

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-014090-00016-0000
Fecha: 2014-01-14 16:55:02 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 33

Medellín
María Clara Múncra
Eddie Manotas

Re: Expediente No. 10-014.090

Solicitud de Patente de Invención titulada: "UN ANTICUERPO ANTI-CD37
DERIVADO DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL MURINO".

Solicitante: BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH

Nuestra Ref.: COP2009/100001

MEMORIAL DE ALCANCE

CARLOS R. OLARTE, mayor de edad y vecino de Bogotá, D.C., identificado tal como aparece al pie de mi firma, en mi carácter de apoderado de la sociedad en referencia, me permito dar alcance a Recurso de Reposición enviado al correo electrónico contactenos@sic.gov.co el 13 de enero de 2014, a las 22:13, con el fin de aportar el memorial original.

Por lo anterior, solicito amablemente al Despacho tenga por fecha de radicación del mismo el día 13 de enero de 2014. Para tal efecto adjunto documentos físicos del memorial junto con el comprobante de envío vía correo electrónico.

Atentamente,

CARLOS R. OLARTE
CC. No.79.782.747 de Bogotá
T.P. 74.295

Adjunto: Lo enunciado



mailto:office@olartemoure.com

Fwd: Expediente N° 10-014.090 - COP2009/100001 - Recurso de Reposición y anexos

OlarteMoure Office <office@olartemoure.com>

13 de enero de 2014, 22:13

Para: contactenos@sic.gov.co

Cco: luz.bulla@olartemoure.com

Estimados señores:

Me permito adjuntar el Recurso de Reposición para el expediente en referencia.

Cordial saludo,

OLARTEMOURE

Carrera 5 N° 34-03

Bogotá, Colombia 110311

Tel : +57 1 601-7700

Fax : +57 1 601-7799

office@olartemoure.com

www.olartemoure.com

6 archivos adjuntos**140113 RR (COP2009-100001)-copia.pdf**
636K**140113 Anexo 1.pdf**
90K**140113 Anexo 2.pdf**
386K**140113 Anexo 3.pdf**
292K**140113 Anexo 4.pdf**
2018K**140113 Anexo 5.pdf**
462K

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____ D. _____

Re: Expediente N° 10-014.090

**Solicitud de Patente de Invención Titulada: "UN ANTICUERPO ANTI-CD37
DERIVADO DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL MURINO"**

Solicitante: BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH

Nuestra Ref.: COP2009/100001

RECURSO DE REPOSICIÓN

CARLOS R. OLARTE, mayor de edad y vecino de Bogotá, D.C., identificado como aparece al pie de mi firma, en mi condición de apoderado de la sociedad solicitante, y dentro del término legal previsto por el artículo 51 del Código Contencioso Administrativo, me permito interponer RECURSO DE REPOSICIÓN en contra de la Resolución No. 73078, notificada por edicto desfijado el 3 de enero de 2014.

1. ANTECEDENTES

La solicitud de patente ventilada en este expediente contiene un capítulo reivindicatorio con 12 reivindicaciones (radicado el 19 de julio de 2013, en respuesta al primer y único examen de fondo expedido el 05 de marzo de 2013). Según la Resolución No. 73078, el Despacho niega la totalidad de las reivindicaciones por supuesta falta de novedad y nivel inventivo.



4

2. OBJETO DEL RECURSO

Que se revoque la Resolución recurrida, y en su lugar se conceda el privilegio de patente de invención para las reivindicaciones pendientes de la presente solicitud, o aquellas que el Despacho considere cumplen con los requisitos de patentabilidad.

3. FUNDAMENTO DEL RECURSO

Con referencia a los argumentos presentados por la SIC para desvirtuar el nivel inventivo de la presente solicitud en la Resolución aquí recurrida, respetuosamente difiero del análisis expuesto, y procedo a refutar cada uno de dichos argumentos, exponiendo las motivaciones técnicas que desvirtúan la posición de ese Despacho.

3.1 a- La SIC insiste en que la patente US2005238646 (D1) afecta la novedad de la Reivindicación 1.

La SIC presenta la siguiente tabla comparando las características esenciales de D1 y el anticuerpo de la Reivindicación 1:

Comparación de las características técnicas esenciales, con las del estado de la técnica:	
Características esenciales	D1
Anticuerpo quimérico que se una a CD37	Anticuerpo quimérico que se una a CD37
Cadena pesada variable SEQ ID NO: 2	Con la SEQ ID NO: 13 (Pág. 36)
Cadena ligera variable SEQ ID NO: 4	
Cadenas pesadas y ligeras constantes que son de origen humano	Cadenas pesadas y ligeras constantes que son de origen humano

El Despacho argumenta que el Capítulo Descriptivo establece que las SEQ ID NO: 24 y 26 corresponden a la fusión de las SEQ ID NO: 2 y 4 a las regiones constante IgG1 y kappa humanas, de manera que las características esenciales de la Reivindicación 1 habían sido divulgadas previamente en el documento D1, el cual da a conocer un anticuerpo con SEQ ID NO 13 (pág. 36), el cual contiene las cadenas variables ligera y pesada idénticas a las SEQ ID NO: 2 y 4 de la presente solicitud.

Adicionalmente, la SIC argumenta que D1 divulga que dichas regiones variables liviana y pesada pueden fusionarse con regiones constantes liviana y pesada, tal como IgG1 y kappa (párrafos [0021], [0025] y [0065]), así como los ácidos nucleicos que los codifican (párrafo [0094]), vectores que contienen dichos ácidos nucleicos, células hospederas para su expresión (párrafo [0107]), el uso de dichas moléculas para obtener composiciones (párrafo [0147]) y su uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con células B (párrafo [0029]).

