotori e/o potenziatori derivati da citomegalovirus (CMV), Simian Virus 40 (SV40), adenovirus (per esempio promotore tardivo maggiore adenovirale (AdMLP) e polioma). In alternativa, possono essere utilizzate sequenze regolatrici non virali, quali il promotore dell'ubiquitina o il promotore della β -globina. Ancora inoltre, elementi regolatori costituiti da sequenze da fonti differenti, quali il sistema promotoriale SR α , che contiene sequenze dal promotore precoce di SV40 e la ripetizione terminale lunga del virus della leucemia umana a linfociti T tipo 1 [Takebe, Y. *et al.* (1988) *Mol. Cell Biol.* 8:466-472].

Oltre ai geni della catena anticorpale e alle sequenze regolatrici, i vettori di espressione ricombinanti dell'invenzione possono trasportare ulteriori sequenze, quali sequenze che regolano la replicazione del vettore in cellule ospiti (per esempio origini di replicazione) e geni marcatori selezionabili. Il gene marcatore selezionabile facilita la selezione di cellule ospiti in cui il vettore è stato introdotto (si vedano, per esempio i brevetti US 4,399,216, 4,634,665 e 5,179,017, tutti di Axel *et al.*). Per esempio, tipicamente il gene marcatore selezionabile conferisce resistenza ai

farmaci, quali G418, igromicina o metotrexato, su una cellula ospite in cui il vettore è stato introdotto. Geni marcatori selezionabili preferiti includono il gene della diidrofolato reduttasi (DHFR) (per l'uso in cellule ospiti dhfr-con selezione/amplificazione con metotrexato) ed il gene neo (per la selezione con G418).

Per l'espressione delle catene leggere e pesanti, il/i vettore/i di espressione codificante/i le catene pesanti e leggere viene/vengono trasfettato/i in una cellula ospite mediante tecniche standard. Le varie forme del termine "trasfezione" vengono intese comprendere un'ampia varietà di tecniche comunemente utilizzate per l'introduzione di DNA esogeno in una cellula ospite procariotica o eucariotica, per esempio elettroporazione, precipitazione con calcio-fosfato, trasfezione mediante DEAE-destrano e simili. Sebbene sia teoricamente possibile esprimere gli anticorpi dell'invenzione in cellule ospiti procariotiche o eucariotiche, l'espressione di anticorpi in cellule eucariotiche, ed il più preferibilmente cellule ospiti di mammifero, è la più preferita poiché tali cellule eucariotiche, ed in particolare cellule di mammifero, con maggiore probabilità rispetto alle cellule procariotiche assemblano e secernono un anticorpo ripiegato in modo appropriato ed immunologicamente attivo. L'espressione procariotica di geni anticorpali è stata riportata essere inefficace per la produzione di rese elevate di anticorpo attivo [Boss, M. A. e Wood, C. R. (1985) *Immunology Today* 6:12-13].

Cellule ospiti di mammifero preferite per esprimere gli anticorpi ricombinanti dell'invenzione includono cellule di ovaio di criceto cinese (CHO), in combinazione con un vettore quale l'elemento promotore genico

precoce intermedio principale da citomegalovirus umano [Foecking *et al.*, 1986, *Gene* 45:101; Cockett *et al.* (1990) *BioTechnology* 8:2], cellule CHO dhfr-, descritto in Urlaub e Chasin (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, utilizzati con un marcatore selezionabile DHFR, per esempio come descritto in R. J. Kaufman e P. A. Sharp (1982) *J. Mol. Biol.* 159:601-621), cellule di mieloma NSO, cellule COS e cellule SP2. In particolare, per uso con cellule NSO di mieloma, un altro sistema di espressione preferito è il sistema di espressione genica GS descritto in WO 87/04462 (a Wilson), WO 89/01036 (a Bebbington) ed EP 338,841 (a Bebbington).

Una varietà di ospite sistemi di vettore di espressione può essere utilizzata per esprimere una molecola anticorpale dell'invenzione. Tali sistemi di espressione nell'ospite rappresentano veicoli mediante i quali le sequenze codificanti d'interesse possono essere prodotti e successivamente purificati, ma rappresentano anche cellule che possono, quando trasformate o trasfettate con le sequenze nucleotidiche codificanti appropriate, esprimere la molecola anticorpale dell'invenzione *in situ*. Questi includono, ma senza limitazione, microrganismi quali batteri (per esempio *E. coli*, *B. subtilis*) trasformati con DNA ricombinante del batteriofago, DNA plasmidico o vettori cosmidici di espressione di DNA contenenti sequenze codificanti anticorpi; lievito (per esempio *Saccharomyces*, *Pichia*) trasformato con vettori di espressione di lievito ricombinanti contenenti sequenze codificanti anticorpi; sistemi di cellule di insetto infettati con vettori di espressione virali ricombinanti (per esempio baculovirus) contenenti le sequenze codificanti anticorpi; sistemi di cellule

vegetali infettati con vettori di espressione virali ricombinanti (per esempio virus del mosaico del cavolfiore, CaMV; virus del mosaico del tabacco, TMV) o trasformati con vettori di espressione plasmidici ricombinanti (per esempio plasmide Ti) contenenti sequenze codificanti anticorpi; o sistemi di cellule di mammifero (per esempio cellule COS, CHO, BHK, 293, 3T3) ospitanti costrutti di espressione ricombinanti contenenti promotori derivati dal genoma di cellule di mammifero (per esempio promotore della metallothioneina) o da virus di mammifero (per esempio il promotore tardivo di adenovirus; il promotore 7.5K del virus del vaiolo vaccino).

In sistemi batterici, può essere vantaggiosamente scelto un certo numero di vettori di espressione a seconda dell'uso desiderato per la molecola anticorpale che viene espressa. Per esempio, quando deve essere prodotta una grande quantità di una tale proteina, per la generazione di composizioni farmaceutiche comprendenti una molecola anticorpale, possono essere desiderabili vettori che dirigono l'espressione di livelli elevati di prodotti della proteina di fusione che sono facilmente purificati. Tali vettori includono, ma senza limitazione, il vettore di espressione di *E. coli* pUR278 (Ruther *et al.* (1983) *EMBO J.* 2:1791), in cui la sequenza codificante anticorpi può essere ligata singolarmente nel vettore in fase di lettura con la regione codificante *lac Z* così che venga prodotta una proteina di fusione; vettori pIN [Inouye & Inouye (1985) *Nucleic Acids Res.* 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster (1989) *J. Biol. Chem.* 24:5503-5509]; ed i vettori pGEX simili possono anche essere utilizzati per esprimere polipeptidi estranei come proteine di fusione con la glutatione S-transferasi (GST). In generale, tali proteine di fusione sono

solubili e possono essere facilmente purificate dalle cellule lisate mediante adsorbimento e legame a sfere di matrice di agarosio-glutazione cui segue eluizione in presenza di glutazione libero. I vettori pGEX vengono progettati per includere trombina o siti di scissione di proteasi del fattore Xa così che il prodotto genico bersaglio clonato possa essere rilasciato dal gruppo funzionale GST.

In un sistema di insetto, il virus della poliedrosi nucleare di *Autographa californica* (AcNPV) viene utilizzato come vettore per esprimere geni estranei. Il virus cresce in cellule di *Spodoptera frugiperda*. La sequenza codificante anticorpi può essere clonata singolarmente in regioni non essenziali (per esempio il gene della poliedrina) del virus e posta sotto il controllo di un promotore di AcNPV (per esempio il promotore della poliedrina). In cellule ospiti di mammifero, può essere utilizzato un certo numero di sistemi di espressione su base virale (per esempio un sistema di espressione di adenovirus).

Come discusso sopra, può essere scelto un ceppo di cellule ospiti che modula l'espressione delle sequenze inserite, o modifica e processa il prodotto genico nel modo specifico desiderato. Tali modifiche (per esempio glicosilazione) e lavorazione (per esempio scissione) di prodotti proteici possono essere importanti per la funzione della proteina.

Per una produzione a lungo termine, con resa elevata di anticorpi ricombinanti, si preferisce un'espressione stabile. Per esempio, linee cellulari che esprimono stabilmente un anticorpo d'interesse possono essere prodotte trasfettando le cellule con un vettore di espressione comprendente la sequenza nucleotidica dell'anticorpo e la sequenza

nucleotidica di un marcatore selezionabile (per esempio neomicina o igromicina), ed effettuando una selezione per l'espressione del marcatore selezionabile. Tali linee cellulari ingegnerizzate possono essere particolarmente utili nello screening e nella valutazione di composti che interagiscono direttamente o indirettamente con la molecola anticorpale.

I livelli di espressione della molecola anticorpale possono essere aumentati dall'amplificazione del vettore [per una rassegna, si veda Bebbington e Hentschel, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*, vol. 3. (Academic Press, New York, 1987)]. Quando un marcatore nel sistema di vettori esprimenti l'anticorpo è amplificabile, l'incremento nel livello di inibitore presente nella coltura della cellula ospite aumenterà il numero di copie del gene marcatore. Poiché la regione amplificata è associata al gene di un anticorpo, anche la produzione dell'anticorpo incrementerà [Crouse *et al.*, 1983, *Mol. Cell Biol.* 3:257].

Quando vettori di espressione ricombinanti codificanti geni anticorpali vengono introdotti in cellule ospiti di mammifero, gli anticorpi vengono prodotti sottoponendo a coltura le cellule ospiti per un periodo di tempo sufficiente a permettere l'espressione dell'anticorpo nelle cellule ospiti o, più preferibilmente, la secrezione dell'anticorpo nel terreno di coltura in cui le cellule ospiti sono cresciute. Una volta che la molecola anticorpale dell'invenzione è stata espressa per via ricombinante, essa può essere purificata mediante qualsiasi metodo noto nell'arte per la purificazione di una molecola anticorpale, per esempio, mediante cromatografia (per esempio cromatografia a scambio ionico, cromatografia

di affinità quale con la proteina A o un antigene specifico, e cromatografia dimensionale su colonna), centrifugazione, solubilità differenziale, o mediante qualsiasi altra tecnica standard per la purificazione di proteine.

In alternativa, qualsiasi proteina di fusione può essere facilmente purificata utilizzando un anticorpo specifico per la proteina di fusione che viene espressa. Per esempio, un sistema descritto da Janknecht *et al.* permette la purificazione rapida di proteine di fusione non denaturate espresse in linee cellulari umane [Janknecht *et al.*, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8972-897]. In questo sistema, il gene d'interesse è subclonato in un plasmide di ricombinazione di vaiolo vaccino in modo tale che la fase di lettura aperta del gene è fusa tradizionalmente ad un marcatore amminoterminale composto da sei residui di istidina. Il marcatore serve come dominio di legame alla matrice per la proteina di fusione. Estratti dalle cellule infettate con il virus del vaccino ricombinante sono caricati su colonne di Ni²⁺ acido nitriloacetico-agarosio e proteine marcate con istidina vengono selettivamente eluite con tamponi contenenti imidazolo.

Caratterizzazione del legame dell'anticorpo all'antigene

Gli anticorpi che sono generati mediante questi metodi possono quindi essere selezionati mediante un primo screening per l'affinità e la specificità con il polipeptide purificato d'interesse e, se richiesto, confrontando i risultati con l'affinità e la specificità degli anticorpi con polipeptidi che si desidera siano esclusi dal legame. Gli anticorpi possono essere testati per il legame al BST1, per esempio, mediante ELISA standard. La procedura di screening può implicare l'immobilizzazione dei

polipeptidi purificati in pozzetti distinti di piastre da microtitolazione. La soluzione contenente un anticorpo o gruppi di anticorpi potenziali viene quindi posta nei rispettivi pozzetti da microtitolo ed incubata per circa da 30 min a 2 ore. I pozzetti da microtitolo vengono quindi lavati ed un anticorpo secondario marcato (per esempio un anticorpo antitopo coniugato a fosfatasi alcalina se gli anticorpi generati sono anticorpi di topo) viene aggiunto ai pozzetti ed incubato per circa 30 min e quindi lavato. Il substrato viene aggiunto ai pozzetti ed una reazione colorimetrica apparirà dove è presente l'anticorpo nei confronti del/dei polipeptide/i immobilizzato/i.

Gli anticorpi così identificati possono quindi essere ulteriormente analizzati per l'affinità e per la specificità nel disegno di saggio scelto. Nello sviluppo di saggi immunologici per una proteina bersaglio, la proteina bersaglio purificata agisce come standard con cui giudicare la sensibilità e la specificità del saggio immunologico utilizzando gli anticorpi che sono stati scelti. Poiché l'affinità di legame di vari anticorpi può differire, certe coppie di anticorpi (per esempio in saggi a sandwich) possono interferire l'una con l'altra stericamente, ecc., l'esecuzione del saggio di un anticorpo può essere una misura più importante rispetto all'affinità ed alla specificità assolute di un anticorpo.

Coloro che sono esperti nell'arte riconosceranno che molti approcci possono essere intrapresi nel produrre anticorpi o frammenti leganti e sottoponendo a screening e selezionando per affinità e specificità i vari polipeptidi, ma questi approcci non cambiano l'ambito dell'invenzione.

Per determinare se gli anticorpi monoclonali anti-BST1 scelti si legano ad epitopi unici, ciascun anticorpo può essere biotinilato utilizzando reagenti disponibili in commercio (Pierce, Rockford, Illinois). Studi di competizione che utilizzano anticorpi monoclonali non marcati e anticorpi monoclonali biotinilati possono essere eseguiti utilizzando le piastre per ELISA rivestite con BST1. Il legame del mAb biotinilato può essere rilevato con una sonda di streptavidina-fosfatasi alcalina.

Per determinare l'isotipo degli anticorpi purificati, possono essere eseguiti saggi ELISA per l'isotipo utilizzando reagenti specifici per gli anticorpi di un isotipo particolare.

Anticorpi anti-BST1 possono essere ulteriormente testati per la reattività con l'antigene BST1 mediante Western blotting. In breve, BST1 può essere preparato e sottoposto ad elettroforesi su gel di poliacrilammide con dodecilsolfato di sodio. Dopo l'elettroforesi, gli antigeni separati vengono trasferiti su membrane di nitrocellulosa, bloccati con siero fetale di vitello al 10% e sottoposti ad analisi mediante sonda con gli anticorpi monoclonali da testare.

La specificità di legame di un anticorpo dell'invenzione può essere determinata anche monitorando il legame dell'anticorpo a cellule esprimenti BST1, per esempio, mediante citometria a flusso. Tipicamente, una linea cellulare, quale una linea cellulare CHO, può essere trasfettata con un vettore di espressione codificante BST1. La proteina trasfettata può comprendere un marcatore, quale un marcatore myc, preferibilmente all'estremità N-terminale, per il rilevamento utilizzando un anticorpo nei confronti del marcatore. Il legame di un anticorpo dell'invenzione a BST1

può essere determinato incubando le cellule trasfettate con l'anticorpo, e rilevamento l'anticorpo legato. Il legame di un anticorpo nei confronti del marcatore sulla proteina trasfettata può essere utilizzato come controllo positivo.

La specificità di un anticorpo dell'invenzione per BST1 può essere ulteriormente studiata determinando se l'anticorpo si lega ad altre proteine oppure no, quale un altro membro della famiglia Eph utilizzando gli stessi metodi mediante i quali viene determinato il legame a BST1.

Immunoconiugati

In un altro aspetto, la presente invenzione comprende un anticorpo anti-BST1, o un suo frammento, coniugati ad un gruppo funzionale terapeutico, quale una citotossina, un farmaco (per esempio un immunosoppressore) o una radiotossina. Tali coniugati vengono indicati qui come "immunoconiugati". Immunoconiugati che includono una o più citotossine vengono indicati "immunotossine". Una citotossina o un agente citotossico comprendono qualsiasi agente che sia dannoso per le cellule (per esempio le uccide). Esempi includono taxolo, citocalasina B, gramicidina D, bromuro di etidio, emetina, mitomicina, etoposide, teniposide, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, diidrossiantracindione, mitoxantrone, mitramicina, actinomicina D, 1-deidrotestosterone, glucocorticoidi, procaina, tetracaina, lidocaina, propranololo, e puromicina e loro analoghi o omologhi. Agenti terapeutici includono anche, per esempio, antimetaboliti (per esempio metotrexato, 6-mercaptipurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil dacarbazina), agenti alchilanti (per esempio mecloretamina, tiotepa

clorambucile, melfalan, carmustina (BSNU) e lomustina (CCNU), ciclofosfamide, busulfano, dibromomannitolo, streptozotocina, mitomicina C, e cis-diclorodiamminoplatino(II) (DDP) cisplatino), antracicline (per esempio daunorubicina (in passato daunomicina) e doxorubicina), antibiotici (per esempio dactinomicina (in passato actinomicina), bleomicina, mitramicina, ed antramicina (AMC)), ed agenti antimitotici (per esempio vincristina e vinblastina).

Altri esempi preferiti di citotossine terapeutiche che possono essere coniugate ad un anticorpo dell'invenzione includono duocarmicine, calicheamicine, maitansine ed auristatine, e loro derivati. Un esempio di un anticorpo coniugato alla calicheamicina è disponibile in commercio (Mylotarg[®]; American Home Products).

Le citotossine possono essere coniugate ad anticorpi dell'invenzione utilizzando la tecnologia con gruppi di collegamento disponibile nell'arte. Esempi di tipi di gruppi di collegamento che sono stati utilizzati per coniugare una citotossina ad un anticorpo includono, ma senza limitazione, idrazoni, tioeteri, esteri, disolfuri e gruppi di collegamento contenenti peptidi. Può essere scelto un gruppo di collegamento che sia, per esempio, sensibile alla scissione mediante pH basso all'interno del compartimento lisosomiale o sensibile alla scissione mediante proteasi, quali proteasi preferibilmente espresse nel tessuto tumorale quali catepsine (per esempio catepsine B, C, D).

Esempi di citotossine vengono descritti, per esempio, nei brevetti US 6,989,452, 7,087,600 e 7,129,261, e nelle domande PCT PCT/US2002/17210, PCT/US2005/017804, PCT/US2006/37793,

PCT/US2006/060050, PCT/US2006/060711, WO2006/110476, e nella domanda di brevetto US 60/891 028. Per ulteriore discussione di tipi di citotossine, gruppi di collegamento e metodi per coniugare agenti terapeutici ad anticorpi, si vedano anche Saito, G. *et al.* (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215; Trail, P.A. *et al.* (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, T.M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan, I. e Kreitman, R. J. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091; Senter, P.D. e Springer, C.J. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264.

Gli anticorpi della presente invenzione possono anche essere coniugati ad un isotopo radioattivo per generare radiofarmaci citotossici, indicati anche come radioimmunoconiugati. Esempi di isotopi radioattivi che possono essere coniugati ad anticorpi per uso da un punto di vista diagnostico o terapeutico includono, ma senza limitazione, iodio131, indio111, ittrio90 e lutezio177. Metodi per preparare radioimmunoconiugati sono stabiliti nell'arte. Esempi di radioimmunoconiugati sono disponibili in commercio, compresi Zevalin® (IDEC Pharmaceuticals) e Bexxar® (Corixa Pharmaceuticals), e metodi simili possono essere utilizzati per preparare radioimmunoconiugati utilizzando gli anticorpi dell'invenzione.

I coniugati anticorpali dell'invenzione possono essere utilizzati per modificare una data risposta biologica, ed il gruppo funzionale del farmaco non deve essere inteso come limitato ad agenti terapeutici chimici classici. Per esempio, il gruppo funzionale del farmaco può essere una proteina o un polipeptide aventi un'attività biologica desiderata. Tali proteine possono includere, per esempio, una tossina enzimaticamente attiva, o un suo

frammento attivo, quali abrina, ricina A, esotossina di *Pseudomonas*, o tossina difterica; una proteina quale il fattore di necrosi tumorale o interferone γ ; o, modificatori della risposta biologica quali, per esempio, linfochine, interleuchina-1 ("IL-1"), interleuchina-2 ("IL-2"), interleuchina-6 ("IL-6"), fattore stimolante le colonie di granulociti e macrofagi ("GM-CSF"), fattore stimolante le colonie di granulociti ("G-CSF"), o altri fattori di crescita.

Tecniche per coniugare tale gruppo funzionale terapeutico agli anticorpi sono ben note, si vedano, per esempio Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, a cura di Reisfeld *et al.*, pag. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery* (seconda edizione), a cura di Robinson *et al.*, pag. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, a cura di Pinchera *et al.*, pag. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy," in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, a cura di Baldwin *et al.*, pag. 303-16 (Academic Press 1985), e Thorpe *et al.*, *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982).

Molecole bispecifiche

In un altro aspetto, la presente invenzione comprende molecole bispecifiche comprendenti un anticorpo anti-BST1, o un suo frammento, dell'invenzione. Un anticorpo dell'invenzione, o sue porzioni leganti

l'antigene, possono essere derivatizzati o legati ad un'altra molecola funzionale, per esempio un altro peptide o un'altra proteina (per esempio un altro anticorpo o ligando per un recettore) per generare una molecola bispecifica che si lega ad almeno due siti di legame o molecole bersaglio differenti. L'anticorpo dell'invenzione può essere in effetti derivatizzato o legato a più di un'altra molecola funzionale per generare molecole multispecifiche che si legano a più di due siti di legame differenti e/o molecole bersaglio; tali molecole multispecifiche sono anche intese essere comprese con il termine "molecola bispecifica" come utilizzato qui. Per creare una molecola bispecifica dell'invenzione, un anticorpo dell'invenzione può essere funzionalmente legato (per esempio mediante accoppiamento chimico, fusione genetica, associazione non covalente o altrimenti) ad una o più altre molecole leganti, quali un altro anticorpo, frammento anticorpale, peptide o mimetico del legame, in modo tale che risulti una molecola bispecifica.

Conseguentemente, la presente invenzione comprende molecole bispecifiche comprendenti almeno una prima specificità di legame per un primo epitopo bersaglio (cioè BST1) ed una seconda specificità di legame per un secondo epitopo bersaglio. Il secondo epitopo bersaglio può essere presente sulla stessa proteina bersaglio rispetto a quella legata dalla prima specificità di legame; oppure il secondo epitopo bersaglio può essere presente su una proteina bersaglio differente rispetto a quella legata dalla prima specificità di legame. Il secondo epitopo bersaglio può essere presente sulla stessa cellula del primo epitopo bersaglio (cioè BST1); oppure il secondo epitopo bersaglio può essere presente su un

bersaglio che non è mostrato dalla cellula che mostra il primo epitopo bersaglio. Come utilizzato qui, il termine 'specificità di legame' si riferisce ad un gruppo funzionale comprendente almeno un dominio variabile anticorpale.