Finalmente, la SIC señala que:

“Se aclara al solicitante que la humanización de anticuerpos murinos es bien conocida en el estado de la técnica³, a través de métodos para producir anticuerpos que consisten en regiones variables de ratón específicas para un epítipo se unen a segmentos que codifican regiones humanas constantes Ig y kappa. En consecuencia la reivindicación 1 no es nueva, según lo divulgado en D1”¹ (mi negrilla, mi subrayado)

b- i) En primer lugar, me permito llamar nuevamente la atención del Despacho sobre el hecho que para fundamentar una afectación válida contra la novedad de una invención, el arte previo debe divulgar explícitamente todas y cada una de las características de la invención². Es más, el Tribunal Andino de Justicia (TAJ) ha determinado que para establecer una objeción válida contra la novedad, la divulgación del arte previo debe ser lo suficientemente detallada para que una persona versada en la materia pueda usar dicha información para reproducir y explotar la invención³.

ii) A la luz de los anteriores lineamientos, es relevante explicar nuevamente la materia divulgada en D1 y compararla con lo reclamado en la Reivindicación 1 del Capítulo Reivindicatorio presentado en mi respuesta al primer examen de fondo.

La presente invención reclama en la Reivindicación 1: un anticuerpo quimérico, denominado A0, que se une a CD37 humano que se define por: i) una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 2; ii) una región variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 4; iii) una región constante de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 24; y iv) una región constante de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 26.

No se entiende en qué sección del Capítulo Descriptivo la SIC encontró que “las SEQ ID NO: 24 y 26 corresponden a la fusión de las SEQ ID NO: 2 y 4 a las regiones constante IgG1 y kappa humanas”⁴, pues tal y como lo establece la Tabla 2 del Capítulo Descriptivo, el anticuerpo de la Reivindicación 1 (A0), presenta las siguientes características estructurales:

¹ Resolución No. 73078, notificada por edicto desfijado el 03 de enero de 2014, página 4, primer párrafo.

² Manual Andino de Patentes. (2004). Sección 9.4. (disponible en <http://www.comunidadandina.org/public/patentes.pdf>).

³ Proceso 06-IP-89 (<http://intranet.comunidadandina.org/Documentos/Procesos/209-IP-2005.doc>); y Proceso 36-IP-2004 (<http://www.notinet.com.co/serverfiles/servicios/archivos/30jul04/ca36-04.htm>)

⁴ Resolución No. 73078, notificada por edicto desfijado el 03 de enero de 2014, página 3, segundo párrafo.

I	II	III	IV	V	VI
Ab	Fc substitution(s) (Kabat numbering)	SEQ ID NO: v heavy chain aa/DNA	SEQ ID NO: v light chain aa/DNA	SEQ ID NO: complete heavy chain aa/DNA	SEQ ID NO: complete light chain aa/DNA
A0	-	seq 2/1	seq 4/3	2/1 fused to 24/23	4/3 fused to 26/25

Tal y como se desprende de la anterior sección de la Tabla 2, el anticuerpo quimérico reclamado en la Reivindicación 1 presenta: una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 2 y una región variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 4 (columnas III y IV). Adicionalmente, las cadenas pesada y ligera completas corresponden a las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO:2 fusionada con la SEQ ID NO:24 y SEQ ID NO:4 fusionada con la SEQ ID NO:26, tal y como se encuentra caracterizado y reclamado en la Reivindicación 1.

Ahora bien, un análisis de novedad adecuado requiere que el Despacho encuentre en el arte previo un documento que divulgue un anticuerpo quimérico que contenga explícitamente todas y cada una de las características esenciales del anticuerpo reivindicado. Esto es, en el caso de la Reivindicación 1, un anticuerpo quimérico caracterizado por:

- i) una región variable de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 2;
- ii) una región variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 4;
- iii) una región constante de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 24; y
- iv) una región constante de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 26.

iii) Habiendo identificado las características esenciales del anticuerpo de la Reivindicación 1, resulta pertinente compararlas con la materia divulgada en D1, como lo realicé en respuesta al primer y único examen de fondo.

D1 divulga proteínas de fusión de inmunoglobulina y dominios de unión diseñados molecularmente y proteínas de unión recombinantes inmunológicamente activas, incluyendo proteínas de fusión de inmunoglobulina y una cadena sencilla Fv.

Argumenta la SIC que la SEQ ID NO:13 de D1 anticipa las secuencias SEQ ID NO: 2 y 4 del anticuerpo de la Reivindicación 1. La página 36 que referencia la SIC efectivamente divulga la

7

SEQ ID NO:13 que corresponde, como allí se indica bajo el título “*Other Information*” a un fragmento variable de cadena sencilla o simple de ratón anti-CD37 humano, como nuestro a continuación:

```
<210> SEQ ID NO 13
<211> LENGTH: 259
<212> TYPE: PRT
<213> ORGANISM: Mus musculus
<220> FEATURE:
<221> NAME/KEY: SITE
<222> LOCATION: (1)..(259)
<223> OTHER INFORMATION: MOUSE ANTI-HUMAN CD37 SCFV
```

La SEQ ID NO:13 de D1 corresponde a un fragmento variable de cadena sencilla que proviene de ratón, y que es anti-CD37 humano. Sin embargo, el anticuerpo quimérico de la Reivindicación 1 no solo incluye las secuencias SEQ ID NO: 2 y 4, sino que además contiene: iii) una región constante de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 24; y iv) una región constante de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 26.

Es decir, aplicando los lineamientos del Manual de Andino de Patentes y del Tribunal Andino de Justicia respecto a la novedad, D1, y específicamente la SEQ ID NO:13 de D1 debería divulgar explícitamente la secuencia de aminoácidos de las cuatro regiones/cadenas que caracterizan el anticuerpo de la Reivindicación 1, y no únicamente las regiones variables, tal como la región de cadena pesada de secuencia SEQ ID NO: 2 y la región variable de cadena ligera de secuencia SEQ ID NO: 4.