In una forma di realizzazione dell'invenzione, il secondo epitopo bersaglio è un recettore per l'Fc, per esempio Fc γ RI umano (CD64) o un recettore Fc α umano (CD89). L'invenzione comprende quindi molecole bispecifiche in grado di legarsi a cellule effettrici esprimenti Fc γ R o Fc α R (per esempio monociti, macrofagi o cellule polimorfonucleate (PMN), ed a cellule esprimenti il bersaglio BST1. Queste molecole bispecifiche indirizzano cellule esprimenti BST1 ad una cellula effettrice e innescano attività delle cellule effettrici mediate dai recettori Fc, quali fagocitosi di cellule esprimenti BST1, citotossicità mediata dalle cellule dipendente dall'anticorpo (ADCC), rilascio di citochine, o generazione di anione superossido.

In un'altra forma di realizzazione dell'invenzione, il secondo epitopo bersaglio è CD3 o CD5. L'invenzione comprende, quindi, molecole bispecifiche in grado di legarsi sia a cellule effettrici esprimenti CD3 o CD5 (per esempio linfociti T citotossici esprimenti CD3 o CD5), sia a cellule esprimenti il bersaglio BST1. Queste molecole bispecifiche indirizzano cellule esprimenti BST1 ad una cellula effettrice e innescano le attività della cellula effettrice mediate da CD3 o da CD5, quali espansione clonale dei linfociti T e citotossicità dei linfociti T. In questa forma di realizzazione, l'anticorpo bispecifico dell'invenzione può avere un totale di due o tre domini variabili anticorpali, in cui la prima porzione dell'anticorpo

bispecifico è in grado di reclutare l'attività di una cellula effettrice immunitaria umana legandosi specificamente ad un antigene effetttore localizzato sulla cellula effettrice immunitaria umana, in cui l'effettore antigene è l'antigene CD3 o CD5 umani, la suddetta prima porzione composta da un dominio variabile anticorpale, ed una seconda porzione dell'anticorpo bispecifico è in grado di legarsi specificamente ad un antigene bersaglio diverso rispetto all'antigene effetttore per esempio BST1, il suddetto antigene bersaglio essendo localizzato su una cellula bersaglio diversa dalla suddetta cellula effettrice immunitaria umana, e la suddetta seconda porzione comprendendo uno o due domini variabili anticorpali.

In una forma di realizzazione dell'invenzione in cui la molecola bispecifica è multispecifica, la molecola può includere anche una terza specificità di legame, oltre ad una specificità di legame anti-Fc o specificità di legame anti-CD3 o anti-CD5 ed una specificità di legame anti-BST1. In una forma di realizzazione, la terza specificità di legame è una porzione dell'antifattore di potenziamento (EF), per esempio una molecola che si lega ad una proteina di superficie coinvolta nell'attività citotossica e quindi aumenta la risposta immunitaria nei confronti della cellula bersaglio. La "porzione dell'antifattore di potenziamento" può essere un anticorpo, un frammento anticorpale funzionale o un ligando che si lega ad una data molecola, per esempio un antigene o un recettore, e quindi risulta in un potenziamento dell'effetto dei determinanti del legame per il recettore per l'Fc o antigene cellulare bersaglio. La "porzione dell'antifattore di potenziamento" può legare un recettore per l'Fc o un antigene cellulare

bersaglio. In alternativa, la porzione dell'antifattore di potenziamento può legarsi ad un'entità che è differente dall'entità a cui la prima e la seconda specificità di legame si legano. Per esempio, la porzione dell'antifattore di potenziamento può legarsi ad un linfocita T citotossico (per esempio via CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 o ad un'altra cellula immunitaria che risulta in una risposta immunitaria aumentata nei confronti della cellula bersaglio).

In una forma di realizzazione, le molecole bispecifiche dell'invenzione comprendono come specificità di legame almeno un anticorpo, o un suo frammento anticorpale, compresi, per esempio un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fd, dAb o un Fv a singola catena. L'anticorpo può anche essere un dimero della catena leggera o della catena pesante, o qualsiasi suo frammento minimo quale Fv o un costrutto a singola catena come descritto nel brevetto US 4,946,778.

In una forma di realizzazione, la specificità di legame per un recettore di Fc γ viene fornita da un anticorpo monoclonale, il cui legame non viene bloccato dall'immunoglobulina G umana (IgG). Come utilizzato qui, il termine "recettore dell'IgG" si riferisce a qualsiasi degli otto geni della catena γ localizzati sul cromosoma 1. Questi geni codificano un totale di dodici isoforme di recettore transmembrana o solubile che sono raggruppate in tre classi del recettore per l'Fc γ : Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32), e Fc γ RIII (CD16). In una forma di realizzazione preferita, il recettore Fc γ è un Fc γ RI umano ad affinità elevata. L'Fc γ RI umano è una molecola da 72 kDa, che mostra affinità elevata per l'IgG monomerica (10^8 - 10^9 M⁻¹).

La produzione e la caratterizzazione di certi anticorpi monoclonali anti-Fc γ preferiti vengono descritti nella pubblicazione PCT WO 88/00052 e nel brevetto US 4,954,617. Questi anticorpi si legano ad un epitopo di Fc γ RI, Fc γ RII o Fc γ RIII ad un sito che è distinto dal sito di legame a Fc γ del recettore e, così, il loro legame non è bloccato sostanzialmente da livelli fisiologici di IgG. Specifici anticorpi anti-Fc γ RI utili in questa invenzione sono mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 e mAb 197. L'ibridoma che produce il mAb 32 è disponibile dall'American Type Culture Collection, numero di accesso di ATCC HB9469. In altre forme di realizzazione, l'anticorpo anti-recettore Fc γ è una forma umanizzata dell'anticorpo monoclonale 22 (H22). La produzione e la caratterizzazione dell'anticorpo H22 vengono descritte in Graziano, R.F. *et al.* (1995) *J. Immunol* 155 (10): 4996-5002 e pubblicazione PCT WO 94/10332. La linea cellulare produttrice l'anticorpo H22 è stata depositata presso l'American Type Culture Collection con il nome HA022CL1 ed ha il numero di accesso CRL 11177.

In ancora altre forme di realizzazione preferite, la specificità di legame per un recettore per l'Fc viene fornita da un anticorpo che si lega al recettore dell'IgA umana, per esempio un recettore di Fc-alfa [Fc α RI (CD89)], il cui legame non è preferibilmente bloccato dall'immunoglobulina A umana (IgA). Il termine "recettore dell'IgA" intende includere il prodotto genico di un gene α (Fc α RI) localizzato sul cromosoma 19. Questo gene è noto codificare diverse isoforme transmembrana sottoposte a splicing alternativo da 55 kDa a 110 kDa. Fc α RI (CD89) viene espresso costitutivamente su monociti/macrofagi, granulociti eosinofili e neutrofili,

ma non su popolazioni cellulari non effettrici. FcαRI ha affinità media ($\approx 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) sia per l'IgA1 sia per l'IgA2, che è aumentato dopo l'esposizione a citochine quali G-CSF o GM-CSF [Morton, H.C. *et al.* (1996) *Critical Reviews in Immunology* 16:423-440]. Sono stati descritti quattro anticorpi monoclonali specifici per FcαRI, identificati come A3, A59, A62 e A77, che legano FcαRI all'esterno del dominio di legame del ligando dell'IgA [Monteiro, R.C. *et al.* (1992) *J. Immunol.* 148:1764].

FcαRI e FcγRI sono recettori di stimolazione preferiti per uso nelle molecole bispecifiche dell'invenzione poiché essi sono (1) espressi principalmente su cellule effettrici immunitarie, per esempio monociti, PMN, macrofagi e cellule dendritiche; (2) espressi a livelli elevati (per esempio 5.000-100.000 per cellula); (3) mediatori di attività citotossiche (per esempio ADCC, fagocitosi); e (4) mediano la presentazione dell'antigene aumentata di antigeni, compresi autoantigeni, diretti verso di essi.

Anticorpi che possono essere impiegati nelle molecole bispecifiche dell'invenzione sono anticorpi monoclonali murini, umani, chimerici ed umanizzati.

Le molecole bispecifiche della presente invenzione possono essere preparate coniugando le specificità di legame costituenti, per esempio le specificità di legame anti-FcR, anti-CD3, anti-CD5 ed anti-BST1, utilizzando metodi noti nell'arte. Per esempio, la specificità di legame di ciascuna molecola bispecifica può essere generata separatamente e quindi coniugata l'una all'altra. Quando le specificità di legame sono proteine o peptidi, può essere utilizzata una varietà di agenti

di accoppiamento o reticolanti per coniugazione covalente. Esempi di agenti reticolanti includono proteina A, carbodiimmide, N-succinimidil-S-acetiltioacetato (SATA), 5,5'-ditiobis(acido 2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilendimaleimmide (oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), e solfosuccinimidil 4-(N-maleimmidometil) cicloesan-1-carbossilato (solfo-SMCC) [si vedano per esempio Karpovsky *et al.* (1984) *J. Exp. Med.* 160:1686; Liu, MA *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8648]. Altri metodi includono quelli descritti in Paulus (1985) *Behring Ins. Mitt.* No. 78, 118-132; Brennan *et al.* (1985) *Science* 229:81-83, e Glennie *et al.* (1987) *J. Immunol.* 139: 2367-2375. Agenti di coniugazione preferiti sono SATA e solfo-SMCC, entrambi disponibili da Pierce Chemical Co. (Rockford, Illinois)].

Ulteriore lavoro bivalente è stato effettuato per agenti bispecifici mediante legame duale di ingegneria in formati simili ad anticorpi a lunghezza intera (Wu *et al.*, 2007, *Nature Biotechnology* 25[11]:1290-1297; USSN12/477 711; Michaelson *et al.*, 2009, *mAb* 1[2]:128-141; PCT/US2008/074693; Zuo *et al.*, 2000, *Protein Engineering* 13[5]:361-367; USSN09/865 198; Shen *et al.*, 2006, *J. Biol. Chem.* 281[16]:10706-10714; Lu *et al.*, 2005, *J. Biol. Chem.* 280[20]:19665-19672; PCT/US2005/025472).

Quando le specificità di legame sono anticorpi, esse possono essere coniugate tramite legame sulfidrilico delle regioni a cerniera C-terminali delle due catene pesanti. In una forma di realizzazione particolarmente preferita, la regione cerniera viene modificata per

contenere un numero dispari di residui sulfidrilici, preferibilmente uno, prima della coniugazione.

In alternativa, entrambe le specificità di legame possono essere codificate nello stesso vettore ed espresse e riunite nella stessa cellula ospite. Questo metodo è particolarmente utile dove la molecola bispecifica è un mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂ o ligando x proteina di fusione con Fab. Una molecola bispecifica dell'invenzione può essere una molecola a catena singola comprendente un anticorpo a catena singola ed un determinante di legame, o una molecola bispecifica a catena singola comprendente due determinanti di legame. Molecole bispecifiche possono comprendere almeno due molecole a catena singola. Metodi per preparare molecole bispecifiche vengono descritti per esempio nei brevetti US 5,260,203, 5,455,030, 4,881,175, 5,132,405, 5,091,513, 5,476,786, 5,013,653, 5,258,498, e 5,482,858.

Il legame delle molecole bispecifiche ai loro bersagli specifici può essere confermato, per esempio, mediante saggio di immunoassorbimento enzimatico (ELISA), saggio radioimmunologico (RIA), analisi FACS, saggio biologico (per esempio inibizione della crescita), o saggio di Western blot. Ciascuno di questi saggi in generale rileva la presenza di complessi proteina-anticorpo di particolare interesse impiegando un reagente marcato (per esempio un anticorpo) specifico per il complesso d'interesse. Per esempio, i complessi FcR-anticorpo possono essere rilevati utilizzando per esempio un anticorpo legato all'enzima o un frammento anticorpale che riconosce e si lega specificamente ai complessi anticorpo-FcR. In alternativa, i complessi possono essere

rilevati utilizzando qualsiasi di una varietà di altri dosaggi immunologici. Per esempio, l'anticorpo può essere marcato in modo radioattivo ed utilizzato in un saggio radioimmunologico (RIA) (si veda, per esempio, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, marzo, 1986). L'isotopo radioattivo può essere rilevato mediante mezzi quali l'uso di un contatore γ o un contatore a scintillazione o mediante autoradiografia.

Frammenti anticorpali e mimetici anticorpali

La presente invenzione non è limitata ad anticorpi tradizionali e può essere praticata attraverso l'uso di frammenti anticorpali. Come descritto sotto in dettaglio, un'ampia varietà di frammenti anticorpali e di tecnologie di anticorpi mimetici è stata ora sviluppata ed è ampiamente nota nell'arte. Anche se un certo numero di queste tecnologie, quali anticorpi a dominio, nanobody, e UniBodies, fa uso di frammenti di, o altre modifiche a, strutture anticorpali tradizionali, vi sono anche tecnologie alternative, quali gli Affibody, DARPin, anticaline, avimer, e versabody che impiegano strutture di legame che, mentre mimano il legame anticorpale tradizionale, sono generate da meccanismi distinti e funzionano attraverso questi.

Gli anticorpi a dominio (dAb) sono le unità di legame funzionali più piccole degli anticorpi, corrispondenti alle regioni variabili delle catene pesanti (V_H) o leggere (V_L) degli anticorpi umani. Gli anticorpi a dominio hanno un peso molecolare di approssimativamente 13 kDa. Domantis ha sviluppato una serie di librerie grandi ed altamente funzionali di dAb V_H e

V_L completamente umani (più di dieci miliardi di sequenze differenti in ciascuna libreria), e utilizza queste librerie per selezionare dAb che siano specifici per bersagli terapeutici. Al contrario di molti anticorpi convenzionali, anticorpi a dominio sono ben espressi in sistemi cellulari batterici, di lievito e di mammiferi. Ulteriori dettagli di anticorpi a dominio e loro metodi di produzione possono essere ottenuti con riferimento ai brevetti US 6,291,158, 6,582,915, 6,593,081, 6,172,197, 6,696,245, US 2004/0110941; domanda di brevetto europeo 1433846 e brevetti europei 0368684 e 0616640; WO05/035572, WO04/101790, WO04/081026, WO04/058821, WO04/003019 e WO 03/002609.

I nanobody sono proteine terapeutiche derivate da anticorpi che contengono le proprietà strutturali e funzionali uniche di anticorpi a catena pesante presenti in natura. Questi anticorpi a catena pesante contengono un dominio variabile singolo (VHH) e due domini costanti (C_H2 e C_H3). In modo importante, il dominio VHH clonato ed isolato è un polipeptide perfettamente stabile ospitante la totale capacità di legare l'antigene dell'anticorpo a catena pesante originale. I nanobody hanno un'omologia elevata con i domini V_H di anticorpi umani e possono essere ulteriormente umanizzati senza alcuna perdita dell'attività. In modo importante, i nanobody hanno un potenziale immunogenico basso, che è stato confermato in studi su primati con composti guida di nanobody.

I nanobody combinano i vantaggi di anticorpi convenzionali con caratteristiche importanti di farmaci a piccola molecola. Come gli anticorpi convenzionali, i nanoanticorpi mostrano specificità elevata per il bersaglio, affinità elevata per il loro bersaglio e tossicità intrinseca bassa. Tuttavia,

come i farmaci a piccola molecola, essi possono inibire enzimi e accedere facilmente alle tasche recettoriali. Inoltre, i nanobody sono estremamente stabili, possono essere somministrati mediante mezzi diversi dall'iniezione (si veda per esempio WO 04/041867) e sono facili da produrre. Altri vantaggi dei nanobody includono il riconoscere epitopi rari o nascosti come risultato della loro piccola dimensione, il legarsi in cavità o siti attivi dei bersagli proteici con affinità e selettività elevate grazie alla loro unica flessibilità del formato farmaco tridimensionale, adattamento dell'emivita e facilità e velocità di scoperta dei farmaci.

I nanoanticorpi sono codificati da geni singoli e vengono efficientemente prodotti in quasi tutti gli ospiti procariotici ed eucariotici per esempio *E. coli* (si veda per esempio US 6,765,087), muffe (per esempio *Aspergillus* o *Trichoderma*) e lievito (per esempio *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Hansenula* o *Pichia*) (si veda per esempio US 6,838,254). Il processo di produzione è aumentabile in scala e quantità in multichilogrammi di nanobody sono state prodotte. Poiché i nanobody mostrano una stabilità superiore rispetto ad anticorpi convenzionali, essi possono essere formulati come soluzione a lunga durata, pronta per l'uso.

Il metodo Nanoclone (si veda per esempio WO 06/079372) è un metodo di proprietà per generare nanobody nei confronti di un bersaglio desiderato, sulla base di una selezione a flusso elevato automatizzata di linfociti B e potrebbe essere utilizzato nel contesto della presente descrizione.

Gli unibody sono un'altra tecnologia di frammenti anticorpali; tuttavia questa si basa sulla rimozione della regione cerniera di anticorpi

IgG4. La delezione della regione cerniera risulta in una molecola che è essenzialmente metà della dimensione degli anticorpi IgG4 tradizionali ed ha una regione di legame univalente piuttosto che la regione di legame bivalente di anticorpi IgG4. È anche ben noto che anticorpi IgG4 sono inerti e così non interagiscono con il sistema immunitario, il che può essere vantaggioso per il trattamento di malattie dove una risposta immunitaria non è desiderata, e questo vantaggio viene passato agli UniBody. Per esempio, gli UniBody possono funzionare per inibire o silenziare, ma non uccidere, le cellule a cui sono legati. Inoltre, il legame di UniBody a cellule cancerose non le stimola a proliferare. Inoltre, poiché gli UniBody sono circa metà della dimensione degli anticorpi IgG4 tradizionali, essi possono mostrare una distribuzione migliore rispetto a tumori solidi più grandi con efficacia potenzialmente vantaggiosa. Gli UniBody sono eliminati dall'organismo ad una velocità simile agli anticorpi IgG4 interi e sono in grado di legarsi ai loro antigeni con un'affinità simile agli anticorpi interi. Ulteriori dettagli di UniBody possono essere ottenuti con riferimento alla pubblicazione brevettuale WO 2007/059782.

Le molecole Affibody rappresentano una nuova classe di proteine di affinità basate su un dominio proteico di 58 residui amminoacidici, derivato da uno dei domini leganti le IgG della proteina A di stafilococco. Questo dominio a fascio di tre eliche è stato utilizzato come struttura di supporto per la costruzione di librerie fagemidiche combinatoriali, da cui varianti di Affibody che hanno come bersaglio le molecole desiderate possono essere scelti utilizzando la tecnologia dell'esposizione fagica [Nord K, Gunneriusson E, Ringdahl J, Stahl S, Uhlen M, Nygren PA (1997)

'Binding proteins selected from combinatorial libraries of an α -helical bacterial receptor domain' *Nat. Biotechnol.* 15:772-7. Ronmark J, Gronlund H, Uhlen M, Nygren PA (2002) 'Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A' *Eur J Biochem.* 269:2647-55]. La struttura semplice, robusta delle molecole Affibody in combinazione con il loro peso molecolare basso (6 kDa), le rende adatti per un'ampia varietà di applicazioni, per esempio, come reagenti per il rilevamento [Ronmark J. *et al.* (2002) 'Construction and characterization of affibody-Fc chimeras produced in *Escherichia coli*' *J. Immunol. Methods* 261:199-211] e per inibire interazioni con il recettore [Sandstorm K, Xu Z, Forsberg G, Nygren PA (2003) 'Inhibition of the CD28-CD80 co-stimulation signal by a CD28-binding Affibody ligand developed by combinatorial protein engineering' *Protein Eng* 16:691-7]. Ulteriori dettagli di molecole Affibody e metodi per la loro produzione possono essere ottenuti con riferimento al brevetto US 5831012.

Molecole Affibody marcate possono anche essere utili in applicazioni di analisi di immagini per determinare l'abbondanza di isoforme.

Le DARPin (proteine progettate con ripetizioni di anchirina) sono un esempio di una tecnologia di DRP (proteina progettata con ripetizioni) di mimetici anticorpali che è stata sviluppata per sfruttare le capacità di legame di polipeptidi non anticorpali. Proteine con ripetizioni quali anchirina o proteine con ripetizioni ricche in leucina, sono molecole leganti ubiquitarie, che si trovano, diversamente dagli anticorpi, a livello intracellulare ed extracellulare. La loro struttura modulare unica

comprende unità di ripetizione strutturali (ripetizioni), che si impilano insieme per formare domini di ripetizione allungati che mostrano superfici di legame al bersaglio variabili e modulari. Sulla base di questa modularità, possono essere generate librerie combinatoriali di polipeptidi con specificità di legame altamente diversificata. Questa strategia comprende la progettazione consenso di ripetizioni autocompatibili che mostrano residui di superficie variabili ed il loro assemblaggio casuale in domini di ripetizione.

Le DARPin possono essere prodotte in sistemi di espressione batterici a rese molto elevate ed appartengono alle proteine più stabili note. DARPin ad affinità elevata altamente specifiche sono state scelte in un'ampia gamma di proteine bersaglio, compresi recettori umani, citochine, chinasi, proteasi umane, virus e proteine di membrana. Possono essere ottenute DARPin aventi affinità nell'intervallo a singola cifra da nanomolare a picomolare.

Le DARPin sono state utilizzate in un'ampia gamma di applicazioni, compresi ELISA, ELISA a sandwich, analisi di citometria a flusso (FACS), immunoistochimica (IHC), applicazioni di chip, purificazione per affinità o Western blotting. Le DARPin si sono anche dimostrate essere altamente attive nel compartimento intracellulare, per esempio, come proteine marcatori intracellulari fuse alla proteina fluorescente verde (GFP). Le DARPin sono state ulteriormente utilizzate per inibire l'ingresso del virus con IC50 nell'intervallo pM. Le DARPin non sono solo ideali per bloccare le interazioni proteina-proteina, ma anche per inibire enzimi. Le proteasi, le chinasi ed i trasportatori sono stati inibiti con successo, il più

frequentemente con una modalità di inibizione allosterica. Arricchimenti molto veloci e specifici sul tumore e rapporti del tumore rispetto al sangue molto favorevoli rendono le DARPin ben adatte per approcci diagnostici o terapeutici *in vivo*.

Ulteriori informazioni riguardanti DARPin ed altre tecnologie DRP possono trovarsi nella pubblicazione della domanda di brevetto US 2004/0132028 e nella pubblicazione del brevetto internazionale WO 02/20565.

Le anticaline sono un'ulteriore tecnologia mimetica anticorpale. Tuttavia in questo caso la specificità di legame è derivata dalle lipocaline, una famiglia di proteine a basso peso molecolare che sono naturalmente ed abbondantemente espresse in tessuti umani e fluidi corporei. Le lipocaline si sono sviluppate per eseguire una gamma di funzioni *in vivo* associate al trasporto fisiologico e all'immagazzinamento di composti chimicamente sensibili o insolubili. Le lipocaline hanno una struttura intrinseca robusta comprendente un barile β altamente conservato che supporta quattro anse ad un terminale della proteina. Queste anse formano l'entrata per una tasca di legame e differenze conformazionali in questa parte della molecola spiegano la variazione nella specificità di legame tra singole lipocaline.

Anche se la struttura complessiva delle anse ipervariabili supportate da una struttura a foglietto β conservata ricorda le immunoglobuline, le lipocaline differiscono considerevolmente dagli anticorpi in termini di dimensione, essendo costituite da una catena

polipeptidica singola di 160-180 amminoacidi che è leggermente più grande di un singolo dominio immunoglobulinico.

Le lipocaline vengono clonate e le loro anse vengono sottoposte a ingegneria allo scopo di creare anticaline. Librerie di anticaline strutturalmente diverse sono state generate e l'esposizione di anticaline permette la selezione e lo screening di funzione di legame, cui seguono l'espressione e la produzione della proteina solubile per ulteriore analisi in sistemi procariotici o eucariotici. Gli studi hanno dimostrato con successo che possono essere sviluppate anticaline che sono specifiche per potenzialmente qualsiasi proteina bersaglio umana che può essere isolata e possono essere ottenute affinità di legame nell'intervallo nanomolare o superiore.

Le anticaline possono anche essere formattate come proteine di indirizzamento a bersaglio duali, le cosiddette duocaline. Una duocalina si lega a due bersagli terapeutici separati in una proteina monomerica facilmente prodotta utilizzando procedimenti standard di produzione mantenendo al contempo specificità per il bersaglio ed affinità indipendentemente dall'orientamento strutturale dei suoi due domini di legame.

La modulazione di bersagli multipli attraverso una singola molecola è particolarmente vantaggiosa in malattie note implicare più di un singolo fattore causativo. Inoltre, formati di legame bivalente o multivalente quali duocaline hanno un potenziale significativo nell'avere come bersaglio molecole di superficie cellulare nella malattia, nel mediare effetti agonistici su vie di trasduzione del segnale o nell'indurre effetti di

internalizzazione aumentati attraverso il legame ed il raggruppamento dei recettori della superficie cellulare. Inoltre, l'elevata stabilità intrinseca delle duocaline è paragonabile alle anticaline monomeriche, offrendo una formulazione flessibile e potenziale di rilascio per le duocaline.

Ulteriori informazioni riguardanti anticaline possono essere trovate nel brevetto US 7,250,297 e nella pubblicazione del brevetto internazionale WO99/16873.

Un'altra tecnologia mimetica anticorpale utile nel contesto della presente descrizione sono gli avimer. Gli avimer sono sviluppati da una grande famiglia di domini recettoriali extracellulari umani mediante rimescolamento degli esoni *in vitro* ed esposizione fagica, generando proteine multidominio con proprietà di legame ed inibitorie. È stato mostrato che il legame di domini di legame indipendenti multipli crea avidità e risulta in affinità e specificità migliorate rispetto a proteine di legame a singolo epitopo convenzionali. Altri potenziali vantaggi includono la produzione semplice ed efficiente di molecole specifiche multibersaglio in *Escherichia coli*, stabilità termica e resistenza a proteasi migliorate. Avimer con affinità subnanomolari sono stati ottenuti nei confronti di una varietà di bersagli.

Ulteriori informazioni riguardanti gli avimer possono essere trovate nella pubblicazione delle domande di brevetto US 2006/0286603, 2006/0234299, 2006/0223114, 2006/0177831, 2006/0008844, 2005/0221384, 2005/0164301, 2005/0089932, 2005/0053973, 2005/0048512, 2004/0175756.

I versabody sono un'altra tecnologia mimetica anticorpale che potrebbe essere utilizzata nel contesto della presente descrizione. I versabody sono piccole proteine di 3-5 kDa con cisteine >15%, che formano una struttura di supporto ad elevata densità di disolfuro, sostituendo il nucleo idrofobico che hanno le tipiche proteine. La sostituzione di un numero elevato di amminoacidi idrofobici, compreso il nucleo idrofobico, con un piccolo numero di disolfuri dà origine ad una proteina che è più piccola, più idrofila (meno aggregazione e legame non specifico), più resistente alle proteasi e al calore, ed ha una densità inferiore di epitopi dei linfociti T, poiché i residui che contribuiscono maggiormente alla presentazione all'MHC sono idrofobici. Tutte e quattro queste proprietà sono ben note influenzare l'immunogenicità, ed insieme queste sono attese causare una grande diminuzione nell'immunogenicità.

L'ispirazione per i versabody viene dai composti biofarmaceutici iniettabili naturali prodotti da sanguisughe, serpenti, ragni, scorpioni, lumache ed anemoni, che sono noti esibire immunogenicità inaspettatamente bassa. A partire da famiglie proteiche naturali selezionate, mediante progettazione e mediante la selezione della dimensione, l'idrofobicità, il trattamento proteolitico dell'antigene e la densità degli epitopi sono minimizzati a livelli ben al di sotto della media per proteine iniettabili naturali.

Data la struttura dei versabody, questi mimetici anticorpali offrono un formato versatile che comprende multivalenza, multispecificità, una diversità di meccanismi di emivita, moduli di indirizzamento a tessuti e l'assenza della regione anticorpale Fc. Inoltre, i versabody vengono

prodotti in *E. coli* a rese elevate, ed a causa delle loro idrofilicità e piccola dimensione, i versabody sono altamente solubili e possono essere formulati a concentrazioni elevate. I versabody sono eccezionalmente stabili al calore (essi possono essere bolliti) e offrono una durata prolungata.

Ulteriori informazioni riguardanti i versabody possono essere trovate nella pubblicazione della domanda di brevetto US 2007/0191272.

La descrizione dettagliata di tecnologie con frammenti anticorpali e con mimetici anticorpali fornita sopra non è intesa essere un elenco completo di tutte le tecnologie che potrebbero essere utilizzate nel contesto della presente descrizione. Per esempio, ed anche non a scopo di limitazione, una varietà di ulteriori tecnologie comprendenti tecnologie alternative basate su polipeptidi, quali fusioni delle regioni determinanti la complementarità come descritto in Qui *et al.* (2007) *Nature Biotechnology* 25(8):921-929, così come tecnologie basate su acidi nucleici, quali le tecnologie con aptameri di RNA descritte nei brevetti US 5,789,157, 5,864,026, 5,712,375, 5,763,566, 6,013,443, 6,376,474, 6,613,526, 6,114,120, 6,261,774, e 6,387,620 potrebbero essere utilizzate nel contesto della presente descrizione.

Composizioni farmaceutiche

In un altro aspetto, la presente descrizione fornisce una composizione, per esempio una composizione farmaceutica, contenente uno o una combinazione di anticorpi monoclonali, o una loro porzione/i legante/i l'antigene, della presente invenzione, formulati insieme ad un veicolante farmaceuticamente accettabile. Tali composizioni possono

includere uno o una combinazione di (per esempio due o più differenti) anticorpi, o immunoconiugati o molecole bispecifiche dell'invenzione. Per esempio, una composizione farmaceutica della descrizione può comprendere una combinazione di anticorpi (o immunoconiugati o molecole bispecifiche) che si legano ad epitopi differenti sull'antigene bersaglio o che hanno attività complementari.

Composizioni farmaceutiche della descrizione possono anche essere somministrate in terapia di combinazione, cioè combinate con altri agenti. Per esempio, la terapia di combinazione può includere un anticorpo della presente invenzione combinato con almeno un altro agente antitumorale, o con un agente antinfiammatorio o immunosoppressore. Esempi di agenti terapeutici che possono essere utilizzati in terapia di combinazione vengono descritti in maggior dettaglio sotto nella sezione sugli usi degli anticorpi dell'invenzione.

Come utilizzato qui, "veicolante farmaceuticamente accettabile" comprende qualsiasi e tutti i solventi, i mezzi di dispersione, i rivestimenti, gli agenti antibatterici ed antifungini, gli agenti isotonici e ritardanti l'assorbimento, e simili che sono fisiologicamente compatibili. Preferibilmente, il veicolante è adatto alla somministrazione endovenosa, intramuscolare, sottocutanea, parenterale, spinale o epidermica (per esempio per iniezione o per infusione). In relazione alla via di somministrazione, il principio attivo, cioè l'anticorpo, l'immunoconiugato o la molecola bispecifica, possono essere rivestiti di un materiale per proteggere il composto dall'azione di acidi e di altre condizioni naturali che possono inattivare il composto.

I composti farmaceutici della descrizione possono includere uno o più sali farmaceuticamente accettabili. Un "sale farmaceuticamente accettabile" si riferisce ad un sale che mantiene l'attività biologica desiderata del composto progenitore e non conferisce alcun effetto tossicologico indesiderato [si veda, per esempio Berge, S.M., *et al.* (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19]. Esempi di tali sali includono sali da addizione di acidi e sali da addizione di basi. I sali da addizione di acidi includono quelli derivati da acidi inorganici non tossici, quali cloridrico, nitrico, fosforico, solforico, bromidrico, iodidrico, fosforoso e simili, così come da acidi organici non tossici quali acidi monocarbossilici e dicarbossilici alifatici, acidi alcanoici sostituiti con fenile, acidi idrossialcanoici, acidi aromatici, acidi solfonici alifatici ed aromatici e simili. Sali da addizione di basi includono quelli derivati da metalli alcalino terrosi, quali sodio, potassio, magnesio, calcio e simili, così come da ammine organiche non tossiche, quali N,N'-dibenziletildiammina, N-metilglucammina, cloroprocaina, colina, dietanolammina, etilendiammina, procaina e simili.

Una composizione farmaceutica della descrizione può anche includere un antiossidante farmaceuticamente accettabile. Esempi di antiossidanti farmaceuticamente accettabili includono: (1) antiossidanti idrosolubili, quali acido ascorbico, cloridrato di cisteina, bisolfato di sodio, metabisolfato di sodio, solfito di sodio e simili; (2) antiossidanti solubili in olio, quali palmitato di ascorbilo, butilidrossianisolo (BHA), butilidrossitoluene (BHT), lecitina, gallato di propile, alfatocoferolo, e simili; e (3) metalli chelanti, quali acido citrico, acido etilendiamminotetraacetico (EDTA), sorbitolo, acido tartarico, acido fosforico, e simili.

Esempi di veicolanti acquosi e non acquosi adatti che possono essere impiegati nelle composizioni farmaceutiche della descrizione includono acqua, etanolo, polioli (quali glicerolo, propilenglicole, polietilenglicole, e simili), e loro miscele adatte, oli vegetali, quali olio d'oliva, ed esteri organici iniettabili, quali oleato di etile. La corretta fluidità può essere mantenuta, per esempio, mediante l'uso di materiali di rivestimento, quali lecitina, mediante il mantenimento della granulometria richiesta nel caso di dispersioni, e mediante l'uso di tensioattivi.

Queste composizioni possono anche contenere adiuvanti quali conservanti, agenti umettanti, agenti emulsionanti ed agenti disperdenti. La prevenzione della presenza di microrganismi può essere assicurata mediante sia procedure di sterilizzazione, sopra, sia mediante l'inclusione di vari agenti antibatterici ed antifungini, per esempio, parabene, clorobutanolo, fenolo acido sorbico, e simili. Può essere desiderabile anche includere agenti isotonici, quali zuccheri, cloruro di sodio, e simili nelle composizioni. Inoltre, l'assorbimento prolungato della forma farmaceutica iniettabile può essere veicolato dall'inclusione di agenti che ritardano l'assorbimento quali monostearato di alluminio e gelatina.

Veicolanti farmaceuticamente accettabili includono soluzioni o dispersioni acquose sterili e polveri sterili per la preparazione estemporanea di soluzioni o dispersioni iniettabili sterili. L'uso di tali mezzi ed agenti per sostanze farmaceuticamente attive è noto nell'arte. Eccetto nel caso in cui qualsiasi mezzo o agente convenzionale sia incompatibile con il principio attivo, il suo uso nelle composizioni farmaceutiche della

descrizione è contemplato. Nelle composizioni possono anche essere incorporati composti attivi aggiuntivi.

Le composizioni terapeutiche tipicamente devono essere sterili e stabili nelle condizioni di produzione e di immagazzinamento. La composizione può essere formulata come soluzione, microemulsione, liposoma, o altra struttura ordinata adatta alla concentrazione elevata di farmaco. Il veicolante può essere un solvente o un mezzo di dispersione contenente, per esempio, acqua, etanolo, un poliolo (per esempio glicerolo, propilenglicole e polietilenglicole liquido, e simili) e loro miscele adatte. La fluidità opportuna può essere mantenuta, per esempio, mediante l'uso di un rivestimento quale lecitina, mediante il mantenimento della granulometria richiesta nel caso della dispersione e mediante l'uso di tensioattivi. In molti casi, sarà preferibile includere agenti isotonici, per esempio, zuccheri, polialcoli quali mannitolo, sorbitolo, o cloruro di sodio nella composizione. L'assorbimento prolungato delle composizioni iniettabili può essere causato comprendendo nella composizione un agente che ritarda l'assorbimento, per esempio, sali di monostearato e gelatina.

Soluzioni sterili iniettabili possono essere preparate incorporando il principio attivo nella quantità richiesta in un solvente appropriato con uno o una combinazione di componenti elencati sopra, come richiesto, cui segue la microfiltrazione di sterilizzazione. Generalmente, le dispersioni vengono preparate incorporando il principio attivo in un veicolo sterile che contiene un mezzo di dispersione basico e gli altri componenti richiesti da quelli elencati sopra. Nel caso di polveri sterili per la preparazione di

soluzioni sterili iniettabili, i metodi di preparazione preferiti sono essiccamento sottovuoto e crioessiccamento (liofilizzazione) che forniscono una polvere del principio attivo oltre a qualsiasi ulteriore ingrediente desiderato da una loro soluzione sterile precedentemente filtrata.

La quantità di principio attivo che può essere combinata con un materiale veicolante per produrre una forma di dosaggio singola varierà in relazione al soggetto che viene trattato, e alla modalità di somministrazione particolare. La quantità di principio attivo che può essere combinata con un materiale veicolante per produrre una forma di dosaggio singola sarà in generale quella quantità della composizione che produce un effetto terapeutico. Generalmente, sul 100 per cento, questa quantità varierà da circa lo 0,01 per cento a circa il 99 per cento di principio attivo, preferibilmente da circa lo 0,1 per cento a circa il 70 per cento, il più preferibilmente da circa l'1 per cento a circa il 30 per cento di principio attivo in combinazione con un veicolante farmaceuticamente accettabile.

I regimi di trattamento vengono regolati per fornire la risposta ottimale desiderata (per esempio una risposta terapeutica). Per esempio, può essere somministrato un singolo bolo, diverse dosi suddivise possono essere somministrate nel tempo oppure la dose può essere ridotta o aumentata in proporzione come indicato dalle esigenze della situazione terapeutica. È specialmente vantaggioso il formulare composizioni parenterali in forma di dosaggio unitario per facilità di somministrazione e per uniformità di dosaggio. Forma di dosaggio unitario come utilizzata qui

si riferisce ad unità fisicamente separate adatte come dosaggi unitari per i soggetti da trattare; ciascuna unità contiene una quantità predeterminata di principio attivo calcolata per produrre l'effetto terapeutico desiderato in associazione con il veicolante farmaceutico richiesto. La descrizione di forme di unità di dosaggio della descrizione è dettata e direttamente dipendente da (a) le caratteristiche uniche del principio attivo ed il particolare effetto terapeutico da ottenere, e (b) le limitazioni intrinseche nell'arte del miscelare un tale principio attivo per il trattamento della sensibilità negli individui.

Per la somministrazione dell'anticorpo, il dosaggio varia da circa 0,0001 a 100 mg/kg, e più solitamente da 0,01 a 5 mg/kg, del peso dell'organismo ospite. Per esempio i dosaggi possono essere 0,3 mg/kg di peso corporeo, 1 mg/kg di peso corporeo, 3 mg/kg di peso corporeo, 5 mg/kg di peso corporeo o 10 mg/kg di peso corporeo o nell'intervallo di 1-10 mg/kg. Un regime di trattamento esemplare comporta la somministrazione di una volta alla settimana, una volta ogni due settimane, una volta ogni tre settimane, una volta ogni quattro settimane, una volta al mese, una volta ogni 3 mesi o una volta ogni da 3 a 6 mesi. Regimi di dosaggio preferiti per un anticorpo anti-BST1 dell'invenzione includono 1 mg/kg di peso corporeo o 3 mg/kg di peso corporeo mediante somministrazione endovenosa, fornendo l'anticorpo utilizzando uno dei seguenti regimi di trattamento: (i) ogni quattro settimane per sei dosaggi, quindi ogni tre mesi; (ii) ogni tre settimane; (iii) 3 mg/kg di peso corporeo una volta, seguito da 1 mg/kg di peso corporeo ogni tre settimane.

In alcuni metodi, due o più anticorpi monoclonali con specificità di legame differenti vengono somministrati simultaneamente, nel qual caso il dosaggio di ciascun anticorpo somministrato rientra negli intervalli indicati. L'anticorpo viene solitamente somministrato in molteplici occasioni. Gli intervalli tra i dosaggi singoli possono essere, per esempio, settimanalmente, mensilmente, ogni tre mesi o annualmente. Gli intervalli possono anche essere irregolari come indicato misurando i livelli nel sangue dell'anticorpo nei confronti dell'antigene bersaglio nel paziente. In alcuni metodi, il dosaggio viene regolato per raggiungere una concentrazione plasmatica dell'anticorpo di circa 1-1000 µg /ml ed in alcuni metodi circa 25-300 µg /ml.

In alternativa, l'anticorpo può essere somministrato come formulazione a rilascio prolungato, nel qual caso è richiesta una somministrazione meno frequente. Il dosaggio e la frequenza variano in relazione all'emivita dell'anticorpo nel paziente. In generale, gli anticorpi umani mostrano l'emivita più lunga, seguiti da anticorpi umanizzati, anticorpi chimerici e anticorpi non umani. Il dosaggio e la frequenza di somministrazione possono variare in relazione al fatto se il trattamento è profilattico o terapeutico. In applicazioni profilattiche, un dosaggio relativamente basso viene somministrato a intervalli relativamente non frequenti per un lungo periodo di tempo. Alcuni pazienti continuano a ricevere il trattamento per il resto della loro vita. In applicazioni terapeutiche, un dosaggio relativamente elevato a intervalli relativamente brevi è talvolta richiesto finché la progressione della malattia non si sia ridotta o non sia terminata, e preferibilmente finché il paziente non mostra

un miglioramento parziale o completo dei sintomi della malattia. In seguito, al paziente può essere somministrato un regime profilattico.

I livelli di dosaggio effettivi dei principi attivi nelle composizioni farmaceutiche della presente descrizione possono essere variati in modo tale da ottenere una quantità del principio attivo che sia efficace per ottenere la risposta terapeutica desiderata per un particolare paziente, composizione, e modalità di somministrazione, senza essere tossico per il paziente. Il livello di dosaggio scelto dipenderà da una varietà di fattori farmacocinetici compresi l'attività delle particolari composizioni della presente invenzione impiegate, o del loro estere, sale o ammidi, la via di somministrazione, il tempo di somministrazione, la velocità di escrezione del particolare composto che viene impiegato, la durata del trattamento, altri farmaci, composti e/o materiali utilizzati in combinazione con le particolari composizioni impiegate, l'età, il sesso, il peso, la condizione, la salute generale e l'anamnesi precedente del paziente che viene trattato, e fattori simili ben noti nell'arte medica.

Un "dosaggio terapeuticamente efficace" di un anticorpo anti-BST1 dell'invenzione preferibilmente porta ad una riduzione della gravità dei sintomi della malattia, un aumento di frequenza e della durata di periodi asintomatici della malattia, o una prevenzione del danneggiamento o dell'invalidità dovuti alla malattia. Per esempio, per il trattamento dei tumori mediati da BST1, un "dosaggio terapeuticamente efficace" inibisce preferibilmente la crescita cellulare o la crescita tumorale almeno circa del 20%, più preferibilmente almeno circa del 40%, ancora più preferibilmente almeno circa del 60%, ed ancora più preferibilmente almeno circa

dell'80% rispetto a soggetti non trattati. La capacità di un composto di inibire la crescita tumorale può essere valutata in un sistema modello animale predittivo dell'efficacia in tumori umani. In alternativa, questa proprietà di una composizione può essere valutata esaminando la capacità del composto di inibire la crescita cellulare, tale inibizione può essere misurata *in vitro* mediante saggi noti al medico esperto. Una quantità terapeuticamente efficace di un composto terapeutico può diminuire la dimensione del tumore, o altrimenti migliorare i sintomi in un soggetto. Una persona esperta nell'arte sarebbe in grado di determinare tali quantità sulla base di fattori quali la dimensione del soggetto, la gravità dei sintomi del soggetto, e la composizione particolare o la via di somministrazione scelta.

Una composizione della presente invenzione può essere somministrata attraverso una o più vie di somministrazione utilizzando uno o più tra una varietà di metodi noti nell'arte. Come sarà compreso da parte del tecnico esperto, la via e/o la modalità di somministrazione varieranno in relazione ai risultati desiderati. Vie di somministrazione preferite per gli anticorpi dell'invenzione includono endovenosa, intramuscolare, intradermica, intraperitoneale, sottocutanea, spinale o altre vie di somministrazione parenterale, per esempio per iniezione o per infusione. La frase "somministrazione parenterale" come utilizzata qui significa modalità di somministrazione diverse da somministrazione enterale e topica, solitamente per iniezione, ed include, senza limitazione, iniezione ed infusione endovenosa, intramuscolare, endoarteriosa, intratecale, intracapsulare, intraorbitale, intracardiaca, intradermica, intraperitoneale,

transtracheale, sottocutanea, subcuticolare, intrarticolare, subcapsulare, subaracnoidea, intraspinale, epidurale ed intrasternale.

In alternativa, un anticorpo dell'invenzione può essere somministrato attraverso una via non parenterale, quali le vie di somministrazione topica, epidermica o mucosale, per esempio, per via intranasale, per via orale, per via vaginale, per via rettale, per via sublinguale o per via topica.