Así, si aplicamos los lineamientos citados, no existe ningún anticuerpo divulgado en D1 que divulgue explícitamente todas y cada una de las secuencias de aminoácidos de las cuatro regiones/cadenas que caracterizan el anticuerpo de la Reivindicación 1, por lo que el anticuerpo de la Reivindicación 1 es novedoso.

c- Ahora bien, la SIC argumenta que:

“Se aclara al solicitante que la humanización de anticuerpos murinos es bien conocida en el estado de la técnica³, a través de métodos para producir anticuerpos que consisten en regiones variables de ratón específicas para un epítipo se unen a segmentos que codifican regiones humanas constantes Ig y kappa. En consecuencia la reivindicación 1 no es nueva, según lo divulgado en D1”⁵ (mi negrilla, mi subrayado)

⁵ Resolución No. 73078, notificada por edicto desfijado el 03 de enero de 2014, página 4, primer párrafo.

Pareciera entonces que en la evaluación de novedad del anticuerpo de la Reivindicación 1, la SIC considera pertinente mencionar que la humanización de anticuerpos **“es bien conocida en el estado de la técnica”**.

Sin embargo, durante el análisis de novedad la SIC sólo debería determinar si en el arte previo se divulga explícitamente un **anticuerpo quimérico** caracterizado porque contiene las secuencias de aminoácidos de las cuatro regiones/cadenas que caracterizan el anticuerpo de la Reivindicación 1, más no debería analizar si la humanización de anticuerpos **“es bien conocida en el estado de la técnica”**.

De hecho, la Guía para Examen de Solicitudes de Patente de Invención y Modelo de Utilidad de la SIC, en la determinación de la novedad en el campo de la biotecnología establece lo siguiente:

*“Si un anticuerpo X reivindicado, definido por su función y estructura, que se une a un antígeno A es nuevo, cualquier otro anticuerpo del estado de la técnica que se une a ese mismo antígeno no afecta la novedad del anticuerpo X; **tan solo afectaría la novedad si tuviera el mismo epítipo o la misma estructura del anticuerpo X**”⁶ (mi negrilla, mi subrayado)*

Así, y como lo determina la SIC en sus lineamientos, **la novedad de un anticuerpo caracterizado por su estructura sólo puede ser afectada si existe en el arte previo un anticuerpo con la misma estructura del anticuerpo reivindicado**, lo cual NO ocurre en el presente caso, pues como se explicó en el punto anterior, D1 únicamente divulga la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y ligera (SEQ ID NO: 2 y 4), más no las regiones constantes específicas de cadena pesada y ligera (SEQ ID NO: 24 y 26) que presenta el anticuerpo de la Reivindicación 1 (A0), por lo que D1 no puede afectar su novedad.

En otras palabras, **no existe** en el arte previo, particularmente D1, un anticuerpo que divulgue **explícitamente** todas y cada una de las secuencias de aminoácidos de las cuatro regiones/cadenas que caracterizan el anticuerpo de la Reivindicación 1, por lo que el anticuerpo de la Reivindicación 1 es novedoso.

⁶ Guía para Examen de Solicitudes de Patente de Invención y Modelo de Utilidad. Superintendencia de Industria y Comercio de Colombia, 2012, Sección 2.13. Página 69. (disponible en http://api.sic.gov.co/Documentos/Guia_Examen_Patentes.pdf)

Si la SIC insiste en mantener su afirmación en cuanto a que la estructura del anticuerpo quimérico de la Reivindicación 1 se encuentra anticipado por D1, **solicito respetuosamente se señalen de manera expresa** el anticuerpo de D1 que contiene explícitamente las secuencias de aminoácidos de las cuatro regiones/cadenas del anticuerpo de la Reivindicación 1.

3.2. a- La SIC insiste en que las patentes D1 y WO2007/041635 (D2) afectan el nivel inventivo de las Reivindicaciones 2 a 12.

La SIC presenta la siguiente tabla comparando las características esenciales de los anticuerpos divulgados en D1 y D2, y el anticuerpo de la presente invención:

Características esenciales	D1	D2
Anticuerpo quimérico que se una a CD37	Anticuerpo quimérico que se una a CD37 (Pág. 36)	Mutaciones en el dominio Fc para aumentar las funciones efectoras de anticuerpos
Cadena pesada variable SEQ ID NO: 2	Con la SEQ ID NO: 13 (Pág. 36)	
Cadena ligera variable SEQ ID NO: 4		
Cadenas pesadas y ligeras constantes que son de origen humano	Cadenas pesadas y ligeras constantes que son de origen humano	
Una o más mutaciones en el dominio Fc	No se menciona	Una o más mutaciones en el dominio Fc 234, 235, 236, 239, 267, 268, 293, 295, 324, 327, 328, 330 y 332 (Párr. [0012]), incluyendo las mutaciones específicas I332E (Párr. [0058]), S239D, G236A, S239D (Párr. [0091])

A partir de la anterior tabla, el Despacho concluye que:

- D1 divulga un anticuerpo con SEQ ID NO 13 (pág. 36), el cual contiene las cadenas variables liviana y pesada idénticas a las SEQ ID NO: 2 y 4 de la presente solicitud;
- D1 divulga que dichas regiones variables liviana y pesada pueden fusionarse con regiones constantes liviana y pesada, tal como IgG1 y kappa (párrafos [0021], [0025] y [0065]), así como los ácidos nucleicos que los codifican (párrafo [0094]), vectores que contienen dichos ácidos nucleicos, células hospederas para su expresión (párrafo [0107]), el uso de dichas moléculas para obtener composiciones (párrafo [0147]) y su uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con células B (párrafo [0029]).
- la única diferencia entre D1 y la Reivindicación 3 es la inserción de mutaciones en el dominio Fc para obtener las secuencias de cadena liviana y pesada SEQ ID NO 28 y 30;
- el efecto que se logra al incluir dichas mutaciones en el dominio Fc es la modulación de las funciones efectoras del anticuerpo;
- la utilización de mutaciones en el dominio Fc para aumentar las funciones efectoras de anticuerpos (incluyendo ADCC) ya está divulgada en el documento