I composti attivi possono essere preparati con veicolanti che proteggeranno il composto nei confronti del rilascio rapido, quale una formulazione a rilascio controllato, compresi impianti, cerotti transdermici, e sistemi di rilascio microincapsulati. Possono essere utilizzati polimeri biodegradabili, biocompatibili, quali etilen vinilacetato, polianidridi, acido poliglicolico, collagene, poliortoesteri, ed acido polilattico. Molti metodi per la preparazione di tali formulazioni sono brevettati o in generale noti a coloro che sono esperti nell'arte [si veda, per esempio *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems* (1978) a cura di J.R. Robinson, Marcel Dekker, Inc., N.Y].

Composizioni terapeutiche possono essere somministrate con dispositivi medici noti nell'arte. Per esempio, in una forma di realizzazione preferita, una composizione terapeutica dell'invenzione può essere somministrata con un dispositivo di iniezione ipodermica senza ago, quali i dispositivi descritti nei brevetti US 5,399,163, 5,383,851, 5,312,335, 5,064,413, 4,941,880, 4,790,824 o 4,596,556. Esempi di impianti e moduli ben noti utili nella presente invenzione includono: brevetto US 4,487,603, che descrive una pompa per microinfusione impiantabile per dispensare il

medicamento ad una velocità controllata; il brevetto US 4,486,194, che descrive un dispositivo terapeutico per somministrare medicinali attraverso la pelle; il brevetto US 4,447,233, che descrive una pompa per infusione di un medicamento per rilasciare il medicamento ad una velocità di infusione precisa; il brevetto US 4,447,224, che descrive un apparecchio per infusione impiantabile a flusso variabile per rilascio continuo del farmaco; il brevetto US 4,439,196, che descrive un sistema di rilascio osmotico di farmaci avente compartimenti a camere multiple; ed il brevetto US 4,475,196, che descrive un sistema di rilascio osmotico di farmaci. Molti altri tali impianti, sistemi di rilascio e moduli sono noti a coloro che sono esperti nell'arte.

In alcune forme di realizzazione, gli anticorpi monoclonali dell'invenzione possono essere formulati per garantire una distribuzione opportuna *in vivo*. Per esempio, la barriera ematoencefalica (BEE) esclude molti composti altamente idrofilici. Per garantire che i composti terapeutici dell'invenzione attraversino la BEE (se desiderato), essi possono essere formulati, per esempio, in liposomi. Per metodi di produzione dei liposomi, si vedano, per esempio i brevetti US 4,522,811, 5,374,548 e 5,399,331. I liposomi possono comprendere uno o più gruppi funzionali che vengono trasportati selettivamente in cellule o in organi specifici, così aumentano il rilascio mirato del farmaco [si veda, per esempio V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685]. Gruppi funzionali esemplari di indirizzamento a bersaglio includono folato o biotina (si veda, per esempio il brevetto US 5,416,016); mannosidi [Umezawa *et al.* (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038];

anticorpi [P.G. Bloeman *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180]; recettore della proteina A del surfattante [Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134]; p120 [Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090]; si veda anche K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273.

Usi e metodi

Gli anticorpi, le composizioni anticorpali ed i metodi della presente invenzione hanno numerose utilità diagnostiche e terapeutiche *in vitro* ed *in vivo* riguardanti la diagnosi ed il trattamento di disturbi mediati da BST1.

In alcune forme di realizzazione, queste molecole possono essere somministrate a cellule in coltura, *in vitro* o *ex vivo*, o a soggetti umani, per esempio *in vivo*, per trattare, per prevenire e per diagnosticare una varietà di disturbi. Come utilizzato qui, il termine "soggetto" intende includere animali umani e diversi dall'uomo. Animali diversi dall'uomo includono tutti i vertebrati, per esempio mammiferi e non mammiferi, quali primati diversi dall'uomo, pecora, cani, gatti, mucche, cavalli, polli, anfibi e rettili. I soggetti preferiti includono pazienti umani aventi disturbi mediati dall'attività di BST1. I metodi sono particolarmente adatti per trattare pazienti umani aventi un disturbo associato all'espressione aberrante di BST1. Quando gli anticorpi nei confronti di BST1 vengono somministrati insieme ad un altro agente, i due possono essere somministrati in qualsiasi ordine o simultaneamente.

Dato il legame specifico degli anticorpi dell'invenzione per BST1, gli anticorpi dell'invenzione possono essere utilizzati per rilevare

specificamente l'espressione di BST1 sulla superficie delle cellule e, inoltre, possono essere utilizzati per purificare BST1 attraverso la purificazione per immunoaffinità.

Inoltre, data l'espressione di BST1 sulle cellule tumorali, gli anticorpi, le composizioni anticorpali ed i metodi della presente invenzione possono essere utilizzati per trattare un soggetto con un disturbo oncogeno, per esempio un disturbo caratterizzato dalla presenza di cellule tumorali esprimenti BST1 comprese, per esempio leucemia mieloide acuta (LMA), leucemia linfocitica cronica dei linfociti B, cancro della mammella, cancro del colon-retto, cancro del rene, cancro della testa e del collo, cancro del polmone, cancro ovarico e cancro del pancreas. È stato dimostrato che BST1 viene internalizzato a seguito del legame dell'anticorpo come illustrato nell'Esempio 5 sotto, permettendo così che gli anticorpi dell'invenzione vengano utilizzati in qualsiasi meccanismo utile d'azione, per esempio un approccio di ADC, un radioimmunoconiugato, o approccio di ADEPT.

In un esempio, gli anticorpi (per esempio anticorpi monoclonali, molecole multispecifiche e bispecifiche e composizioni) della descrizione possono essere utilizzati per rilevare i livelli di BST1, o livelli di cellule che contengono BST1 sulla loro superficie della membrana, i quali livelli possono quindi essere legati a certi sintomi della malattia. In alternativa, gli anticorpi possono essere utilizzati per inibire o per bloccare la funzione di BST1 il che, a sua volta, può essere legato alla prevenzione o al miglioramento di certi sintomi della malattia, implicando quindi il BST1 come mediatore della malattia. Questo può essere ottenuto mettendo a

contatto un campione ed un campione di controllo con l'anticorpo anti-BST1 in condizioni che permettano la formazione di un complesso tra l'anticorpo e BST1. Qualsiasi complesso formato tra l'anticorpo ed il BST1 viene rilevato e confrontato nel campione e nel controllo.

In un altro esempio, gli anticorpi (per esempio anticorpi monoclonali, molecole multispecifiche e bispecifiche e composizioni) della descrizione possono essere inizialmente testati per l'attività di legame associata a uso terapeutico o diagnostico *in vitro*. Per esempio, composizioni della descrizione possono essere testate utilizzando i saggi di flusso citometrico descritti negli Esempi sotto.

Gli anticorpi (per esempio anticorpi monoclonali, molecole multispecifiche e bispecifiche, immunoconiugati e composizioni) dell'invenzione hanno ulteriore utilità nella terapia di malattie correlate a BST1. Per esempio, gli anticorpi monoclonali, le molecole multispecifiche o bispecifiche e gli immunoconiugati possono essere utilizzati per provocare *in vivo* o *in vitro* una o più delle seguenti attività biologiche: inibire la crescita di una cellula esprimente BST1 e/o ucciderla; mediare la fagocitosi o l'ADCC di una cellula esprimente BST1 in presenza di cellule effettrici umane, o bloccare il legame del ligando di BST1 a BST1.

In una forma di realizzazione particolare, gli anticorpi (per esempio anticorpi monoclonali, molecole multispecifiche e bispecifiche e composizioni) vengono utilizzati *in vivo* per trattare, prevenire o diagnosticare una varietà di malattie correlate a BST1. Esempi di malattie correlate a BST1 includono, tra gli altri, tessuti umani cancerosi rappresentanti leucemia mieloide acuta (LMA), leucemia linfocitica cronica

dei linfociti B, cancro della mammella, cancro del colon-retto, cancro del rene, cancro della testa e del collo, cancro del polmone, cancro ovarico e cancro del pancreas.

Vie di somministrazione adatte delle composizioni anticorpali (per esempio anticorpi monoclonali, molecole multispecifiche e bispecifiche e immunoconiugati) dell'invenzione *in vivo* ed *in vitro* sono ben note nell'arte e possono essere scelte da parte di coloro che sono di abilità ordinaria. Per esempio, le composizioni anticorpali possono essere somministrate mediante iniezione (per esempio endovenosa o sottocutanea). Dosaggi adatti delle molecole utilizzate dipenderanno dall'età e dal peso del soggetto e dalla concentrazione e/o dalla formulazione della composizione anticorpale.

Come descritto precedentemente, gli anticorpi anti-BST1 dell'invenzione possono essere cosomministrati con uno o con più ulteriori agenti terapeutici, per esempio un agente citotossico, un agente radiotossico o un agente immunosoppressore. L'anticorpo può essere legato all'agente (come immunocomplesso) o può essere somministrato separato dall'agente. In quest'ultimo caso (somministrazione separata), l'anticorpo può essere somministrato prima, dopo o simultaneamente con l'agente o può essere cosomministrato con altre terapie note, per esempio una terapia antitumorale, per esempio radiazione. Tali agenti terapeutici includono, tra gli altri, agenti antineoplastici quali doxorubicina (adriamicina), cisplatino bleomicina solfato, carmustina, clorambucile e ciclofosfamide idrossiurea che, di per sé, sono efficaci solo a livelli che sono tossici o sub-tossici per un paziente. Il cisplatino viene somministrato

per via endovenosa come dose di 100 mg/kg una volta ogni quattro settimane e l'adriamicina viene somministrata per via endovenosa come dose di 60-75 mg/ml una volta ogni 21 giorni. Altri agenti adatti per cosomministrazione con gli anticorpi dell'invenzione includono altri agenti utilizzati per il trattamento di tumori, per esempio leucemia mieloide acuta (LMA), leucemia linfocitica cronica dei linfociti B, cancro della mammella, cancro del colon-retto, cancro del rene, cancro della testa e del collo, cancro del polmone, cancro ovarico o cancro del pancreas, quale Avastin[®], 5FU e gemcitabina. La cosomministrazione degli anticorpi anti-BST1 o di loro frammenti leganti l'antigene, della presente invenzione con agenti chemioterapici fornisce due agenti antitumorali che funzionano tramite meccanismi differenti che danno un effetto citotossico per le cellule tumorali umane. Tale cosomministrazione può risolvere i problemi dovuti allo sviluppo di resistenza ai farmaci o ad un cambiamento nell'antigenicità delle cellule tumorali che le renderebbero non reattive con l'anticorpo.

Cellule effettrici specifiche per il bersaglio, per esempio cellule effettrici legate a composizioni (per esempio anticorpi monoclonali, molecole multispecifiche e bispecifiche) dell'invenzione possono anche essere utilizzate come agenti terapeutici. Le cellule effettrici per il l'indirizzamento possono essere leucociti umani quali macrofagi, neutrofili o monociti. Altre cellule includono eosinofili, linfociti natural killer ed altre cellule recanti il recettore di IgG o di IgA. Se si desidera, le cellule effettrici possono essere ottenute dal soggetto da trattare. Le cellule effettrici specifiche per il bersaglio possono essere somministrate come sospensione di cellule in una soluzione fisiologicamente accettabile. Il

numero di cellule somministrate può essere nell'ordine di 10^8 - 10^9 , ma varierà in relazione allo scopo terapeutico. In generale, la quantità sarà sufficiente ad ottenere la localizzazione a livello della cellula bersaglio, per esempio una cellula tumorale esprimente BST1, e ad influenzare la morte della cellula mediante, per esempio fagocitosi. Le vie di somministrazione possono anche variare.

La terapia con cellule effettrici specifiche per il bersaglio può essere eseguita in combinazione con altre tecniche per la rimozione di cellule bersaglio. Per esempio, la terapia antitumorale che utilizza le composizioni (per esempio anticorpi monoclonali, molecole multispecifiche e bispecifiche) dell'invenzione e/o cellule effettrici munite di queste composizioni può essere utilizzata in combinazione con chemioterapia. Inoltre, l'immunoterapia di combinazione può essere utilizzata per dirigere due popolazioni effettrici citotossiche distinte verso il rigetto di cellule tumorali. Per esempio, anticorpi anti-BST1 legati ad anti-Fc-gamma RI o anti-CD3 possono essere utilizzati in combinazione con agenti di legame specifici per il recettore dell'IgG o dell'IgA.

Molecole bispecifiche e multispecifiche dell'invenzione possono anche essere utilizzate per modulare i livelli di FcγR o di FcγR sulle cellule effettrici, come mediante incapsulazione ed eliminazione dei recettori sulla superficie cellulare. Anche miscele di anti-recettori di Fc possono essere utilizzate per questo scopo.

Le composizioni (per esempio anticorpi monoclonali, molecole multispecifiche e bispecifiche e immunoconiugati) dell'invenzione che hanno siti di legame al complemento, quali porzioni da IgG1, IgG2, o IgG3

o IgM che si legano al complemento, possono anche essere utilizzate in presenza del complemento. In una forma di realizzazione, il trattamento *ex vivo* di una popolazione di cellule comprendente cellule bersaglio con un agente legante dell'invenzione e cellule effettrici appropriate può essere arricchito dall'aggiunta del complemento o di siero contenente il complemento. La fagocitosi di cellule bersaglio rivestite con un agente legante dell'invenzione può essere migliorata dal legame delle proteine del complemento. In un'altra forma di realizzazione cellule bersaglio rivestite con le composizioni (per esempio anticorpi monoclonali, molecole multispecifiche e bispecifiche) dell'invenzione possono anche essere lisate dal complemento. In ancora un'altra forma di realizzazione, le composizioni dell'invenzione non attivano il complemento.

Le composizioni (per esempio anticorpi monoclonali, molecole multispecifiche e bispecifiche e immunoconiugati) dell'invenzione possono anche essere somministrate insieme al complemento. In alcune forme di realizzazione, la presente descrizione fornisce composizioni comprendenti anticorpi, molecole multispecifiche o bispecifiche e siero o complemento. Queste composizioni possono essere vantaggiose quando il complemento è posizionato in stretta vicinanza agli anticorpi, molecole multispecifiche o bispecifiche. In alternativa, gli anticorpi, molecole multispecifiche o bispecifiche dell'invenzione ed il complemento o il siero possono essere somministrati separatamente.

Inoltre nell'ambito della presente descrizione vi sono kit comprendenti le composizioni anticorpali dell'invenzione (per esempio anticorpi monoclonali, molecole bispecifiche o multispecifiche, o

immunoconiugati) ed istruzioni per l'uso. Il kit può inoltre contenere uno o più ulteriori reagenti, quali un reagente immunosoppressore, un agente citotossico o un agente radiotossico, oppure uno o più ulteriori anticorpi dell'invenzione (per esempio un anticorpo avente un'attività del complemento che si lega ad un epitopo nell'antigene BST1 distinto dal primo anticorpo).

Conseguentemente, pazienti trattati con le composizioni anticorpali dell'invenzione possono essere inoltre somministrate (prima, simultaneamente, o dopo la somministrazione di un anticorpo dell'invenzione) con un altro agente terapeutico, quale un agente citotossico o radiotossico, che accresce o aumenta l'effetto terapeutico degli anticorpi.

In altre forme di realizzazione, il soggetto può essere inoltre trattato con un agente che modula, per esempio accresce o inibisce, l'espressione o l'attività di Fc γ o recettori per l'Fc γ , per esempio, trattando il soggetto con una citochina. Citochine preferite per la somministrazione durante il trattamento con la molecola multispecifica includono il fattore stimolante le colonie di granulociti (G-CSF), il fattore di stimolazione delle colonie dei granulociti-macrofagi (GM-CSF), l'interferone γ (IFN- γ) ed il fattore di necrosi tumorale (TNF).

Le composizioni (per esempio anticorpi, molecole multispecifiche e bispecifiche) della descrizione possono anche essere utilizzate per colpire cellule esprimenti Fc γ R o BST1, per esempio, per la marcatura di tali cellule. Per tale uso, l'agente legante può essere legato ad una molecola che può essere rilevata. Così, la descrizione fornisce metodi per

localizzare *ex vivo* o *in vitro* cellule esprimenti recettori per l'Fc, quali FcγR, o BST1. Il tracciante rilevabile può essere, per esempio, un radioisotopo, un composto fluorescente, un enzima o un cofattore enzimatico.

In un esempio particolare, la descrizione fornisce metodi per rilevare la presenza dell'antigene BST1 in un campione, o per misurare la quantità dell'antigene BST1, comprendente il mettere a contatto il campione, ed un campione di controllo, con un anticorpo monoclonale, o una sua porzione legante l'antigene, che si lega specificamente al BST1, in condizioni che permettano la formazione di un complesso tra l'anticorpo o sua porzione e BST1. La formazione di un complesso viene quindi rilevata, in cui una differenza di formazione del complesso tra il campione rispetto al campione di controllo è indicativa della presenza dell'antigene BST1 nel campione.

In altri esempi, la descrizione fornisce metodi per trattare un disturbo mediato da BST1 in un soggetto, per esempio tumori umani e malattia infiammatoria umana, comprese le malattie dell'invenzione.

In ancora un altro esempio, gli immunoconiugati dell'invenzione possono essere utilizzati per indirizzare composti desiderati (per esempio agenti terapeutici, marcatori, citotossine, radiotossine, immunosoppressori, ecc.) a cellule che hanno recettori della superficie cellulare per BST1 legando tali composti all'anticorpo. Per esempio, un anticorpo anti-BST1 può essere coniugato a qualsiasi dei composti di tossine descritti nei brevetti US 6,281,354 e 6,548,530, nelle pubblicazioni di brevetto US 2003/0050331, 2003/0064984, 2003/0073852 e

2004/0087497, o pubblicati in WO 03/022806. Così, la descrizione fornisce anche metodi per localizzare *ex vivo* o *in vivo* cellule esprimenti BST1 (per esempio con un tracciante rilevabile, quale un radioisotopo, un composto fluorescente, un enzima, o un cofattore enzimatico). In alternativa, gli immunoconiugati possono essere utilizzati per uccidere le cellule che hanno recettori della superficie cellulare per BST1 mediante l'indirizzamento di citotossine o radiotossine a BST1.

Tutti i riferimenti citati in questa descrizione, compresi senza limitazione tutti gli articoli, le pubblicazioni, i brevetti, le domande di brevetto, le presentazioni, i testi, le relazioni, i manoscritti, gli opuscoli, i libri, le pubblicazioni in internet, gli articoli di riviste, i periodici, i fogli informativi dei prodotti, e simili. La discussione dei riferimenti qui è intesa solamente riassumere le affermazioni fatte dai loro autori e nessuna ammissione viene fatta che qualsiasi riferimento costituisca lo stato dell'arte e i richiedenti si riservano il diritto di contestare l'accuratezza e la pertinenza dei riferimenti citati.

La presente invenzione viene ulteriormente illustrata dagli esempi seguenti che non dovrebbero essere intesi come ulteriormente limitanti.

Esempio 1: Costruzione di una libreria di esposizione fagica

Una proteina ricombinante costituita dagli amminoacidi 29-292 di BST1 (SEQ ID NO:44) è stata sintetizzata per via eucariotica mediante metodi ricombinanti standard ed utilizzata come antigene per l'immunizzazione.

Immunizzazione ed isolamento dell'mRNA

Una libreria di esposizione fagica per l'identificazione delle molecole leganti BST1 è stata costruita come segue. Topi A/J (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine) sono stati immunizzati per via intraperitoneale con l'antigene BST1 ricombinante (il dominio extracellulare), utilizzando 100 µg di proteina in adiuvante completo di Freund, il giorno 0, e con 100 µg di antigene il giorno 28. Prelievi di sangue per il test di topi sono stati ottenuti attraverso puntura del seno retroorbitale. Se, testando i titoli, essi sono stati ritenuti elevati mediante ELISA utilizzando l'antigene BST1 biotinilato immobilizzato, mediante piastre di polistirene rivestite con neutravidina (Reacti-Bind™) NeutrAvidin(TM), Pierce, Rockford, Illinois), i topi sono stati sottoposti a richiamo con 100 µg di proteina i giorni 70, 71 e 72, con successivi sacrificio e splenectomia il giorno 77. Se i titoli anticorpali non sono stati ritenuti soddisfacenti, i topi sono stati sottoposti a richiamo con 100 µg di antigene il giorno 56 ed un prelievo di sangue per il test è stato effettuato il giorno 63. Se sono stati ottenuti titoli soddisfacenti, gli animali sono stati stimolati con 100 µg di antigene i giorni 98, 99 e 100 e le milze sono state raccolte il giorno 105.

Le milze sono state raccolte in una cappa a flusso laminare e trasferite ad una piastra di Petri, rimuovendo mediante taglio e scartando il grasso ed il tessuto connettivo. Le milze sono state macerate velocemente con lo stantuffo da una siringa da 5 cc sterile in presenza di 1,0 ml della soluzione D (25,0 g guanidina tiocianato (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Indiana), 29,3 ml d'acqua sterile, 1,76 ml di citrato di sodio 0,75 M pH 7,0, 2,64 ml di Sarkosyl al 10% (Fisher Scientific, Pittsburgh,

Pennsylvania), 0,36 ml 2-mercaptoetanol (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pennsylvania). Questa sospensione della milza è stata aspirata attraverso un ago da 18 gauge finché tutte le cellule non fossero state lisate e la soluzione viscosa non fosse stata trasferita ad una provetta da microcentrifuga. La piastra di Petri è stata lavata con 100 µl di soluzione D per recuperare qualsiasi porzione di milza rimanente. Questa sospensione è stata quindi aspirata attraverso un ago da 22 gauge per ulteriori 5-10 volte.

Il campione è stato diviso uniformemente tra due provette da microcentrifuga ed è stato aggiunto quanto segue, nell'ordine, con miscelazione mediante inversione dopo ciascuna aggiunta: 50 µl di acetato di sodio 2 M pH 4,0, 0,5 ml di acqua-fenolo saturo (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pennsylvania), 100 µl di cloroformio/alcol isoamilico 49:1 (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pennsylvania). La soluzione è stata agitata su Vortex per 10 s ed incubata su ghiaccio per 15 minuti. In seguito alla centrifugazione a 14 krpm per 20 minuti a 2-8°C, la fase acquosa è stata trasferita ad una provetta fresca. È stato aggiunto un volume uguale di acqua fenolo saturo:cloroformio:alcol isoamilico (50:49:1), e la provetta è stata agitata mediante Vortex per dieci secondi. Dopo l'incubazione di 15 min su ghiaccio, il campione è stato centrifugato per 20 minuti a 2-8°C, e la fase acquosa è stata trasferita ad una provetta fresca e fatta precipitare con un volume uguale di isopropanolo a -20°C per un minimo di 30 minuti. In seguito alla centrifugazione a 14 krpm per 20 minuti a 4°C, il surnatante è stato rimosso mediante aspirazione, le

provette sono state brevemente centrifugate e tutte le tracce di liquido sono state rimosse dal precipitato di RNA.