D2, que se refiere a una variante de Fc de un polipéptido Fc original que comprende al menos una primera y una segunda sustitución en las posiciones 234, 235, 236, 239, 267, 268, 293, 295, 324, 327, 328, 330 y 332 (párrafo [0012]), incluyendo las mutaciones específicas I332E (párrafo [0058]), S239D, G236A (Párrafo [0091]);

- cualquier persona medianamente versada en la materia incluiría las mutaciones en el dominio Fc del documento D2 en el anticuerpo divulgado en D1, para así producir el anticuerpo de la presente invención;
- las Reivindicaciones 3 a 12 no mencionan características adicionales, y por lo tanto, tales reivindicaciones tampoco revisten nivel inventivo.

b- i) En primer lugar, me permito aclarar nuevamente que la presente invención reclama en sus Reivindicaciones 1 a 5, los anticuerpos quiméricos denominados A0, A2 y A4. Los tres anticuerpos comparten las mismas cadenas de aminoácidos de las regiones variables pesada y ligera correspondientes a la SEQ ID NO:2 y 4, pero se diferencian en las secuencias de aminoácidos de las regiones constante de cadena pesada y ligera, pues para el anticuerpo A0 son las secuencias SEQ ID NO: 24; y SEQ ID NO: 26 (Reivindicación 1), para el anticuerpo A2 son las secuencias SEQ ID NO: 28; y SEQ ID NO: 30 (Reivindicación 2) y para el anticuerpo A4 son las secuencias SEQ ID NO: 32; y SEQ ID NO: 34 (Reivindicación 4). Valga aclarar que las Reivindicaciones 1, 2 y 4 son independientes.

Adicionalmente, el anticuerpo A2 comprenden una combinación de sustituciones en las posiciones 239 y 332, donde dichas sustituciones son I332E y S239D (Reivindicación 3), el anticuerpo A4 presenta una combinación de sustituciones en las posiciones 236, 239 y 332, donde dichas sustituciones son S239D, I332E y G236A (Reivindicación 4), y el anticuerpo A0 no presenta ninguna combinación de sustituciones.

Finalmente, las Reivindicaciones independientes 6 a 8 reclaman una molécula de ADN, caracterizada por las regiones que codifican para las regiones variables y constantes humanas de cadena pesada y ligera que caracterizan los anticuerpos A0, A2 y A4.

ii) Ahora bien, contrario a los argumentos de la SIC y como mencioné anteriormente, D1 divulga **proteínas de fusión de inmunoglobulina y dominios de unión** diseñados molecularmente y proteínas de unión recombinantes inmunológicamente activas, incluyendo proteínas de fusión de inmunoglobulina y una cadena sencilla Fv.

En particular, la SEQ ID NO:13 representa un fragmento variable de cadena sencilla que proviene de ratón, y que es anti-CD37 humano, que solamente divulga las SEQ ID NO:2 y 4 que corresponden a la secuencia de las **regiones variables de cadena pesada y ligera** de los anticuerpos A0, A2 y A4. Sin embargo, ningún aparte de D1 muestra secuencias de aminoácidos siquiera parecidas a las regiones constantes de cadena pesada y ligera de los anticuerpos A0, A2 y A4 reivindicados.

Así, el análisis equivocado de D1 lleva a la SIC a concluir que la única diferencia entre la invención de la Reivindicación 3 y D1 consiste en la inserción de mutaciones en el dominio Fc para obtener las secuencias de cadena liviana y pesada SEQ ID NO:28 y 30. Sin embargo, la realidad es que lo único en lo que se parecen los anticuerpos A0, A2 y A4 reivindicados y D1 es en las regiones **variables de cadena pesada y ligera**, pero la SEQ ID NO:13 ni siquiera caracteriza a un anticuerpo sino únicamente un fragmento variable de cadena sencilla que proviene de ratón.

Como es bien sabido, un **anticuerpo murino** es aquel anticuerpo de ratón, por lo que no es útil para el empleo en seres humanos. De otra parte, un **anticuerpo quimérico**, como los de la invención, es un anticuerpo que posee dominios variables de origen murino (de ratón) y regiones constantes de las cadenas pesada y ligera humanas⁷, como se ilustra a continuación:

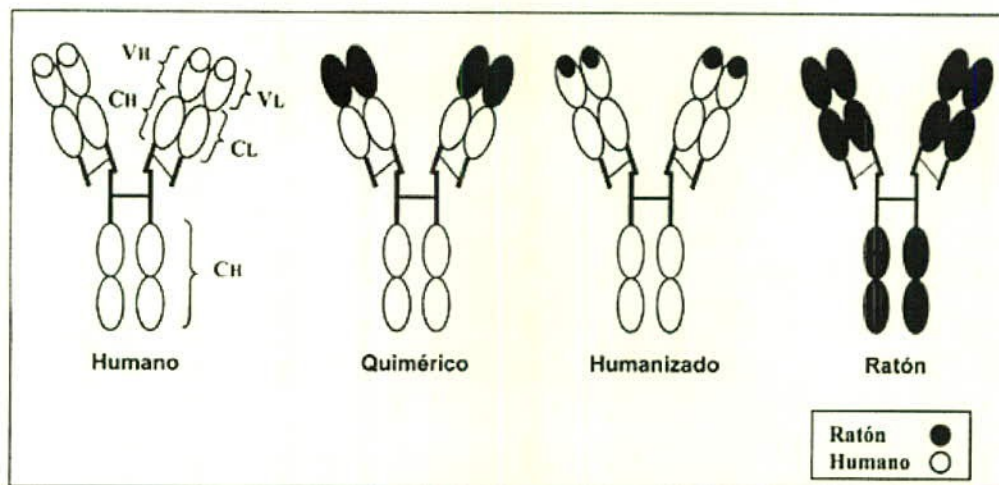


Figura 5: Esquema comparativo de AcMos humanos, quiméricos, humanizados y de ratón. En gris se muestran las secuencias de origen humano y en negro las de origen murino.