I precipitati di RNA sono stati ciascuno disciolti in 300 μ l di soluzione D, combinati, e fatti precipitare con un volume uguale di isopropanolo a -20°C per un minimo di 30 minuti. Il campione è stato centrifugato 14 krpm per 20 minuti a 4°C , il surnatante è stato aspirato come prima, ed il campione risciacquato con 100 μ l di etanolo al 70% raffreddato con ghiaccio. Il campione è stato ancora centrifugato a 14 krpm per 20 minuti a 4°C , la soluzione in etanolo al 70% è stata aspirata, e l'RNA precipitato essiccato sottovuoto. Il precipitato è stato risospeso in 100 μ l di acqua trattata con dietil pirocarbonato sterile. La concentrazione è stata determinata mediante A260 utilizzando un'assorbanza di 1,0 per una concentrazione di 40 $\mu\text{g/ml}$. Gli RNA sono stati conservati a -80°C .

Preparazione di DNA complementare (cDNA)

L'RNA totale purificato da milze di topo come descritto sopra è stato utilizzato direttamente come stampo per la preparazione del cDNA. L'RNA (50 μg) è stato diluito a 100 μ l con acqua sterile, e sono stati aggiunti 10 μ l di oligo dT12 130 ng/ μ l (sintetizzato sul sintetizzatore di DNA Applied Biosystems modello 392). Il campione è stato scaldato per 10 minuti a 70°C , quindi raffreddato su ghiaccio. Sono stati aggiunti 40 μ l di tampone del primo filamento 5* (Gibco/BRL, Gaithersburg, Maryland), insieme a 20 μ l ditiotreitolo 0,1M (Gibco/BRL, Gaithersburg, Maryland), 10 μ l di deossinucleosidi trifosfati 20 mM (dNTP, Boehringer Mannheim, Indianapolis, Indiana), e 10 μ l d'acqua su ghiaccio. Il campione è stato quindi incubato a 37°C per 2 minuti. Dieci microlitri di trascrittasi inversa

(Superscript™ II, Gibco/BRL, Gaithersburg, Maryland) sono stati aggiunti e l'incubazione è proseguita a 37°C per 1 ora. I prodotti di cDNA sono stati utilizzati direttamente per la reazione a catena della polimerasi (PCR).

Amplificazione di geni anticorpali mediante PCR

Per amplificare sostanzialmente tutti i geni delle catene H e L utilizzando la PCR, sono stati scelti inneschi che corrispondevano a sostanzialmente tutte le sequenze pubblicate. Poiché le sequenze nucleotidiche dei terminali amminici di H e L contengono considerevole diversità, 33 oligonucleotidi sono stati sintetizzati per servire come inneschi 5' per le catene H, e 29 oligonucleotidi sono stati sintetizzati per servire come inneschi 5' per le catene L kappa come descritto in US 6,555,310. Le sequenze nucleotidiche della regione costante per ciascuna catena hanno richiesto solo un innesco 3' per le catene H ed un innesco 3' per le catene L kappa.

Una reazione di 50 µl è stata condotta per ciascuna coppia di inneschi con 50 µmol di innesco 5', 50 µmol di innesco 3', 0,25 µl di DNA polimerasi Taq (5 unità/µl, Boehringer Mannheim, Indianapolis, Indiana), 3 µl di cDNA (preparato come descritto), 5 µl di dNTP 2 mM, 5 µl di tampone per la DNA polimerasi 10*Taq con MgCl₂ (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Indiana) e H₂O fino a 50 µl. L'amplificazione è stata effettuata utilizzando un termociclatore GeneAmp(R) 9600 (Perkin Elmer, Foster City, California) con il seguente programma di termociclazione: 94°C per 1 min; 30 cicli di 94°C per 20 s, 55°C per 30 s, e 72°C per 30 s, 72°C per 6 min; 4°C.

I prodotti di dsDNA del procedimento di PCR sono stati sottoposti quindi a PCR asimmetrica utilizzando solo un innesco 3' per generare sostanzialmente solo il filamento antisenso dei geni bersaglio. Una reazione di 100 μ l è stata effettuata per ciascun prodotto di dsDNA con 200 μ mol di innesco 3', 2 μ l di prodotto di ds-DNA, 0,5 μ l di DNA polimerasi Taq, 10 μ l di dNTP 2 mM, 10 μ l di tampone per la DNA polimerasi 10*Taq con MgCl₂ (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Indiana) e H₂O fino a 100 μ l. Lo stesso programma di PCR di quello descritto sopra è stato utilizzato per amplificare il DNA a singolo filamento (ss).

Purificazione di DNA a singolo filamento mediante cromatografia liquida a pressione elevata e fosforilazione del DNA a singolo filamento

I prodotti di ss-PCR della catena H ed i prodotti di PCR a singolo filamento della catena L sono stati fatti precipitare con etanolo aggiungendo 2,5 volumi di etanolo e 0,2 volumi di acetato d'ammonio 7,5 M ed incubando a -20°C per almeno 30 min. Il DNA è stato precipitato centrifugando in una centrifuga per Eppendorf a 14 krpm per 10 minuti a 2-8°C. Il surnatante è stato aspirato con attenzione, e le provette sono state brevemente centrifugate una seconda volta. L'ultima goccia di surnatante è stata rimossa con una pipetta. Il DNA è stato essiccato sottovuoto per 10 minuti a calore medio. I prodotti della catena H sono stati raggruppati in 210 μ l d'acqua ed i prodotti della catena L sono stati raggruppati separatamente in 210 μ l d'acqua. Il DNA a singolo filamento è stato purificato mediante cromatografia liquida a prestazione elevata (HPLC) utilizzando una HPLC Hewlett Packard 1090 ed una colonna a

scambio anionico Gen-Pak™ FAX (Millipore Corp., Milford, Massachusetts). Il gradiente utilizzato per purificare il DNA a singolo filamento viene mostrato nella Tabella 1, e la temperatura del forno è stata 60°C. L'assorbanza è stata monitorata a 260 nm. Il DNA a singolo filamento eluito dall'HPLC è stato raccolto in frazioni a 0,5 minuti. Le frazioni contenenti DNA a singolo filamento sono state fatte precipitare con etanolo, precipitate ed essiccate come descritto sopra. I precipitati di DNA essiccato sono stati raggruppati in 200 µl d'acqua sterile.

Tabella 1 - Gradiente di HPLC per la purificazione di ss-DNA

Tempo (min)	%A	%B	%C	Flusso (ml/min)
0	70	30	0	0.75
2	40	60	0	0.75
17	15	85	0	0.75
18	0	100	0	0.75
23	0	100	0	0.75
24	0	0	100	0.75
28	0	0	100	0.75
29	0	100	0	0.75
34	0	100	0	0.75
35	70	30	0	0.75

Il tampone A è Tris 25 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0

Il tampone B è Tris 25 mM, EDTA 1 mM, NaCl 1 M, pH 8,0

Il tampone C è acido fosforico 40 mM

Il DNA a singolo filamento è stato fosforilato in 5' in preparazione della mutagenesi. Ventiquattro microlitri di tampone per chinasi 10* (United States Biochemical, Cleveland, Ohio), 10,4 µl di adenosina-5'-trifosfato 10 mM (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Indiana) e 2 µl di polinucleotide chinasi (30 unità/µl, United States Biochemical, Cleveland, Ohio) sono stati aggiunti a ciascun campione, e le provette sono state incubate a 37°C per 1 h. Le reazioni sono state fermate incubando le

provette a 70°C per 10 min. Il DNA è stato purificato con un'estrazione di fenolo equilibrato in Tris (pH>8,0, United States Biochemical, Cleveland, Ohio):cloroformio:alcol isoamilico (50:49:1) ed un'estrazione con cloroformio:alcol isoamilico (49:1). Dopo le estrazioni, il DNA è stato fatto precipitare con etanolo e precipitato come descritto sopra. I precipitati di DNA sono stati essiccati, quindi disciolti in 50 µl di acqua sterile. La concentrazione è stata determinata misurando l'assorbanza di un'aliquota del DNA a 260 nm utilizzando 33 µg/ml per un'assorbanza di 1,0. I campioni sono stati conservati a -20°C.

Preparazione di stampi con uracile utilizzati nella generazione di librerie fagiche anticorpali di milza

Un millilitro di una coltura di una notte di *E. coli* CJ236 (BioRAD, Hercules, California) è stato aggiunto a 50 ml di 2*YT in un pallone con frangiflutti da 250 ml. La coltura è stata lasciata crescere a 37°C fino a DO600=0,6, inoculata con 10 µl di una diluizione 1/100 di stock del vettore di fago BS45 (descritto in US 6,555,310) e la crescita è stata continuata per 6 ore. Approssimativamente 40 ml della coltura sono stati centrifugati a 12 krpm per 15 minuti a 4°C. Il surnatante (30 ml) è stato trasferito in una provetta da centrifuga fresca ed incubato a temperatura ambiente per 15 minuti dopo l'aggiunta di 15 µl di RNasiA 10 mg/ml (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Indiana). I fagi sono stati fatti precipitare mediante l'aggiunta di 7,5 ml di polietilenglicole 8000 al 20% (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pennsylvania)/acetato d'ammonio 3,5 M (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) ed incubazione in ghiaccio per 30 minuti. Il campione è stato centrifugato a 12 krpm per 15 min a 2-8°C. Il

surnatante è stato eliminato con attenzione, e la provetta è stata centrifugata brevemente per rimuovere tutte le tracce di surnatante. Il precipitato è stato risospeso in 400 µl di tampone a concentrazione salina elevata (NaCl 300 mM, Tris 100 mM pH 8,0, EDTA 1 mM), e trasferito in una provetta da 1,5 ml.

Lo stock di fago è stato estratto ripetutamente con un volume uguale di fenolo equilibrato:cloroformio:alcol isoamilico (50:49:1) finché non fosse visibile alcuna traccia di un'interfaccia bianca, e quindi estratto con un volume uguale di cloroformio:alcol isoamilico (49:1). Il DNA è stato fatto precipitare con 2,5 volumi di etanolo e 1/5 volumi di acetato d'ammonio 7,5 M ed incubato per 30 minuti a -20°C. Il DNA è stato centrifugato a 14 krpm per 10 minuti a 4°C, il precipitato lavato una volta con etanolo freddo al 70%, ed essiccato sottovuoto. Il DNA stampo con uracile è stato disciolto in 30 µl di acqua sterile e la concentrazione determinata mediante A260 utilizzando un'assorbanza di 1,0 per una concentrazione di 40 µg/ml. Lo stampo è stato diluito a 250 ng/µl con acqua sterile, suddiviso in aliquote e conservato a -20°C.

Mutagenesi dello stampo con uracile con ss-DNA ed elettroporazione in *E. coli* per generare librerie fagiche di anticorpi

Librerie di esposizione fagica di anticorpi sono state generate introducendo simultaneamente geni delle catene pesanti e leggere a filamento singolo su uno stampo con uracile del vettore di esposizione fagica. Una mutagenesi tipica è stata eseguita su una scala da 2 µg miscelando quanto segue in una provetta per reazione di PCR da 0,2 ml: 8 µl di stampo con uracile (250 ng/µl), 8 µl di tampone di ibridazione 10*

(Tris 200 mM pH 7,0, MgCl₂ 20 mM, NaCl 500 mM), 3,33 µl di inserto della catena pesante a filamento singolo fosforilato (100 ng/µl), 3,1 µl di inserto della catena leggera a filamento singolo fosforilato (100 ng/µl) ed acqua sterile a 80 µl. Il DNA è stato fatto appaiare in un termociclatore GeneAmp(R) 9600 utilizzando il seguente profilo termico: 20 s a 94°C, 85°C per 60 s, innalzamento da 85°C a 55°C nel corso di 30 min, mantenimento a 55°C per 15 min. Il DNA è stato trasferito su ghiaccio dopo la fine del programma. L'estensione/ligazione è stata realizzata aggiungendo 8 µl di tampone di sintesi 10* (ciascun dNTP 5 mM, ATP 10 mM, Tris 100 mM pH 7,4, MgCl₂ 50 mM, DTT 20 mM), 8 µl di DNA ligasi T4 (1 U/µl, Boehringer Mannheim, Indianapolis, Indiana), 8 µl di DNA polimerasi T7 diluita (1 U/µl, New England BioLabs, Beverly, Massachusetts) ed incubando a 37°C per 30 minuti. La reazione è stata fermata con 300 µl di tampone di arresto della mutagenesi (Tris 10 mM pH 8,0, EDTA 10 mM). Il DNA della mutagenesi è stato estratto una volta con fenolo equilibrato (pH>8):cloroformio:alcol isoamilico (50:49:1), una volta con cloroformio:alcol isoamilico (49:1), ed il DNA è stato fatto precipitare con etanolo a -20°C per almeno 30 min. Il DNA è stato precipitato ed il surnatante rimosso con attenzione come descritto sopra. Il campione è stato centrifugato brevemente ancora e tutte le tracce di etanolo sono state rimosse con una pipetta Pipetman. Il precipitato è stato essiccato sottovuoto. Il DNA è stato risospeso in 4 µl d'acqua sterile.

Un microlitro di DNA di mutagenesi (500 ng) è stato trasferito in 40 µl *E. coli* DH12S elettrocompetenti (Gibco/BRL, Gaithersburg, Maryland) utilizzando l'elettroporazione. Le cellule trasformate sono state miscelate

con approssimativamente 1,0 ml di cellule XL-1 per una notte che sono state diluite con terreno di coltura 2*YT al 60% del volume originale. Questa miscela è stata quindi trasferita ad una provetta da coltura sterile da 15 ml e 9 ml di top agar sono stati aggiunti per piastratura su una piastra di agar LB da 150 mm. Le piastre sono state incubate per 4 ore a 37°C e quindi trasferite a 20°C per una notte. I fagi anticorpali del primo ciclo sono stati preparati eluendo i fagi da queste piastre in 10 ml di 2*YT, rimuovendo i detriti mediante centrifugazione, e prendendo il surnatante. Questi campioni sono le librerie di esposizione fagica di anticorpi utilizzati per selezionare anticorpi nei confronti del BST1. L'efficienza delle elettroporazioni è stata misurata piastrando 10 µl di una diluizione 10⁻⁴ di cellule in sospensione su piastre di agar LB, cui è seguita l'incubazione per una notte di piastre a 37°C. L'efficienza è stata calcolata moltiplicando il numero di placche sulla piastra della diluizione 10⁻⁴ per 10⁶. Le efficienze di elettroporazione della libreria sono tipicamente superiori a 1*10⁷ fagi in queste condizioni.

Trasformazione di *E. coli* mediante elettroporazione

Cellule di *E. coli* elettrocompetenti sono state scongelate su ghiaccio. Il DNA è stato miscelato con 40 µl di queste cellule aspirando e deponendo delicatamente con una pipetta le cellule 2-3 volte, stando attenti a non introdurre bolle d'aria. Le cellule sono state trasferite in una cuvetta Gene Pulser (ampiezza di 0,2 cm, BioRAD, Hercules, California) che era stata raffreddata su ghiaccio, stando ancora attenti a non introdurre bolle d'aria nel trasferimento. La cuvetta è stata posta nel Pulser per *E. coli* (BioRAD, Hercules, California) e sottoposta ad elettroporazione

con la tensione regolata a 1,88 kV secondo la raccomandazione del produttore. Il campione trasformato è stato immediatamente risospeso in 1 ml di terreno di coltura 2*YT o 1 ml di una miscela di 400 µl di 2*YT/600 µl cellule XL-1 sottoposte a coltura per una notte e trattato come dettano le procedure.

Piastratura del fago M13 o di cellule trasformate con reazione di mutagenesi con vettore di esposizione fagica di anticorpi

Campioni di fagi sono stati aggiunti a 200 µl di una coltura per una notte di *E. coli* XL1Blue quando si piastra su piastre di agar LB da 100 mm o a 600 µl di cellule sottoposte a coltura per una notte quando si piastra su piastre da 150 mm in provette sterili per coltura da 15 ml. Dopo aver aggiunto LB top agar (3 ml per piastre da 100 mm o 9 ml per piastre da 150 mm, top agar conservato a 55°C (si veda, Appendice A1, Sambrook et al., sopra)), la miscela è stata distribuita uniformemente su una piastra di agar LB che era stata preriscaldata (37°C-55°C) per rimuovere qualsiasi umidità in eccesso sulla superficie dell'agar. Le piastre sono state raffreddate a temperatura ambiente finché il top agar non si fosse solidificato. Le piastre sono state invertite ed incubate a 37°C come indicato.

Preparazione di ADP-ribosil ciclasi 2 biotinilato ed anticorpi biotinilati

L'antigene BST1 ricombinante concentrato (dominio extracellulare a lunghezza intera) è stato sottoposto a dialisi in modo esteso in BBS (borato 20 mM, NaCl 150 mM, NaN₃ allo 0,1%, pH 8,0). Dopo la dialisi, 1 mg del BST1 (1 mg/ml in BBS) è stato fatto reagire con un eccesso molare di 15 volte di biotina-XX-estere di NHS (Molecular Probes, Eugene,

Oregon, soluzione madre a 40 mM in DMSO). La reazione è stata incubata a temperatura ambiente per 90 minuti e quindi spenta con taurina (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) ad una concentrazione finale di 20 mM. La miscela della reazione di biotinilazione è stata quindi sottoposta a dialisi nei confronti di BBS a 2-8°C. Dopo la dialisi, il BST1 biotinilato è stato diluito in tampone di panning (40 mM Tris, NaCl 150 mM, BSA 20 mg/ml, Tween 20 allo 0,1%, pH 7,5), suddiviso in aliquote, e conservato a -80°C fino a quando richiesto.

Gli anticorpi sono stati fatti reagire con 3-(N-maleimmidilpropionil)biocitina (Molecular Probes, Eugene, Oregon) utilizzando una cisteina libera localizzata all'estremità carbossilica della catena pesante. Gli anticorpi sono stati ridotti aggiungendo DTT ad una concentrazione finale di 1 mM per 30 minuti a temperatura ambiente. L'anticorpo ridotto è stato fatto passare attraverso una colonna da dissalazione Sephadex G50 equilibrata in fosfato di potassio 50 mM, acido borico 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0. 3-(N-maleimmidilpropionil)biocitina è stata aggiunta ad una concentrazione finale di 1 mM e la reazione è stata lasciata procedere a temperatura ambiente per 60 minuti. I campioni sono stati quindi sottoposti a dialisi in modo esteso nei confronti di BBS e conservati a 2-8°C.

Preparazione di lattice magnetico con avidina

Il lattice magnetico (Estapor, solido al 10%, Bangs Laboratories, Fishers, Indiana) è stato accuratamente risospeso e 2 ml suddiviso in aliquote in una provetta conica da 15 ml. Il lattice magnetico è stato sospeso in 12 ml d'acqua distillata e separato dalla soluzione per 10

minuti utilizzando un magnete (PerSeptive Biosystems, Framingham, Massachusetts). Mantenendo al contempo la separazione del lattice magnetico con il magnete, il liquido è stato rimosso con attenzione utilizzando una pipetta sterile da 10 ml. Questo procedimento di lavaggio è stato ripetuto altre tre volte. Dopo il lavaggio finale, il lattice è stato risospeso in 2 ml d'acqua distillata. In una provetta conica da 50 ml separata, sono stati disciolti 10 mg di avidina-HS (NeutrAvidin, Pierce, Rockford, Illinois) in 18 ml di 40 mM Tris, cloruro di sodio 0,15 M, pH 7,5 (TBS). Mentre vengono agitati su Vortex, i 2 ml di lattice magnetico lavato sono stati aggiunti all'avidina-HS diluita e la miscela è stata miscelata per ulteriori 30 s. Questa miscela è stata incubata a 45°C per 2 ore, agitando ogni 30 minuti. Il lattice magnetico con avidina è stato separato dalla soluzione utilizzando un magnete e lavato tre volte con 20 ml BBS come descritto sopra. Dopo il lavaggio finale, il lattice è stato risospeso in 10 ml di BBS e conservato a 4°C.

Immediatamente prima dell'uso, il lattice magnetico con avidina è stato equilibrato in tampone di panning (40 mM Tris, NaCl 150 mM, BSA 20 mg/ml, Tween 20 allo 0,1%, pH 7,5). Il lattice magnetico con avidina richiesto per un esperimento di panning (200 µl/campione) è stato aggiunto ad una provetta da centrifuga da 15 ml sterile e portato a 10 ml con tampone per panning. La provetta è stata posta sul magnete per 10 minuti per separare il lattice. La soluzione è stata rimossa con attenzione con una pipetta sterile da 10 ml come descritto sopra. Il lattice magnetico è stato risospeso in 10 ml di tampone per panning per iniziare il secondo lavaggio. Il lattice magnetico è stato lavato un totale di 3 volte con

tampone per panning. Dopo il lavaggio finale, il lattice è stato risospeso in tampone per panning al volume di partenza.

Esempio 2: Selezione di anticorpi policlonali ricombinanti nei confronti dell'antigene BST1

Reagenti di legame che si legano specificamente al BST1 sono stati scelti dalle librerie di esposizione fagica generate da topi iperimmunizzati come descritto nell'Esempio 1.

Panning

I fagi con anticorpo di primo ciclo sono stati preparati come descritto nell'Esempio 1 utilizzando lo stampo con uracile BS45. Le elettroporazioni di mutagenesi DNA sono state eseguite, fornendo campioni di fago derivati da differenti topi immunizzati. Per creare più diversità nella libreria policlonale ricombinante, ciascun campione fagico è stato sottoposto a panning separatamente.

Prima del primo ciclo di panning funzionale con l'antigene BST1 biotinilato, librerie fagiche di anticorpi sono state scelte per l'esposizione fagica delle catene sia pesanti sia leggere sulla loro superficie mediante panning con 7F11-lattice magnetico (come descritto negli Esempi 21 e 22 di US 6,555,310). Il panning funzionale di queste librerie arricchite è stato eseguito in principio come descritto nell'Esempio 16 di US 6,555,310. Specificamente, 10 µl dell'antigene BST1 biotinilato $1 \cdot 10^{-6}$ M sono stati aggiunti ai campioni di fago (approssimativamente una concentrazione finale del BST1 di $1 \cdot 10^{-8}$ M) e la miscela è stata lasciata arrivare all'equilibrio per una notte a 2-8°C.

Dopo il raggiungimento dell'equilibrio, i campioni sono stati sottoposti a panning con lattice magnetico con per catturare il fago anticorpale legato al BST1. Il lattice magnetico con avidina equilibrato (Esempio 1), 200 µl lattice per campione, è stato incubato con il fago per 10 minuti a temperatura ambiente. Dopo 10 minuti, approssimativamente 9 ml di tampone per panning sono stati aggiunti a ciascun campione fagico, ed il lattice magnetico è stato separato dalla soluzione utilizzando un magnete. Dopo una separazione di dieci minuti, il fago non legato è stato rimosso con attenzione utilizzando una pipetta sterile da 10 ml. Il lattice magnetico è stato quindi risospeso in 10 ml di tampone per panning per iniziare il secondo lavaggio. Il lattice è stato lavato un totale di tre volte come descritto sopra. Per ciascun lavaggio, le provette sono state a contatto con il magnete per 10 minuti per separare il fago non legato dal lattice magnetico. Dopo il terzo lavaggio, il lattice magnetico è stato risospeso in 1 ml di tampone per panning e trasferito ad una provetta da 1,5 ml. Il volume totale di lattice magnetico per ciascun campione è stato quindi raccolto e risospeso in 200 µl di 2*YT e piastrato su piastre da 150 mm di LB come descritto nell'Esempio 1 per amplificare il fago legato. Le piastre sono state incubate a 37°C per 4 ore, quindi per una notte a 20°C.

Le piastre da 150 mm utilizzate per amplificare il fago legato sono state utilizzate per generare il ciclo successivo del fago anticorpale. Dopo incubazione per una notte, il fago anticorpale del secondo ciclo è stato eluito dalle piastre da 150 mm depositando con una pipetta 10 ml di terreno 2*YT sullo strato e agitando delicatamente la piastra a temperatura ambiente per 20 minuti. I campioni di fago sono stati quindi

trasferiti in provette sterili da centrifuga monouso da 15 ml con un tappo con dispositivo di tenuta, ed i detriti dalla piastra di LB sono stati fatti precipitare centrifugando le provette per 15 minuti a 3500 giri/min. Il surnatante contenente il fago anticorpale del secondo ciclo è stato quindi trasferito ad una nuova provetta.

Un secondo ciclo di panning funzionale è stato preparato diluendo 100 µl di ciascuno stock di fago in 900 µl di tampone per panning in provette sterili da centrifuga monouso da 15 ml. L'antigene BST1 biotinilato è stato quindi aggiunto a ciascun campione come descritto per il primo ciclo di panning, ed i campioni di fago sono stati incubati per 1 ora a temperatura ambiente. I campioni di fago sono stati quindi sottoposti a panning con avidina lattice magnetico come descritto sopra. Il progresso di panning è stato monitorato a questo punto piastrando aliquote di ciascun campione di lattice su piastre di agar LB da 100 mm per determinare la percentuale di positivi per kappa. La maggior parte di lattice da ciascun panning (99%) è stata piastrata su piastre da 150 mm di agar LB per amplificare il fago legato al lattice. Le piastre di agar LB da 100 mm sono state incubate a 37°C per 6-7 ore, dopodiché le piastre sono state trasferite a temperatura ambiente e sulle piastre sono stati sovrapposti filtri di nitrocellulosa (dimensione dei pori 0,45 µm, BA85 Protran, Schleicher e Schuell, Keene, New Hampshire).

Piastre con filtri di nitrocellulosa sono state incubate per una notte a temperatura ambiente e quindi sviluppate con un coniugato di anti-kappa di topo da capra con fosfatasi alcalina per determinare la percentuale di positivi a kappa come descritto sotto. Campioni fagici con

percentuali inferiori (<70%) di positivi a kappa nella popolazione sono stati sottoposti ad un ciclo di panning con 7F11-lattice magnetico prima di eseguire un terzo ciclo funzionale di panning per una notte a 2-8°C utilizzando l'antigene BST1 biotinilato ad approssimativamente 2×10^{-9} M. Questo ciclo di panning è stato monitorato anche per positivi a kappa. Singoli campioni fagici che hanno avuto percentuali di positività a kappa superiori all'80% sono stati raggruppati e sottoposti ad un ciclo finale di panning per una notte a 2-8°C a 5×10^{-9} M. I geni di anticorpi per BST1 contenuti all'interno del fago eluito da questo quarto ciclo di panning funzionale sono stati subclonati nel vettore di espressione, pBRncoH3.

Il procedimento di subclonaggio è stato effettuato in generale come descritto nell'Esempio 18 di US 6,555,310. Dopo il subclonaggio, il vettore di espressione è stato sottoposto a elettroporazione in cellule DH10B e la miscela è stata fatta crescere per una notte in 2*YT contenente glicerolo all'1% e tetraciclina 10 µg/ml. Dopo un secondo ciclo di crescita e selezione in tetraciclina, aliquote di cellule sono state congelate a -80°C come fonte per la produzione di anticorpi policlonali per BST1. Gli anticorpi monoclonali sono stati scelti tra queste miscele policlonali piastrando un campione della miscela su piastre di agar LB contenenti 10 µg/ml di tetraciclina e mediante screening per gli anticorpi che riconoscevano il BST1.

Espressione e purificazione di anticorpi ricombinanti nei confronti dell'ADP-ribosil ciclasi 2

Un inoculo di un pallone con agitatore è stato generato per una notte da una banca cellulare a -70°C in un agitatore incubatore Innova

4330 (New Brunswick Scientific, Edison, New Jersey) regolato a 37°C, 300 giri/min. L'inoculo è stato utilizzato per seminare un fermentatore da 20 l (Applikon, Foster City, California) contenente il terreno di coltura definito [Pack et al. (1993) Bio/Technology 11:1271-1277] arricchito con L-leucina 3 g/l, L-isoleucina 3 g/l, digerito di caseina 12 g/l (Difco, Detroit, Michigan), glicerolo 12,5 g/l e tetraciclina 10 µg/ml. La temperatura, il pH e l'ossigeno molecolare disciolto nel fermentatore sono stati controllati a 26°C, 6,0-6,8 e saturazione del 25%, rispettivamente. La schiuma è stata controllata dall'aggiunta di polipropilenglicole (Dow, Midland, Michigan). Al fermentatore è stato aggiunto glicerolo in modalità di alimentazione in discontinuo. L'espressione di Fab è stata indotta dall'aggiunta di L(+)-arabinosio (Sigma, St. Louis, Missouri) a 2 g/l durante la fase tardiva di crescita logaritmica. La densità cellulare è stata misurata mediante densità ottica a 600 nm in uno spettrofotometro UV-1201 (Shimadzu, Columbia, Maryland). Seguendo la terminazione della corsa e la regolazione del pH a 6,0, la coltura è stata fatta passare due volte attraverso un microfluidificatore M-210B-EH (Microfluidics, Newton, Massachusetts) a 17.000 psi. L'omogeneizzazione a pressione elevata delle cellule ha rilasciato il Fab nel surnatante della coltura.

Il primo passaggio nella purificazione è stata la cromatografia di affinità con metallo immobilizzato a letto espanso (EB-IMAC). La resina chelante Streamline™ (Pharmacia, Piscataway, New Jersey) è stata caricata con NiCl₂ 0,1 M ed è stata quindi espansa ed equilibrata in acetato 50 mM, NaCl 200 mM, imidazolo 10 mM, NaN₃ allo 0,01%, tampone a pH 6,0 fluente nella direzione verso l'alto. Una soluzione madre

è stata utilizzata per portare l'omogenato di coltura a imidazolo 10 mM, dopodiché è stato diluito due volte o più in tampone di equilibramento per ridurre il contenuto di solidi umidi a meno del 5% in peso. È stato quindi caricato sulla colonna Streamline fluente nella direzione verso l'alto ad una velocità superficiale di 300 cm/h. I detriti cellulari vi sono passati attraverso non ostacolati, ma il Fab è stato catturato per mezzo dell'interazione ad affinità elevata tra nichel ed il marcatore esaistidinico sulla catena pesante di Fab. Dopo il lavaggio, il letto espanso è stato convertito in un letto impaccato ed il Fab è stato eluito con borato 20 mM, NaCl 150 mM, imidazolo 200 mM, NaN₃ allo 0,01%, tampone a pH 8,0 fluente nella direzione verso il basso.

La seconda fase nella purificazione ha utilizzato una cromatografia a scambio ionico (IEC). La resina Q Sepharose FastFlow (Pharmacia, Piscataway, New Jersey) è stata equilibrata in borato 20 mM, NaCl 37,5 mM, NaN₃ allo 0,01%, pH 8,0. Il gruppo di eluizione di Fab dalla fase EB-IMAC è stato diluito quattro volte in borato 20 mM, NaN₃ allo 0,01%, pH 8,0 e caricato sulla colonna IEC. Dopo il lavaggio, il Fab è stato eluito con un gradiente da 37,5 a 200 mM di NaCl salino. Le frazioni di eluizione sono state valutate per la purezza utilizzando un sistema Xcell SDS-PAGE II™ (Novex, San Diego, California) prima del raggruppamento. Infine, il gruppo di Fab è stato concentrato e sottoposto a diafiltrazione in borato 20 mM, NaCl 150 mM, NaN₃ allo 0,01%, tampone pH 8,0 per immagazzinamento. Questo è stato ottenuto in un sistema Sartocn Slice™ provvisto di una cassetta con limite a peso molecolare (MWCO) 10.000 (Sartorius, Bohemia, New York). Le rese di purificazione finali sono

state tipicamente del 50%. La concentrazione del Fab purificato è stata misurata mediante assorbanza UV a 280 nm, assumendo un'assorbanza di 1,6 per una soluzione 1 mg/ml.

Esempio 3: Specificità di anticorpi monoclonali nei confronti di BST1 determinata mediante l'analisi di citometria a flusso

La specificità di anticorpi nei confronti del BST1 scelto nell'Esempio 2 è stata testata mediante citometria a flusso. Per testare la capacità degli anticorpi di legarsi alla BST1 proteina della superficie cellulare, gli anticorpi sono stati incubati con le cellule esprimenti BST1, A549 e H226, da adenocarcinoma del polmone umano e carcinoma squamoso del polmone umano, rispettivamente. Le cellule sono state lavate in tampone per FACS (DPBS, FBS al 2%), centrifugate e risospese in 100 µl dell'anticorpo primario per BST1 diluito (anche diluito in tampone per FACS). Il complesso anticorpo-A549 è stato incubato su ghiaccio per 60 minuti e quindi lavato due volte con tampone per FACS come descritto sopra. Il precipitato di cellula-anticorpo è stato risospeso in 100 µl dell'anticorpo secondario diluito (anch'esso diluito in tampone per FACS) ed incubato su ghiaccio per 60 minuti su ghiaccio. Il precipitato è stato lavato come prima e risospeso in 200 µl di tampone per FACS. I campioni sono stati caricati sul citometro a flusso BD FACSCanto II ed i dati sono stati analizzati utilizzando il programma BD FACSDiva.

RISULTATI

I risultati dell'analisi di citometria a flusso hanno dimostrato che 4 anticorpi monoclonali indicati BST1_A1, BST1_A2 e BST_A3 si sono legati efficacemente al BST1 umano della superficie cellulare. La Figura

3a mostra la specificità di legame sia di BST1_A1 sia di BST1_A2 nei confronti di BST1 su cellule A549 e H226, rispettivamente. La Figura 3b mostra la specificità di legame di BST1_A3 a BST1 su cellule A549 e H226. I risultati indicano il legame forte di quegli anticorpi contro BST1 su A549 e H226.

Esempio 4: Caratterizzazione strutturale di anticorpi monoclonali nei confronti di BST1

Le sequenze di cDNA codificanti le regioni variabili della catena pesante e leggera degli anticorpi monoclonali BST1_A2 e BST1_A1 sono state ottenute utilizzando tecniche standard di PCR e sono state sequenziate utilizzando tecniche di sequenziamento del DNA standard.

Le sequenze anticorpali possono essere sottoposte a mutagenesi per riconversione in residui della linea germinale ad uno o più residui.

Le sequenze nucleotidiche ed amminoacidiche della regione variabile della catena pesante di BST1_A2 sono SEQ ID NO: 6 e 2, rispettivamente.

Le sequenze nucleotidiche ed amminoacidiche della regione variabile della catena leggera di BST1_A2 sono SEQ ID NO: 8 e 4, rispettivamente.

Il confronto della sequenza immunoglobulinica della catena pesante di BST1_A2 rispetto alle sequenze della catena pesante dell'immunoglobulina della linea germinale murine note ha dimostrato che la catena pesante di BST1_A2 utilizza un segmento di V_H dalla linea germinale murina V_H 1-39. Le ulteriori analisi della sequenza di BST1_A2 V_H utilizzando il sistema di Kabat di determinazione della regione CDR ha

condotto alla delineazione delle regioni CDR1, CDR2 e CDR3 della catena pesante come mostrato nelle SEQ ID NO:22, 24 e 26, rispettivamente. Gli allineamenti delle sequenze di CDR1 e CDR2 V_H di BST1_A2 alla sequenza della linea germinale V_H 1-39 vengono mostrati nelle Figure 1a e 1b.

Il confronto della sequenza immunoglobulinica della catena leggera di BST1_A2 con le sequenze della catena leggera dell'immunoglobulina della linea germinale murina note ha dimostrato che la catena leggera di BST1_A2 utilizza un segmento di V_K dalla linea germinale murina V_K 4-55. Le ulteriori analisi della sequenza di BST1_A2 V_K utilizzando il sistema di Kabat di determinazione della regione CDR hanno portato alla delineazione delle regioni della catena leggera di CDR1, CDR2 e CDR3 come mostrato nelle SEQ ID NO:28, 30 e 32, rispettivamente. Gli allineamenti delle sequenze di CDR1, CDR2 e CDR3 V_K di BST1_A2 alle sequenze della linea germinale V_K 4-55 vengono mostrate nelle Figure 2a, 2b e 2c.

Le sequenze nucleotidiche ed amminoacidiche della regione variabile della catena pesante di BST1_A1 sono SEQ ID NO:5 e 1, rispettivamente.

Le sequenze nucleotidiche ed amminoacidiche della regione variabile della catena leggera di BST1_A1 sono SEQ ID NO: 7 e 3, rispettivamente.

Il confronto della sequenza immunoglobulinica della catena pesante di BST1_A1 con le sequenze della catena pesante dell'immunoglobulina della linea germinale murina note ha dimostrato che

la catena pesante di BST1_A1 utilizza un segmento V_H dalla linea germinale murina V_H 1-80. L'ulteriore analisi della sequenza V_H di BST1_A1 utilizzando il sistema di Kabat di determinazione della regione CDR ha condotto alla delineazione delle regioni CDR1, CDR2 e CDR3 della catena pesante come mostrato nelle SEQ ID NO:21, 23 e 25, rispettivamente. Gli allineamenti delle sequenze CDR1 e CDR2 V_H di BST1_A1 alla sequenza della linea germinale V_H 1-80 vengono mostrati nelle Figure 1a e 1b.

Il confronto della sequenza immunoglobulinica della catena leggera di BST1_A1 rispetto alle sequenze della catena leggera dell'immunoglobulina della linea germinale murina note ha dimostrato che la catena leggera di BST1_A1 utilizza un segmento V_K dalla linea germinale murina V_K 4-74. L'ulteriore analisi della sequenza V_K di BST1_A1 utilizzando il sistema di Kabat di determinazione della regione CDR ha condotto alla delineazione delle regioni CDR1, CDR2 e CDR3 della catena leggera come mostrato nelle SEQ ID NO:27, 29 e 31, rispettivamente. Gli allineamenti delle sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 V_K di BST1_A1 alle sequenze della linea germinale V_K 4-74 vengono mostrati nelle Figure 2a, 2b e 2c.

Le sequenze nucleotidiche ed amminoacidiche della regione variabile della catena pesante di BST1_A3 sono SEQ ID NO:54 e 52, rispettivamente.

Le sequenze nucleotidiche ed amminoacidiche della regione variabile della catena leggera di BST1_A3 sono SEQ ID NO:55 e 53, rispettivamente.

Il confronto della sequenza immunoglobulinica della catena pesante di BST1_A3 rispetto alle sequenze della catena pesante dell'immunoglobulina della linea germinale murina note ha dimostrato che la catena pesante di BST1_A3 utilizza un segmento V_H dalla linea germinale murina V_H 69-1. L'ulteriore analisi della sequenza V_H BST1_A3 utilizzando il sistema di Kabat di determinazione della regione CDR ha condotto alla delineazione delle regioni CDR1, CDR2 e CDR3 della catena pesante come mostrato nelle SEQ ID NO: 62, 63 e 64, rispettivamente. Gli allineamenti delle sequenze CDR1 e CDR2 V_H di BST1_A3 alla sequenza della linea germinale V_H 69-1 murina vengono mostrati nelle Figure 1a e 1b.

Il confronto della sequenza immunoglobulinica della catena leggera BST1_A3 alle sequenze della catena leggera dell'immunoglobulina della linea germinale murina note ha dimostrato che la catena leggera di BST1_A3 utilizza un segmento V_K dalla linea germinale di V_K murine 44-1. L'ulteriore analisi della sequenza BST1_A3 V_K utilizzando il sistema di Kabat di determinazione della regione CDR ha condotto alla delineazione delle regioni CDR1, CDR2 e CDR3 della catena leggera come mostrato nella SEQ ID NO: 65, 66 e 67, rispettivamente. Gli allineamenti delle sequenze CDR1, CDR2 e CDR3 V_K di BST1_A3 alle sequenze della linea germinale 44-1 di V_K murine vengono mostrati nelle Figure 2a, 2b e 2c.

Esempio 5: Internalizzazione e MabZAP di BST1_A1 e BST1_A2 in cellule A549 e H226

L'internalizzazione di BST1_A1 e BST1_A2 da parte di H226 e A549 è stata studiata utilizzando un saggio MabZap. Il saggio MabZAP ha mostrato l'internalizzazione degli anticorpi monoclonali anti-BST1 attraverso il legame di un anticorpo secondario anti-IgG umana coniugato alla tossina saporina (Advanced Targeting System, San Diego, California, IT-22-100). In primo luogo, il Fab di BST1 è stato legato sulla superficie delle cellule. Gli anticorpi MabZAP sono stati quindi legati agli anticorpi primari. In seguito, il complesso MabZAP è stato internalizzato dalle cellule. L'entrata della saporina nelle cellule è risultata nell'inibizione della sintesi proteica e nella morte cellulare finale.

Il saggio MabZAP è stato condotto come segue. Ciascuna delle cellule è stata seminata ad una densità di 5×10^3 cellule per pozzetto. L'anticorpo monoclonale anti-BST1 o una IgG umana di controllo isotipico sono stati diluiti in serie, quindi aggiunti alle cellule ed incubati per 15 min a 25°C. Il MabZAP è stato quindi aggiunto ed incubato per 72 ore a 37°C. La vitalità cellulare nelle piastre è stata rilevata mediante il kit di saggio della vitalità cellulare Luminescent CellTiter-Glo® (Promega, G7571) e le piastre sono state lette ed analizzate utilizzando Promega Glomax. La morte cellulare è stata proporzionale alla concentrazione di anticorpi monoclonali anti-BST1. Le Figure 4a e 4b mostrano che gli anticorpi monoclonali anti-BST1, BST1_A1 e BST1_A2 sono stati efficientemente internalizzati da parte di cellule H226 e A549, rispetto all'anticorpo di controllo dell'isotipo anti-IgG umano.

Esempio 6: Umanizzazione di BST1_A2

Per progettare sequenze umanizzate di V_H e V_L di BST1_A2, gli amminoacidi della cornice importanti per la formazione della struttura delle CDR sono stati identificati utilizzando il modello tridimensionale. V_H e V_L umane, sequenze con omologie elevate con BST1_A2 sono state anche scelte dalla banca dati GenBank. Le sequenze delle CDR insieme ai residui amminoacidici della cornice identificati sono state innestate da BST1_A2 nelle sequenze cornice umane (Figure 5-7).

Esempio 7 Citotossicità cellulare dipendente dagli anticorpi mediata dai mAb anti-BST1

In primo luogo 25 μ l di anticorpi anti-BST1 progenitori e non fucosilati (BST1_A2 e BST1_A2_NF) a concentrazioni variabili da 10 nm/L a 0,1 nm/L sono stati aggiunti a pozzetti separati di una piastra da 96 pozzetti con fondo a v insieme a 50 μ l di cellule esprimenti BST1 A549 e U937. 25 μ l di cellule effettrici sono stati quindi aggiunti ai pozzetti a dare un rapporto finale di effetto:bersaglio (E:T) di 10:1 e 25:1. La piastra è stata quindi delicatamente centrifugata a 1000 giri/min per 2 min, dopodiché è stata incubata per 4 ore in 37°C, incubatore con CO₂ al 5%. A 3 ore dopo l'incubazione, sono stati aggiunti 10 μ l di soluzione di lisi a ciascuno dei pozzetti contenenti solo cellule esprimenti BST1 per misurare il rilascio massimo di LDH, e ad un set di pozzetti contenenti solo il terreno per un controllo di correzione del volume.

Dopo l'incubazione, le cellule sono state centrifugate delicatamente a 1000 giri/min per 2 min, dopodiché 50 μ l di surnatante sono stati trasferiti ad una piastra da 96 pozzetti a fondo piatto. Utilizzando il saggio di citotossicità non radioattivo CytoTox 96® disponibile da

Promega (No. Cat.: G1780), i componenti del kit sono stati ricostituiti secondo delle istruzioni del produttore e 50 µl della miscela del substrato sono stati quindi aggiunti a ciascun pozzetto. La piastra è stata quindi coperta e lasciata incubare per 30 minuti a 25°C protetta dalla luce. Dopo di questo, 50 µl di soluzione d'arresto sono stati aggiunti a ciascun pozzetto e l'assorbanza è stata registrata a 490 nm utilizzando il lettore per piastre Varioskan.

Utilizzando un anticorpo noto stimolare l'uccisione cellulare attraverso ADCC come controllo positivo ed un controllo isotipico di IgG1 umana come controllo negativo, i risultati mostrano che BST1_A2 e BST1_A2_NF sono stati in grado di stimolare l'ADCC su cellule esprimenti BST1 A549 e U937. Su cellule A549 esprimenti BST1, BST1_A2_NF è stato mostrato uccidere approssimativamente il 45% a 10 nmol/l (Figura 8a). Su cellule U937 esprimenti BST1, BST1_A2 è stato mostrato uccidere approssimativamente il 20% a 1 nmol/l e BST1_A2_NF è stato mostrato uccidere approssimativamente il 45% a 1 nmol/l (Figura 8b).