Como es evidente, los anticuerpos quiméricos de la presente invención contienen las **regiones variables de cadena pesada y ligera** provenientes de ratón (SEQ ID NO:2 y 4) y contienen **regiones constantes de cadena pesada y ligera** provenientes de humanos. Sin embargo, nada

⁷ Álvarez-Vallina, Luis. "Anticuerpos Monoclonales: Realidades y Perspectivas"; Editorial COMPLUTENSE, 2004; ISBN: 9788474917598; Página 60.

en D1 enseña de manera particular precisamente tales regiones constantes de cadena pesada y ligera que contienen cada anticuerpo A0, A2 y A4 reclamado en las Reivindicaciones 1, 2 y 4.

Así, la diferencia con D1 no es únicamente unas mutaciones en el dominio Fc, sino precisamente, tales regiones constantes de cadena pesada y ligera de cada anticuerpo A0, A2 y A4, las cuales no se encuentran enseñadas o divulgadas en D1.

iii) De otra parte, D2 simplemente divulga variantes de Fc con propiedades de unión a receptor Fc mejoradas, así como los métodos para su producción, polipéptidos Fc que comprenden dichas variantes Fc, y métodos para el uso de dichas variantes Fc con propiedades de unión a receptor Fc mejoradas.

Sin embargo, así se incluyeran las mutaciones sugeridas por D2 en el fragmento variable de cadena sencilla que proviene de ratón de D1 (SEQ ID NO:13) no se obtendría ninguno de los anticuerpos aquí reclamados. Es decir, al combinar las enseñanzas de D1 y D2 que la SIC considera relevantes **NO** se obtienen los anticuerpos A0, A2 y A4 de la presente invención.

iv) Ahora bien, en este punto me permito llamar la atención de la SIC sobre sus mismos lineamientos, expresados en la Guía para Examen de Solicitudes de Patente de Invención y Modelo de Utilidad, que en la sección de nivel inventivo señala lo siguiente:

“La invención no tiene nivel inventivo cuando la combinación de los elementos que proveen la solución está revelada en el estado de la técnica, es decir, no basta con la existencia de los elementos de manera aislada o individualmente considerados para concluir la falta de nivel inventivo, sino que ellos en su totalidad e integridad enseñen de manera evidente la manera de llegar a la solución del problema técnico”⁸ (mi negrilla, mi subrayado)

“Si el estado de la técnica provee las enseñanzas para derivar la solución, revisar si el conjunto de enseñanzas del estado de la técnica lo llevarían de forma inmediata a la solución propuesta por la solicitud. Si se requiere de pasos adicionales o de corroboración o de superar

⁸ Guía para Examen de Solicitudes de Patente de Invención y Modelo de Utilidad. Superintendencia de Industria y Comercio de Colombia, 2012, Sección 2.13. Página 69. (disponible en http://api.sic.gov.co/Documentos/Guia_Examen_Patentes.pdf)

*obstáculos revelados por las propias enseñanzas entonces el estado de la técnica no revela la solución al problema*⁹ (mi negrilla, mi subrayado)

Al aplicar dichos lineamientos al presente caso se tiene que los elementos de la presente invención que solucionan un problema técnico (anticuerpos A0, A2 y A4 que contienen regiones constantes de cadena pesada y ligera específicas), **no** están revelados en D1 y D2. De hecho, aunque D2 divulgue en su contenido algunas de las mutaciones sobre el dominio Fc de diferentes anticuerpos (IgG), esto no significa que la persona medianamente versada en la materia al incluir dichas mutaciones sobre la SEQ ID NO:13 divulgada en D1 llegaría al anticuerpo de la invención.

Así, ni D1 ni D2 siquiera divulgan los elementos que componen el anticuerpo reclamado de manera aislada, y mucho menos, las enseñanzas de D1 y D2 en su totalidad enseñan de **manera evidente** el anticuerpo de la invención. Es decir, como las enseñanzas del estado de la técnica **NO** conducen de forma inmediata a los anticuerpos quiméricos de la invención, entonces D1 y D2 no revelan la solución al problema técnico y la presente invención reviste nivel inventivo.

Si la SIC insiste en mantener su afirmación en cuanto a que la estructura de los anticuerpos quiméricos de la invención se derivan evidentemente del estado del arte, **solicito respetuosamente se enumeren de manera expresa** los hechos incluidos en el arte previo que conducirían a una persona versada en el arte a su obtención, en particular, a la elección particular de las regiones constantes de cadena pesada y ligera específicas.

3.3. a- Respecto a los datos resaltados en mi respuesta al primer examen de fondo, la SIC señala lo siguiente: “la persona normalmente versada en la materia se vería motivada a obtener anticuerpo (sic) quimérico y/o humanizados (sic) con la misma estructura que la reclamada en la solicitud, así como a realizar sustituciones de la región Fc con una **alta expectativa de éxito de conseguir anticuerpos con una actividad mejorada**”¹⁰ (mi subrayado, mi negrilla)

Si se analizan los anteriores apartes citados, la SIC considera que cualquier persona medianamente versada en la materia esperaría “con alta expectativa de éxito” que al incluir las sustituciones divulgadas en D2, la actividad de los anticuerpos se vería mejorada.

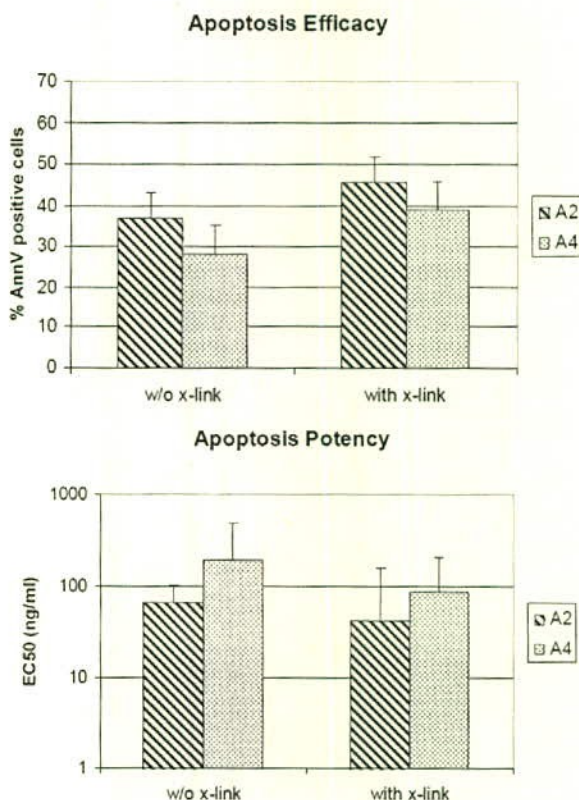
⁹ Ibídem. Sección 2.13.2. Página 71.

¹⁰ Resolución No. 73078, notificada por edicto desfijado el 03 de enero de 2014, página 5, séptimo párrafo.

74

Difiero respetuosamente de la posición de la SIC y de hecho, solicito respetuosamente que se enumeren de manera expresa las razones por las cuales los siguientes resultados específicos son esperables a partir de D2:

- La Figura 6 muestra que los anticuerpos de tipo A tienen marcadamente una **mejor actividad apoptótica**, con respecto a otros anticuerpos evaluados; dicha actividad apoptótica es superior al 70%, incluso sin existir entrecruzamiento.
- El Ejemplo 9 y la Figura 9 enseñan que **el anticuerpo A0 es un potente inductor de la apoptosis**, incluso sin entrecruzamiento.
- El Ejemplo 10 y la Figura 10 muestran que el anticuerpo A0 y las variantes Fc producidas por ingeniería (A2 y A4 en la Figura 10), muestran una actividad pro-apoptótica similar. Es decir, son también **potentes inductores de la apoptosis**.
- el experimento 10 muestra que la ingeniería Fc del anticuerpo A0 no altera su actividad pro-apoptótica.
- El Anexo 1 a mi respuesta al primer examen (adjunto para inmediata referencia) contenía información experimental que demostraba que los anticuerpos A2 y A4 de la presente invención presentan una alta actividad pro-apoptótica con y sin entrecruzamiento en un ensayo en células Ramos:



No se entiende cómo a partir de D2, una persona medianamente versada en la materia podría esperar que cualquier anticuerpo que contenga las modificaciones allí sugeridas presentaría específicamente las anteriores ventajas.

b- Ahora bien, contrario a lo que considera la SIC, y de hecho, evidencia del pobre análisis realizado de D1, dicha anterioridad enseña en la Figura 19B la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC, por sus siglas en inglés) del anticuerpo G28-1.

El anticuerpo G28-1 es un anticuerpo murino anti-CD37 divulgado en la patente WO2005/017149, el cual, como su nombre indica, al ser un anticuerpo murino (de ratón), no comprende secuencias constantes de cadenas pesadas y/o livianas humanas. Es posible encontrar diversa información para el anticuerpo murino G28.1 (en WO2005/017149, por ejemplo la Figura 71 y el Ejemplo 45) y para el SMIP (siglas en inglés que se refieren al “small modular immunopharmaceutical”) derivado de dicho anticuerpo anti-CD37 (que se encuentra divulgado en el documento Zhao, X., et al.¹¹, denominado como Anexo 2 al y adjuntado a mi respuesta al primer examen presente memorial), en la que, se reporta que la actividad pro-apoptótica sin entrecruzamiento es menor. De hecho, la publicación de Zhao, X., et al.¹² (adjunta para inmediata referencia) establece de forma clara que no se observó apoptosis para el SMIP anti-CD37 (G28-1 scFv-Ig) en ausencia de anticuerpos anti FC, lo que significa que no se observó actividad pro-apoptótica alguna con para el SMIP anti-CD37 sin entrecruzamiento (ver el artículo Zhao et al, página 2571, columna derecha en los resultados, líneas 17-19, así como las Figuras 2A, 2C, 5A y FB).

Como es sabido, una característica que se considera favorable en un anticuerpo terapéutico es precisamente una alta actividad pro-apoptótica (especialmente sin entrecruzamiento), ya que se cree que dicha actividad pro-apoptótica de un anticuerpo anti-CD37 juega un papel importante al contribuir en la eliminación de células B del cuerpo del paciente. Por lo tanto, los anticuerpos A0, A2 y A4 aquí reivindicados demuestran, de manera sorprendente, el efecto técnico favorable distintivo sobre la actividad pro-apoptótica, incluso sin entrecruzamiento, lo cual no se encuentra reportado para el anticuerpo murino G28.1 (D1) o el SMIP anti-CD37.

c- A pesar de los anteriores comentarios y argumentos claros, la SIC en lugar de hacer un análisis completo de la información aportada en mi respuesta al primer examen de

¹¹ Zhao, X., et al. “Targeting CD-37 positive lymphoid malignancies with a novel engineered small modular immunopharmaceutical”. Blood. Vol. 110, No. 7. Pages 2569-2577. 2007.

¹² Ibidem.

fondo, se limita simplemente a afirmar que a partir del arte previo existe una “alta expectativa de éxito de conseguir anticuerpos con una actividad mejorada”.