Esempio 8: Specificità di anticorpi monoclonali nei confronti di BST1 determinata mediante l'analisi di citometria a flusso in pazienti con LMA

La capacità di BST_A2 di legarsi a linfoblasti da pazienti con LMA è stata testata mediante l'analisi di citometria a flusso. Il sangue è stato prelevato da 20 pazienti con LMA. Utilizzando la procedura come descritta nell'Esempio 3, BST_A2 è stato mostrato legarsi a blasti di LMA di approssimativamente l'80% dei pazienti con LMA.

ELENCO DELLE SEQUENZE

SEQ ID No	Descrizione	Sequenza
1	aa VH_A1	<p>MKQSTIALALLPLLFTPVAKAQVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFNSWINWV KQRPGQGLEWIGQIYPGDYDTNYNGKFKGKATLTADYSSSTAYMQLNSLTSEDSAVY FCARGGSIYYGNLGFDDVWGAGTTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNMVTLGCL VKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWVSETVTCNVA HPASSTKVDKIVPRDCHHHHHHH</p> <p>MKQSTIALALLPLLFTPVAKAQAYLQQSGPELVKAGASVKMSCKASGYSFIEYTINWVK QSHGKSLEWIGNIDPYGTTYYNQMFTGKATLTVDQSSNTAYMQLKSLTSEDSAVYF CARGSAWFPYWGQGLTVTVSAAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNMVTLGCLVKGYFPE PVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWVSETVTCNVAHPASSTK VDKKIVPRDCHHHHHHH</p>
2	aa VH_A2	<p>MKQSTIALALLPLLFTPVAKAQAYLQQSGPELVKAGASVKMSCKASGYSFIEYTINWVK QSHGKSLEWIGNIDPYGTTYYNQMFTGKATLTVDQSSNTAYMQLKSLTSEDSAVYF CARGSAWFPYWGQGLTVTVSAAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNMVTLGCLVKGYFPE PVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWVSETVTCNVAHPASSTK VDKKIVPRDCHHHHHHH</p>
3	aa VK_A1	<p>MKYLPTAAAGLLLLAAQPAMAEMVLTSQSPAIMSTSLGERVTMTCTASSRVSSYLH WYQQKPGSSPKLWIYTSNLAASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQY HRSPYTFGGGKLEIKRADAAPTIVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNFFPKDINVKWKI DGSERQNGVLSWTDQDSKDYTSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCATHKTSPIVK SFNRNES</p> <p>MKYLPTAAAGLLLLAAQPAMADIVMSQSPAIMSASPGKVTMTCSASSSVTYMYWY QQKPGSSPRLLIYDTSNLAASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDTATYYCQQWSN YPLTFGAGTKLEIKRADAAPTIVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNFFPKDINVKWKIDG SERQNGVLSWTDQDSKDYTSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCATHKTSPIVKSF NRNES</p>
4	aa VK_A2	<p>MKYLPTAAAGLLLLAAQPAMADIVMSQSPAIMSASPGKVTMTCSASSSVTYMYWY QQKPGSSPRLLIYDTSNLAASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDTATYYCQQWSN YPLTFGAGTKLEIKRADAAPTIVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNFFPKDINVKWKIDG SERQNGVLSWTDQDSKDYTSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCATHKTSPIVKSF NRNES</p>
5	nt VH_A1	<p>acgcttllacatggagaaaaaaagtgaaacaaagcactatlgcactggcactctaccgctcttaccocctgggca aaagcccaggltgaagctcagcagtcggggctgagctgggagggcctgggtcctcagtgaaagcttccgcaaggctt ctggctacgactcagtaactcctggataaaactgggtgaagcagagggcctggacagggcttgagtgaggattgacagatt tatctggagattatgatactaactacaalggaaaatcaaggglaaagccacactgactgcagactactcctccagcac agcctaactgagcagcacaagcagcacaactcagggactctgggctcttctctgcaagggggggatcagctactactggt aaacctggggtctcagatgctggggcgcagggaccagcctgacccgctcctcagccaaaacgacacccccatctgicta tccactggccctgagctgctgcccacaaactccatgggagccctgggagccctgggcaagggctattccctgagcc agtgacagtgacctggaactctggatcccctgcccagggctggcagacacctccagcctgctcagctgactcagactc ctgagcagctcagtgactgctccctccagcaccggccagcagagaccgacactgcaacgctggcccccggccagc agcaaccaaggtggacaagaaaatggccagggaatgctcaatcaaccatcaccatcactaatgacagcttaacatgc atangct</p> <p>aaaacctggcgttaccacgcttllacatggagaaaaaaagtgaaacaaagcactatlgcactggcactctaccgct tcttattaccocctggcacaagcccaggctatctcagcagctcggactggagctgggagggctggcctcagtgaa gatgctcgaaggctctgggtactcaatcattgagtaaccataaaactgggtgaaacagagocagggaaagagccctga gggattggaalattgacttattatggaaaccttattacaatcagatgctcagggcaagggccacatlgactgtagacc aatctccaacactgctcactgagctcaagagccctgacalctgaggactctgagctctatllctgcaagagggctccgc ctggllcttactggggcaggggactctagcactgctctgagccaaaacgacacccccatctgctatccactggcc cctggatctgctcccacaaactaactcattggatgacctgggagcctgctgtaaggggctatttccctgagcagtgacagtg acctggaaactcggatccctgtccagcgggtgcaacacctccagcctgctcagctgagctcactcactcctgagcagct cagtgactgctcccctccagcaccctggccagcagagaccgctcaactgcaactggccaccggcagcagcacaag gggacaagaaaatggccagggttgcacatcaccatcaccatcactaatgacagcttaacatgcagcttaacatgcag glltttggatggaglgaaacgatgaaatcctattgcccactggcagccggctggattgllattactcgtgcccacccagcc atggccgaaaatggllctcaccagctccagcaatcagctcactcctcaggggaaagggctcaccatgacctgcaactgccc agctcagigtatggatccagllactgcaactggactcagcagagaagccaggatcctcccccaactcggalltataglacat</p>
6	nt VH_A2	<p>aaaacctggcgttaccacgcttllacatggagaaaaaaagtgaaacaaagcactatlgcactggcactctaccgct tcttattaccocctggcacaagcccaggctatctcagcagctcggactggagctgggagggctggcctcagtgaa gatgctcgaaggctctgggtactcaatcattgagtaaccataaaactgggtgaaacagagocagggaaagagccctga gggattggaalattgacttattatggaaaccttattacaatcagatgctcagggcaagggccacatlgactgtagacc aatctccaacactgctcactgagctcaagagccctgacalctgaggactctgagctctatllctgcaagagggctccgc ctggllcttactggggcaggggactctagcactgctctgagccaaaacgacacccccatctgctatccactggcc cctggatctgctcccacaaactaactcattggatgacctgggagcctgctgtaaggggctatttccctgagcagtgacagtg acctggaaactcggatccctgtccagcgggtgcaacacctccagcctgctcagctgagctcactcactcctgagcagct cagtgactgctcccctccagcaccctggccagcagagaccgctcaactgcaactggccaccggcagcagcacaag gggacaagaaaatggccagggttgcacatcaccatcaccatcactaatgacagcttaacatgcagcttaacatgcag glltttggatggaglgaaacgatgaaatcctattgcccactggcagccggctggattgllattactcgtgcccacccagcc atggccgaaaatggllctcaccagctccagcaatcagctcactcctcaggggaaagggctcaccatgacctgcaactgccc agctcagigtatggatccagllactgcaactggactcagcagagaagccaggatcctcccccaactcggalltataglacat</p>
7	nt VK_A1	<p>aaaacctggcgttaccacgcttllacatggagaaaaaaagtgaaacaaagcactatlgcactggcactctaccgct tcttattaccocctggcacaagcccaggctatctcagcagctcggactggagctgggagggctggcctcagtgaa gatgctcgaaggctctgggtactcaatcattgagtaaccataaaactgggtgaaacagagocagggaaagagccctga gggattggaalattgacttattatggaaaccttattacaatcagatgctcagggcaagggccacatlgactgtagacc aatctccaacactgctcactgagctcaagagccctgacalctgaggactctgagctctatllctgcaagagggctccgc ctggllcttactggggcaggggactctagcactgctctgagccaaaacgacacccccatctgctatccactggcc cctggatctgctcccacaaactaactcattggatgacctgggagcctgctgtaaggggctatttccctgagcagtgacagtg acctggaaactcggatccctgtccagcgggtgcaacacctccagcctgctcagctgagctcactcactcctgagcagct cagtgactgctcccctccagcaccctggccagcagagaccgctcaactgcaactggccaccggcagcagcacaag gggacaagaaaatggccagggttgcacatcaccatcaccatcactaatgacagcttaacatgcagcttaacatgcag glltttggatggaglgaaacgatgaaatcctattgcccactggcagccggctggattgllattactcgtgcccacccagcc atggccgaaaatggllctcaccagctccagcaatcagctcactcctcaggggaaagggctcaccatgacctgcaactgccc agctcagigtatggatccagllactgcaactggactcagcagagaagccaggatcctcccccaactcggalltataglacat</p>

```

ccaacctggctctdggagloccagctogctcagtgccagtggtctdgggacctctactctcaacaatcagcagcattgga
ggctgaagatgctgcccacttattactgocaccaglatcactgctcccgtacacgttcggaggggggaccaagctggaaa
laaaacgggctgatgctgccaactgfatocactctccaccatccagtgagcagttaacactgaggggctcagctg
tggctcttgaacaactctacccaaaagacalcaatgcaagtggaagatfgatggcagtgaaacgacaaaatggcgtc
ctgaacagttggactgatacggagacaaagacagcacctacagcatgagcagcaccctcactgaccaaaggacg
aglatgaacgacataacagctatacctgtagggccactcacaagacatcaactcaccactgtaagagctcaacag
gaatgagcttaagtattagctaattctagaacg
actctactgttctccataccggtttttggatggagtgaaacgagaaataacctattgctacggcagccgctggattgta
ttactcgtgcccaccagccatgcccagacatgtaactgctcagctccagcaatcactgctgcatctccaggggagaag
gtaccatgacctgagctgcccagctcaagttaactacatgtaactgggtaccagcaagaagccaggtacctccccagact
ctgattatgacacatccaactggctctggagctccctgctcgtcagtgccagtgggctgggactctactctcaca
atcagccgaatggagcgtgaagatactgcccacttattctgocagcagtggaatattaccactcagctcgtgctgctgg
accaagctggagctgaaacgggctgatgctgccaactgtaactctccaccatocagtgagcagttaacatctgg
aggctcctcagctgctgctctgaacaactctaccccaaaagacalcaatgcaagtggaagatfgatggcagtgaaacg
acaaaatggcctctgacagttggactgacaggacagcaaaagacagcaactacagcatgagcagcaccctcactg
tgaocaaggacgaglatgacgacataacagctatacctgtagggccactcacaagacatcaactcaccattgtaaa
gagctcaacagggaatgacttaagtgatgactaaactcagaacgctcactggcactggcctggctcgtttaa
9 aa VH_CDR1_A1 GYAFNSWINW
10 aa VH_CDR1_A2 GYSFIEYINW
11 aa VH_CDR2_A1 GQIYPGDYDTNYNGKFK
12 aa VH_CDR2_A2 GNIDPYYGTTYYNQMFT
13 aa VH_CDR3_A1 ARGGSIIYGNLGFDDV
14 aa VH_CDR3_A2 ARGSAWFPY
15 aa VK_CDR1_A1 TASSRVSSSYLH
16 aa VK_CDR1_A2 SASSSVTYMY
17 aa VK_CDR2_A1 STSNLAS
18 aa VK_CDR2_A2 DTSNLAS
19 aa VK_CDR3_A1 HQYHRSPYT
20 aa VK_CDR3_A2 QQWSNYPLT
21 nt VH_CDR1_A1 ggctacgcattcagtaactcctggataaaactgg
22 nt VH_CDR1_A2 gggtactcattcattgagtagacacataaaactgg
23 nt VH_CDR2_A1 ggacagattatcctggagatgatgataactacaatggaaaaitcaag
24 nt VH_CDR2_A2 ggaaaatitgatccttattatggaaccacttattacaatcagatgltcag
25 nt VH_CDR3_A1 gcaaggggggagatgatctactatggtaacctgggttcttctgagtc
26 nt VH_CDR3_A2 gcaagggctcgcctggcttctctac
27 nt VK_CDR1_A1 actgcccagctcacggttaagttccagttactgac
28 nt VK_CDR1_A2 agtgccagctcaagtgtaacttactgac
29 nt VK_CDR2_A1 agtataccaacctggcttct
30 nt VK_CDR2_A2 gacacatccaacctggcttct
31 nt VK_CDR3_A1 caccaglatcactgctccccgtacaag
32 nt VK_CDR3_A2 cagcagtgaggtaattaccactcag
IGHV1-80*01 (Genebank:
33 AC160990 Musmus) nt ggctacgcattcagtagctactggatgaactgg
138392-138424
IGHV1-80*01 (Genebank:
34 AC160990 Musmus) nt ggacagattatcctggagatggtgataactacaacggaaagttcaag
138461-138511
IGHV1-39*01 (Genebank:
35 AC079181 Musmus) nt gggtactcattcactgactacaacatgaactgg
153362-153394

```

36	IGHV1-39*01 (Genebank: AC079181 Musmus) nt 153431-153481	ggagtaattaatcctaactatggtactactagctacaatcagaagttcaag
37	IGKV4-74*01 (Genebank: AJ231217 Musmus) nt 496- 531	actgccagctcaagtgtaagttccagttactgcac
38	IGKV4-74*01 (Genebank: AJ231217 Musmus) nt 577- 597	agcacatccaacctggcttct
39	IGKV4-74*01 (Genebank: AJ231217 Musmus) nt 691- 718	caccagtatcatcgttccccaocca
40	IGKV4-55*01 (Genebank: AJ231225 Musmus) nt 523- 552	aglgccagctcaagtgtaagttacatgtac
41	IGKV4-55*01 (Genebank: AJ231225 Musmus) nt 598- 618	gacacatccaacctggcttct
42	IGKV4-55*01 (Genebank: AJ231225 Musmus) nt 715- 739	cagcagtgaggtagtaaccacca
43	ADP-ribosil ciclasi 2 (CD157; BST1)	MAAQGCAASRLQLLLQLLLLLLLAAGGARARWRGEGTSAHLRDIFLGRCAEYRALL SPEQRNKNCIAWEAFKVALDKDPCSVLPDYLDFINLSRHSIPRDKSLFWENSHLLV NSFADNTRRFMPLSDVLYGRVADFLSWCRQKNDGLDYQSCPTSEDCENNPVDSF WKRASIQYSKDSGGVIHVMLNGSEPTGAYPIKGGFFADYEIPNLQKEKITRIEIVWMHEIG GPNVESCGEGSMKVLEKRLKDMGFQYSCINDYRPVKLLQCVDHSTHPDCALKSAAA ATQRKAPSLYTEQRAGLIIFLVLASRTQL GARARWRGEGTSAHLRDIFLGRCAEYRALLSPEQRNKNCIAWEAFKVALDKDPCSV LPDYLDFINLSRHSIPRDKSLFWENSHLLVNSFADNTRRFMPLSDVLYGRVADFLSW CRQKNDGLDYQSCPTSEDCENNPVDSFWKRASIQYSKDSGGVIHVMLNGSEPTGA YPIKGGFFADYEIPNLQKEKITRIEIVWMHEIGGPNVESCGEGSMKVLEKRLKDMGFQYS CINDYRPVKLLQCVDHSTHPDCALKSAAAATQRK
44	aa 29 – 292 dell'ADP-ribosil ciclasi 2 (CD157; BST1)	QAYLQQSGPELVKAGASVKMSCKASGYSFIEYTIWVVKQSHGKSLEWIGNIDPYYGT TYYNQMFTGKATLTVDQSSNTAYMQLKSLTSEDSAVYFCARGSAWFFYWGQGLTVT VSA
45	A2 VH (amminoacidi 21-137 SEQ ID No:2)	QVQLVQSGA EVKKGASVK VSCKASGYSF IEYTIWVVRQ
46	VH1 - umanizzatoVH_A2	APGQGLEWIGNIDPYYGTYY NQMFTGRATL TVDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYYCARGSAWF PYWGQGLTV TVSS
47	BF238102 VH	QVQLVQSGA EVKKGASVK VSCKASGYSF TXXXXXWVRQ APGQGLEWIMG XXXXXXXXXXXX XXXXXRVTL TRDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYYCARXXXXX XXXWGQGLTV PVSS
48	A2 VL (amminoacidi 22-128 SEQ ID No:4)	DIVMSQSPA IMSASPGKVK TMTCSAS-SS VTYMYWYQKPKGSSPRLLIY DTSNLASGVP VRFSGSGSGT SYSLTISRMEADTATYYCQ QWSNYPLTFG AGTKLELK
49	VL1 - umanizzatoVK_A2	DIQMTQSPS SLSASVGDV TITCSAS-SS VTYMYWYQKPKGKAPKLLIY DTSNLASGVP SRFSGSGSGT DYTLLTISLQPEDFATYYCQ QWSNYPLTFG QGTKVEIK
50	X72441 VL	DIQMTQSPS SLSASVGDV TITCXXXXXX XXXXXWYQKPKGKAPKLLIY XXXXXXXXXGVP SRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCX XXXXXXXXFG QGTKVEIK

51	VH1_CDR2	NIDPYYGTTYNQMFQ MKQSTIALALLPLLFTPVAKAQVQLQQRRAELVMPGASVKMSCKTSGYTFSDYWVHW VRQRPQGLEWIGAI DGSDFNDYSQKFKGRATLTVDESSSTVYMQLSLSTSEDSAV
52	aa VH_A3	YICARGGLLQYWGGQTLLTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAQTNSMVTGLCLVKGYFP EPVTVTWNSSGLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWVSETVTCNVAHPASST KVDKKIVPRDCHHHHHHH MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMADIQLTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYQ QKQKSPQLLVYNTKTLGEGVPSRFSGSGSGTGFSLKINSLQPEDFGSYQCQHHYGT
53	aa VK_A3	PFTFGSGTKLEIKRADAAPTIVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGS ERQNGVLNSWTDQSDKSTYSMSSTLLTKDEYERHNSYTCETHKSTSPIVKSFN RNES gfgaaacaaagcaactattgcaactggcaactcttaccgctctatttaccctctggcaaaagccaggtccagctgcagcag ctlagggctgaacttggatgctggggctcagfgaagatgcttcaagactctggctacacattctgactactgggt acactgggagagcagagggcctggacaagccttgagggatcgagcagcattgattctgatacttlaaagactaca gtcagaagtttaaggcagggccacttgactgtagcgaatccctccagcacagctctacatgcaactcagcagcctgac atctgaggactctggctctattactgctcaaggggggctctctcagtaclggggccaagggcaccactctcacagctc ctcagccaaaaagacacccccactgctctalccactggccccctggatctgctgccccaaactaacctcattgggacccctgg gatccttgcaagggctattccctgagcagtgacagtgacctggactctggatccctctocagcgggtgacacact tcccagctgctcctgagctgacccctacactctgagcagctcagtgactgccccccagcacctggccccagcagac gacacctgcaacgtggccccccccggccagcagcaaccaaggtggacaagaaattgtgccagggatgicactcaicac calcaacactactaa atgaaatacctattgctcaccgagcggcctggattgtattactctgctgccccaccagccaaggccagactcagctgacc cagctccagcctccctactctgactctgaggagaaactgcaacctcacatgctgagcaagtgaaacatttacagttatt agcattgtaicagcagaaacagggaaaatctccctcagctcctgctctataatacaaaaaccttagggagaaggtgctcca tcaaggctcagtgaggcagtgatggggcacacaattttctctgaagalcaacagcctgcagcctgaaagtttgggagttat actgcaacatcattatgactcactcactcagctcggctcgggacaaggtggaataaaaacgggctgatgctgacca actglatcactctccaccatccagtgagcagttacatctggaggtgctcagctgctgctcttgaacaactctaccoc aaagacalcaatgcaagtggaagattgagcagtgaaagcagaaaatggcgcctgacagctggactgatcaggac agcaaaagacagcactccagcagtgagcagcaccctcagctggaccaagggacgaglatgaaagacataaacagctata cctgtgaggccactcacaagacatcaactcacccttgcaagagctcaacaggaatgagcttaa
54	nt VH_A3	
55	nt VK_A3	atgaaatacctattgctcaccgagcggcctggattgtattactctgctgccccaccagccaaggccagactcagctgacc cagctccagcctccctactctgactctgaggagaaactgcaacctcacatgctgagcaagtgaaacatttacagttatt agcattgtaicagcagaaacagggaaaatctccctcagctcctgctctataatacaaaaaccttagggagaaggtgctcca tcaaggctcagtgaggcagtgatggggcacacaattttctctgaagalcaacagcctgcagcctgaaagtttgggagttat actgcaacatcattatgactcactcactcagctcggctcgggacaaggtggaataaaaacgggctgatgctgacca actglatcactctccaccatccagtgagcagttacatctggaggtgctcagctgctgctcttgaacaactctaccoc aaagacalcaatgcaagtggaagattgagcagtgaaagcagaaaatggcgcctgacagctggactgatcaggac agcaaaagacagcactccagcagtgagcagcaccctcagctggaccaagggacgaglatgaaagacataaacagctata cctgtgaggccactcacaagacatcaactcacccttgcaagagctcaacaggaatgagcttaa
56	aa VH_CDR1_A3	GYTFSDYWVHW
57	aa VH_CDR2_A3	GAIDGSDTFNDYSQKFK
58	aa VH_CDR3_A3	ARGLLQY
59	aa VK_CDR1_A3	RASENIYSYLA
60	aa VK_CDR2_A3	NTKTLGE
61	aa VK_CDR3_A3	QHHYGTPT
62	nt VH_CDR1_A3	ggctacacattctgactactgggtacactgg
63	nt VH_CDR2_A3	ggagcagatgatggtctgatacttttaagactacagtcagaagtttaag
64	nt VH_CDR3_A3	gcaagggggggcctctcaglac
65	nt VK_CDR1_A3	cgagcaagtgaaaacattacagttattagca
66	nt VK_CDR2_A3	aatacaaaaaccttaggagaa
67	nt VK_CDR3_A3	caacatcattatggtactcactcagc
68	IGHV1-69*01 (AC073939)	ggctacacctcaccagctactggatgcaactgg
69	IGHV1-69*01 (AC073939)	ggagagatlgactctgtagttataactacaatcaaaagttcaag
70	IGKV12-44*01 (AJ235955)	cgagcaagtgagaatattacagttattagca
71	IGKV12-44*01 (AJ235955)	aatgcaaaaaccttagcagaa
72	IGKV12-44*01 (AJ235955)	caacatcattatggtactcctcc

RIVENDICAZIONI

1. Anticorpo o sua porzione legante l'antigene che si legano specificamente a BST-1 comprendenti:

a) una regione variabile della catena pesante comprendente:

i) una prima vhCDR comprendente la SEQ ID NO: 10;

ii) una seconda vhCDR comprendente una sequenza scelta nel gruppo composto dalle SEQ ID NO:12 e SEQ ID NO:51;

iii) una terza vhCDR comprendente la SEQ ID NO:14; e

b) una regione variabile della catena leggera comprendente:

i) una prima vlCDR comprendente la SEQ ID NO:16;

ii) una seconda vlCDR comprendente la SEQ ID NO:18; e

iii) una terza vlCDR comprendente una SEQ ID NO: 20.