Sin embargo, nada en D2 y mucho menos en D1 le permitirían a una persona medianamente versada en la materia prever los resultados demostrados anteriormente, en particular en comparación con el anticuerpo G28-1. Es decir, ni D1 ni D2 proporcionan sugerencias o enseñanzas que lleven a la producción de los anticuerpos anti-CD37 con la alta actividad pro-apoptótica de la presente invención, y menos llevaría a que la persona medianamente versada en la materia pudiera esperar dicha actividad, incluso sin entrecruzamiento. De hecho, D2 y mucho menos D1, proporciona pista alguna hacia cómo alcanzar dicha alta actividad pro-apoptótica en anticuerpos CD37, incluso sin entrecruzamiento.

En este punto es importante señalar que el análisis de nivel inventivo no puede estar basado en si es o no posible obtener la molécula de anticuerpo quimérico reclamada, pues claramente era posible, toda vez que la misma en realidad existe. Esta aproximación conllevaría a que ninguna invención sería patentable, volviendo así inoperante el sistema de patentes. De igual manera, el criterio tampoco puede involucrar la cuestión de si las técnicas aplicadas en el desarrollo de la invención son comunes u obvias, sino más bien si el método de la invención podía derivarse de manera evidente del arte previo. La evaluación del nivel inventivo debe centrarse únicamente en la cuestión de si, para la persona medianamente versada en la técnica, la materia reivindicada habría podido derivarse de manera obvia a partir del arte previo y sin necesidad de investigación adicional alguna.

En el presente caso, D1 ni D2 proporcionan sugerencias o enseñanzas que lleven a la producción de los anticuerpos anti-CD37 con la alta actividad pro-apoptótica de la presente invención, y menos llevaría a que la persona medianamente versada en la materia pudiera esperar dicha actividad, incluso sin entrecruzamiento.

Así, teniendo en cuenta que, i) los anticuerpos de la invención tienen una estructura inesperada (no derivable por la persona medianamente versada en la materia); ii) las estructuras específicas de los anticuerpos aquí reivindicados no son obvios para una persona medianamente versada en la materia ya que no pueden preverse; y, iii) las propiedades ventajosas son consideradas un signo aceptable de nivel inventivo; y que las moléculas de anticuerpo anti-CD37 quimérico (A0, A2 y A4) aquí reivindicadas presentan una estructura y actividad farmacológica inesperada, se puede concluir que la presente solicitud reviste nivel inventivo.

3.4. Finalmente, me permito informar que para el concepto inventivo comprendido en la presente solicitud, ha sido otorgado hasta el momento el privilegio de patente en Perú con el mismo Capítulo Reivindicatorio que es negado mediante la Resolución aquí recurrida.

En particular, el Informe Técnico No. GMM 78-2012/A donde se realiza el examen de fondo de la contraparte peruana de la presente solicitud (concedida mediante Resolución No. 000676-2013/DIN-INDECOPI del 30 de mayo de 2013) menciona respecto al nivel inventivo lo siguiente:

A la luz de los argumentos mencionados por la solicitante se tiene que los anticuerpos que se pretenden reivindicar presentan las siguientes ventajas frente al del arte previo G28.1:

La figura 6 de la memoria descriptiva muestra que los anticuerpos de tipo A tienen una mejor actividad apoptotica marcada, con respecto a otros anticuerpos evaluados; dicha actividad apoptotica es superior al 70%.

El ejemplo 9 y la figura 9 enseñan que el anticuerpo AO es un potente inductor de la apoptosis, incluso sin entrecruzamiento.

El ejemplo 10 y la figura 10 muestran que el anticuerpo AO y las variantes Fc (A2 y A4 en la figura 10) muestran una actividad pro-apoptotica similar.

Por ultimo, menciona que el experimento 10 muestra que la ingeniería Fc del anticuerpo AO no altera su actividad pro-apoptotica.

Mientras que en el anticuerpo murino G28.1 la actividad proapoptótica sin entrecruzamiento es menor.

De tal manera que al ser favorable en un anticuerpo una alta actividad proapoptótica ya que contribuye en la eliminación de células B del cuerpo del paciente, los anticuerpos que se pretenden reivindicar demuestran el efecto farmacológico mejorado distintivo sobre la actividad proapoptotica, incluso sin entrecruzamiento, lo que no había sido reportado para el anticuerpo murino G28.1 del antecedente D1.

El Informe Técnico No. GMM 78-2012/B concluye, con base en los mismos argumentos, que las reivindicaciones cumplen con el requisito de nivel inventivo. Dichas reivindicaciones corresponden a las reivindicaciones negadas en la presente solicitud de patente.

No se entiende cómo, ante la misma evidencia técnica, dos oficinas con la misma regulación en materia de patentes tales como Colombia y Perú (Decisión 486) hacen un análisis tan diferente, a tal punto que una oficina considera que los datos aportados son evidencia del nivel inventivo (Perú) y la otra oficina considera que los mismos datos son evidentes a la luz del arte previo (Colombia).

Adicionalmente, el nivel inventivo de la presente invención también fue reconocido por la Oficina de Patentes Chilena (INAPI). En particular, el Informe Pericial para la solicitud de patente chilena No. 2349-2008, contraparte de la presente invención, consideró que

Si bien el D 2 describe una forma de producción de anticuerpos quiméricos ratón humano, los anticuerpos específicos no son divulgados.

La persona del oficio normalmente versada en la materia le resultaría obvio quimerizar D 2 el anticuerpo murino del cual proviene el scFv Ig del D 1, pues no esperaría un comportamiento sorprendente de dicha aplicación, sin embargo, no sería obvio otorgar una quimerización específica con las secuencias constantes SEQ ID N° 24 y 26, SEQ ID N° 28 y 30 o SEQ ID N° 32 y 34, con las propiedades señaladas en la solicitud.