2. Anticorpo o sua porzione legante l'antigene secondo la rivendicazione 1 comprendenti:

a) una catena pesante identica almeno per il 95% alla SEQ ID NO:2, e

una catena leggera identica almeno per il 95% alla SEQ ID NO: 4;

o

b) una catena pesante identica almeno per il 95% alla SEQ ID NO: 46, e

una catena leggera identica almeno per il 95% alla SEQ ID NO: 49.

3. Anticorpo secondo la rivendicazione 1 o la rivendicazione 2, in cui l'anticorpo è un anticorpo a lunghezza intera di un isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

4. Anticorpo o sua porzione legante l'antigene secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3 comprendenti inoltre un gruppo funzionale attaccato covalentemente, facoltativamente in cui il suddetto gruppo funzionale è un farmaco.

5. Anticorpo o sua porzione legante l'antigene secondo la rivendicazione 4 in cui il suddetto farmaco viene scelto nel gruppo consistente di un maitansinoide, una dolastatina, un'auristatina, un tricotecene, una calicheamicina, CC1065 e loro derivati.

6. Anticorpo o sua porzione legante l'antigene secondo qualsiasi rivendicazione precedente, in cui il suddetto anticorpo o la suddetta sua porzione legante l'antigene inducono citotossicità dei linfociti T e/o sono un anticorpo bispecifico.

7. Anticorpo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-5, in cui il suddetto anticorpo induce citotossicità mediata dalle cellule dipendente dall'anticorpo (ADCC), o citotossicità dipendente dal complemento (CDC), facoltativamente in cui l'anticorpo è un anticorpo ingegnerizzato avente legame aumentato a recettori per l'Fc e/o potenza aumentata per l'ADCC.

8. Anticorpo o sua porzione legante l'antigene secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-6, in cui l'anticorpo è un anticorpo bispecifico o multispecifico che si lega specificamente ad un primo antigene comprendente BST1 e ad un secondo antigene scelto nel gruppo consistente di antigene CD3 e antigene CD5.

9. Acido nucleico codificante:

a) una catena pesante dell'anticorpo o un suo frammento legante l'antigene di qualsiasi rivendicazione precedente; e

b) una catena leggera dell'anticorpo o un suo frammento legante l'antigene di qualsiasi rivendicazione precedente.

10. Cellula ospite contenente l'acido nucleico della rivendicazione 9.

11. Metodo per preparare un anticorpo o una sua porzione legante l'antigene comprendente il sottoporre a coltura una cellula ospite secondo la rivendicazione 10 in condizioni in cui l'anticorpo o una sua porzione legante l'antigene vengono espressi e facoltativamente isolare l'anticorpo o una sua porzione legante l'antigene.

12. Anticorpo o sua porzione legante l'antigene di qualsiasi delle rivendicazioni 1-8 per uso in terapia in cui:

a) l'anticorpo o la sua porzione legante l'antigene vengono internalizzati da una cellula esprimente BST1, il suddetto anticorpo comprendendo un coniugato farmaco attaccato covalentemente; o

b) l'anticorpo induce citotossicità mediata dalle cellule dipendente dall'anticorpo (ADCC), citotossicità dipendente dal complemento (CDC) e/o citotossicità dei linfociti T.

13. Anticorpo o sua porzione legante l'antigene per uso secondo la rivendicazione 12 in cui l'uso è il trattamento del cancro, compresi leucemia mieloide acuta (LMA), leucemia linfocitica cronica dei linfociti B, cancro della mammella, cancro del colon-retto, cancro del rene, cancro della testa e del collo, cancro del polmone, cancro ovarico o cancro del pancreas.

14. Anticorpo o sua porzione legante l'antigene come rivendicato in una qualsiasi delle rivendicazioni 1-8 per uso in terapia o per uso come

medicamento.

*** **

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.


Marco Giovanni Mari
USBM - CPI-090

LEGENDA DELLE TAVOLE DEI DISEGNI

TAVOLA 1/6

Figura 1a

“Figure” = Figura

“VH CDR1 alignments” = Allineamenti della CDR1 di VH

Figura 1b

“Figure” = Figura

“VH CDR2 alignments” = Allineamenti della CDR2 di VH

TAVOLA 2/6

Figura 2a

“Figure” = Figura

“VK CDR1 alignments” = Allineamenti della CDR1 di VK

Figura 2b

“Figure” = Figura

“VK CDR2 alignments” = Allineamenti della CDR2 di VK

Figura 2c

“Figure” = Figura

“VK CDR3 alignments” = Allineamenti della CDR3 di VK

TAVOLA 3/6

Figure 3a e 3b

“Figure” = Figura

“Unstained” = Non colorate

TAVOLA 4/6

Figura 4a

“Figure” = Figura

“Internalization: BST1_A2 vs H226” = Internalizzazione: BST1_A2 rispetto a H226

“Media” = Terreno

Figura 4b

“Figure” = Figura

“Internalization: BST1_A2 vs A549” = Internalizzazione: BST1_A2 rispetto a A549

“Media” = Terreno

TAVOLA 5/6

Figure 5,6,7

“Figure” = Figura

TAVOLA 6/6

Figura 8a

“Figure” = Figura

“% cell kill” = % di uccisione cellulare

“BST1_A2 parental” = BST1_A2 progenitore

“Positive control” = Controllo positivo

“Hum IgG iso” = controllo isotipico con IgG umana

Figura 8b

“Figure” = Figura

“% cell kill” = % di uccisione cellulare

“BST_A2 parental” = BST_A2 progenitore

“Isotype control” = Controllo isotipico

*** **

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.

Marco Giovanni Mari
03BM - GPL 090

VH CDR1 Alignments

A1

SEQ ID No: 21 ggctacgcattcagtaactcctggataaactgg
SEQ ID No: 33 ggctacgcattcagtagctactggatgaactgg

A2

SEQ ID No: 22 ggttactcattcattgagtagaccataaactgg
SEQ ID No: 35 ggttactcattcactgactacaacatgaactgg

A3

SEQ ID No: 62 ggctacacattctctgactactgggtacactgg
SEQ ID No: 68 ggctacaccttcaccagctactggatgcactgg

Figure 1a

VH CDR2 Alignments

A1

SEQ ID No: 23 ggacagatttatcctggagattatgataactacaatggaaaattcaag
SEQ ID No: 34 ggacagatttatcctggagatggtgataactacaacggaaagtccaag

A2

SEQ ID No: 24 ggaaatattgatccttattatggaaccacttat tacaatcagatgttcacg
SEQ ID No: 36 ggagtaattaatcctaactatggtactactagctacaatcagaagttcaag
*** *** ***** * ***** ** *** ***** ***** *

A3

SEQ ID No: 63 ggagcgattgatggctctgatacttttaatgactacagtcagaagtttaag
SEQ ID No: 69 ggagagattgatccttctgatagttataactacaatcaaaagttcaag
*** ***** ***** ** * ***** *** ***** **

Figure 1b

VK CDR1 Alignments

A1
 SEQ ID No: 27 actgccagctcacgtgtaagttccagttacttgcac
 SEQ ID No: 37 actgccagctcaagtgtaagttccagttacttgcac

A2
 SEQ ID No: 28 agtgccagctcaagtgtaacttacatgtac
 SEQ ID No: 40 agtgccagctcaagtgtaagttacatgtac

A3
 SEQ ID No: 65 cgagcaagtgaaaacatttacagttatttagca
 SEQ ID No: 70 cgagcaagtgagaatatttacagttatttagca
 ***** ** *****

Figure 2a

VK CDR2 Alignments

A1
 SEQ ID No: 29 agtacatccaacctggcttct
 SEQ ID No: 38 agcacatccaacctggcttct
 ** *****

A2
 SEQ ID No: 30 gacacatccaacctggcttct
 SEQ ID No: 41 gacacatccaacctggcttct

A3
 SEQ ID No: 66 aatacaaaaaaccttaggagaa
 SEQ ID No: 71 aatgcaaaaaaccttagcagaa
 *** *****

Figure 2b

VK CDR3 Alignments

A1
 SEQ ID No: 31 caccagtatcatcggtccccgtacag
 SEQ ID No: 39 caccagtatcatcggtcccccaccca--
 ***** **

A2
 SEQ ID No: 32 cagcagtggagtaattaccactcag
 SEQ ID No: 42 cagcagtggagtagttaccaccca--
 ***** **

A3
 SEQ ID No: 67 caacatcattatggtaactccattcag
 SEQ ID No: 72 caacatcattatggtaactccctcc----

Figure 2c

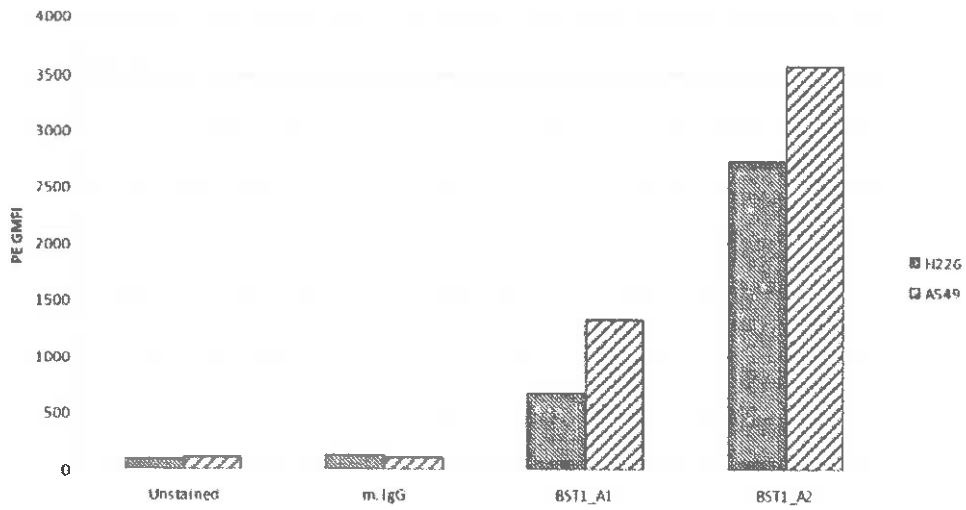


Figure 3a

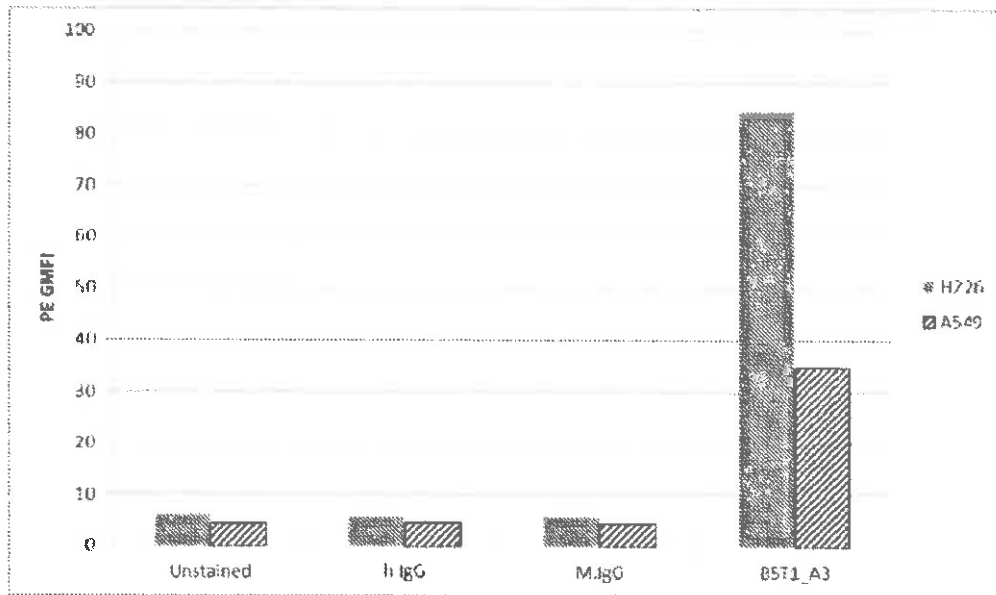


Figure 3b

Marco Giovanni Mari
USBM - CPI-090

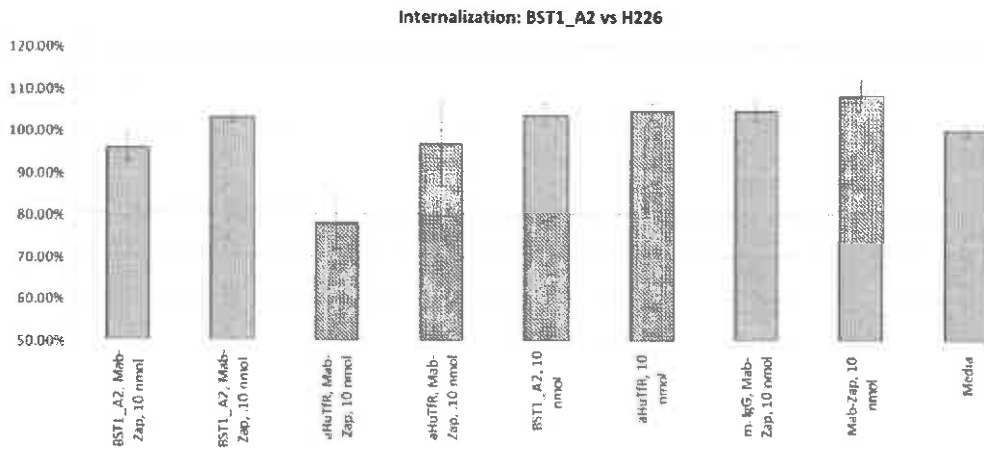


Figure 4a

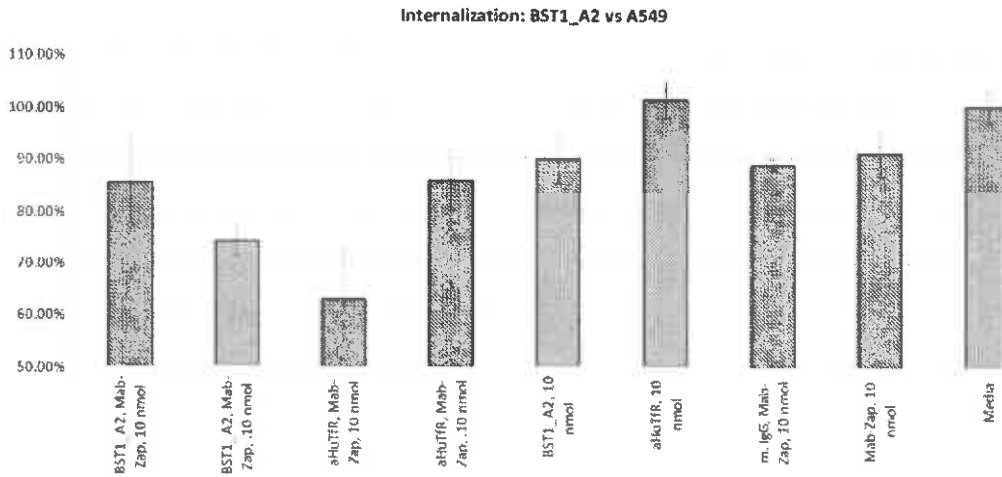


Figure 4b

		1	2	3	4
		123456789	0123456789	0123456789	0123456789
SEQ ID No: 45		QAYIQQSGP	ELVKAGASVK	M S C K A S G Y S F	T E Y T I N W V K Q
SEQ ID No: 46		QVQLVQSGA	EVKKPGASVK	V S C K A S G Y S F	I E Y T I N W V R Q
SEQ ID No: 47		QVQLVQSGA	EVKKPGASVK	V S C K A S G Y S F	T XXXXXXXXV R Q
		5	6	7	8
		01223456789	0123456789	0123456789	0122223456789
SEQ ID No: 45		NIDPYYGTTY	NQMF TGRATL	TVDOSEN T AY	MQLKSLTSEDSAV
SEQ ID No: 46		NIDPYYGTTY	NQMF TGRATL	TVDT S ISTAY	MEL S R L R S EDTAV
SEQ ID No: 47		XXXXXXXXXX	XXXXXXXXRV T L	TRDT S ISTAY	MEL S R L R S EDTAV
		9	0	1	
		0123456789	0123456789	0123	
SEQ ID No: 45		YFCAR GSAWF	-PYWQGT L V	TVSA	
SEQ ID No: 46		YYCAR GSAWF	-PYWQGT L V	TVSS	
SEQ ID No: 47		YYCARXXXXX	XXXWQGT L V	PVSS	

Figure 5

		1	2	3
		123456789	0123456789	0123456789
SEQ ID No: 48		DIVMSQSPA	IMSASPG E KV	TMT C SAS-SS
SEQ ID No: 49		DIQMTQSPS	SLSASV G DRV	TIT C SAS-SS
SEQ ID No: 50		DIQMTQSPS	SLSASV G DRV	TITCXXXXXXXX
		4	5	6
		0123456789	0123456789	0123456789
SEQ ID No: 48		PGSSPRLLIY	D T S N L A S G V P	VRFSGSGSGT
SEQ ID No: 49		PGKAPKLLIY	D T S N L A S G V P	SRLTISIRME
SEQ ID No: 50		PGKAPKLLIY	XXXXXXXXG V P	SRLTISIRME
		8	9	0
		0123456789	0123456789	01234567
SEQ ID No: 48		AEDTATYYCQ	Q W S N Y P L T F G	AGTKLEIK
SEQ ID No: 49		PEDFATYYCQ	Q W S N Y P L T F G	QGTKVEIK
SEQ ID No: 50		PEDFATYYCX	XXXXXXXX F G	QGTKVEIK

Figure 6

SEQ ID No: 12	G	N	I	D	P	Y	Y	G	T	T	Y	N	Q	M	F
SEQ ID No: 51	G	N	I	D	P	Y	Y	G	T	T	Y	N	Q	M	F

Figure 7

Marco Giovanni (Mari)
 USBM - CPI-090

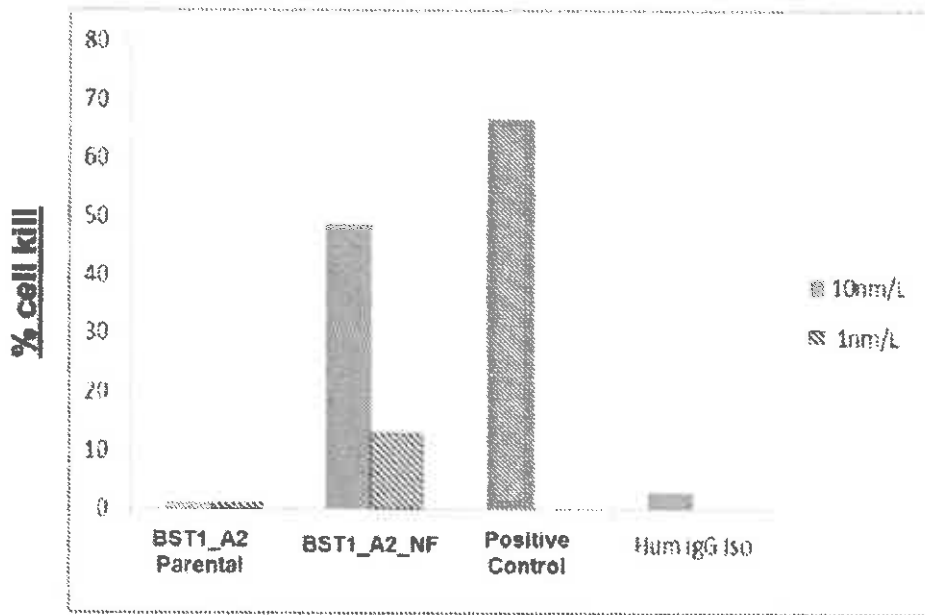


Figure 8a

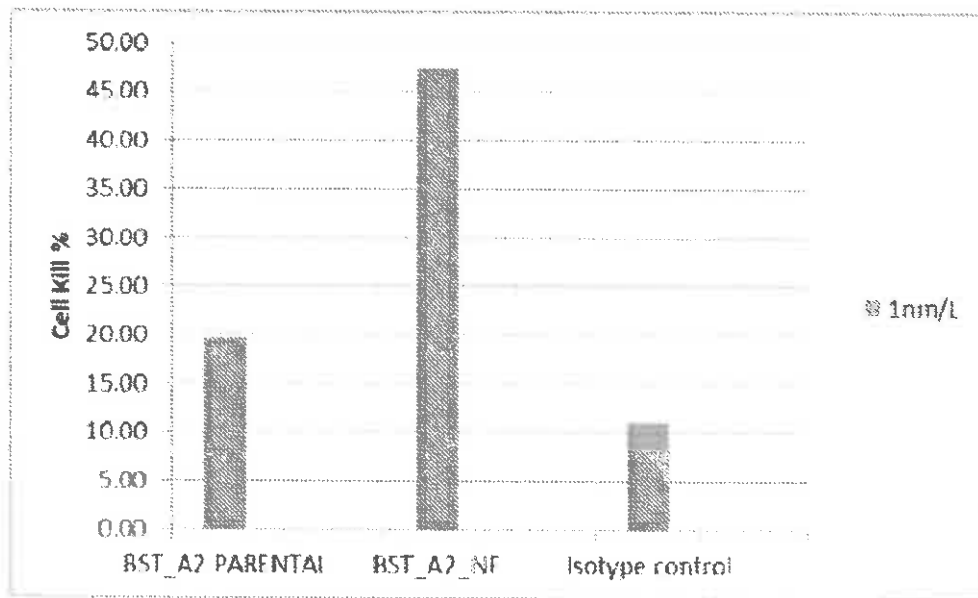


Figure 8b

Marco Giovanni Mari
USBM - CPT-090