La selección realizada por el solicitante no es azarosa ya sea en la elección de Fc como en las sustituciones en la región constante. Los resultados promisorios del invento (ver análisis de la memoria descriptiva) se obtienen específicamente por los anticuerpos quiméricos A2 (SEQ ID N° 28 y 30), A4 (SEQ ID N° 32 y 34) y A 0 (SEQ ID N° 24 y 26).

El D 6 presentado por el solicitante con fecha 18/05/2011 apunta a describir los scFvlg anti CD37 descritos en D 1. Este documento tiene evidencias que si bien, no son comparativas con el producto de la solicitud, pueden proveer que los anticuerpos quiméricos A0, A 2 y A 4 son alternativas ventajosas en algunos puntos o solamente una alternativa ya que este documento hace comparaciones de scFv con rituximab que podrían proveer datos comparativos con el anticuerpos quimérico de la invención.

Vale la pena aclarar que el documento D6 al que se refieren corresponde al documento de Zhao, X., et al, adjunto como Anexo 2 a mi respuesta al primer examen de fondo. El INAPI concluye que:

De acuerdo a lo anterior, los elementos de las reivindicaciones 1, 2 y 4 tendrían nivel inventivo, por ser alternativas concretas con buenas expectativas de solución a un problema no solucionado satisfactoriamente. Las reivindicaciones dependientes 3, 5, 22 - 24, 27 están ligadas a la actividad inventiva de las reivindicaciones 1, 2 y 4.

Las Reivindicaciones 1, 2 y 4 en Chile, corresponden a las Reivindicaciones 1, 2 y 4 de la presente solicitud colombiana.

Si bien es claro que aunque las concesiones de patentes en oficinas de otros países no son vinculantes en el sentido que obliguen a la SIC a tomar una decisión en el mismo sentido, es a la vez cierto que los criterios de patentabilidad en los que deben fundamentarse el análisis de solicitudes de patente, en particular en cuanto al nivel inventivo se refiere, son análogos globalmente, y concesiones en otras jurisdicciones sugieren el cumplimiento de dichos requisitos, ya que claramente, los criterios de evaluación y estudio aplicados para determinar la novedad y nivel inventivo resultan equivalentes a los que la Superintendencia debe emplear, establecidos de manera semejante por las legislaciones de patentes a lo largo del mundo entero.

En el presente caso, el INDECOPI (Perú) y el INAPI (Chile), ante la misma evidencia técnica, consideraron que el Capítulo Reivindicatorio allí presentado que corresponde al de este expediente, reviste nivel inventivo, a tal punto que en Perú ya fue concedida.

4. Para terminar, de conformidad con lo establecido en el artículo 59 del Código Contencioso Administrativo, solicito respetuosamente que todos y cada uno de los puntos planteados en el presente recurso sean resueltos de manera individual, completa y motivada,

respecto de las razones de hecho, derecho y/o conveniencia que lleven a esa Superintendencia a adoptar la decisión que estime frente a la solicitud aquí formulada.

5. NOTIFICACIÓN

Recibiré notificaciones en mis oficinas ubicadas en la Carrera 5 No. 34-03, de Bogotá.

Atentamente,



CARLOS R. OLARTE
C.C. No. 79.782.747 de Bogotá
T.P. 74.295

ANEXOS:

- Anexo 1: Resultados obtenidos de un ensayo en donde se determinó la actividad pro-apoptica de los anticuerpos A2 y A4 en ausencia y presencia de anticuerpos IgG entrecruzados.
- Anexo 2: Zhao, X., et al. "Targeting CD-37 positive lymphoid malignancies with a novel engineered small modular immunopharmaceutical". Blood. Vol. 110, No. 7. Pages 2569-2577. 2007.
- Anexo 3: Resolución No. 000676-2013/DIN-INDECOPI del 30 de mayo de 2013 que concede la Patente Peruana de Expediente No. 001321-2008/OIN.
- Anexo 4: Copia del Informe Técnico No. GMM 78-2012/A del INDECOPI para la solicitud de patente peruana No. 001321-2008/OIN.
- Anexo 5: Informe Pericial de la Solicitud de Patente Chilena No. 2349-2008, contraparte de la presente solicitud.

P12-0278 EP/2
110121_UT

Boehringer Ingelheim International GmbH
1/2

Figure: Apoptosis with / without IgG cross-linking for antibodies A2 and A4

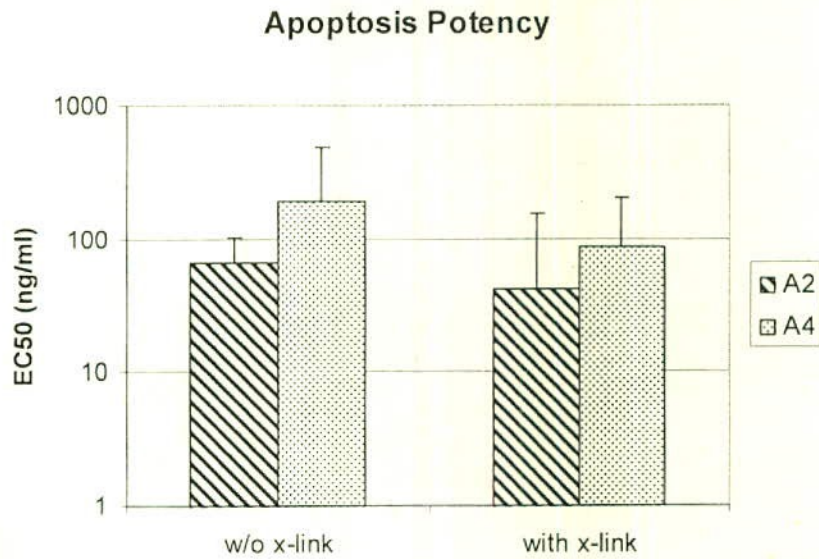
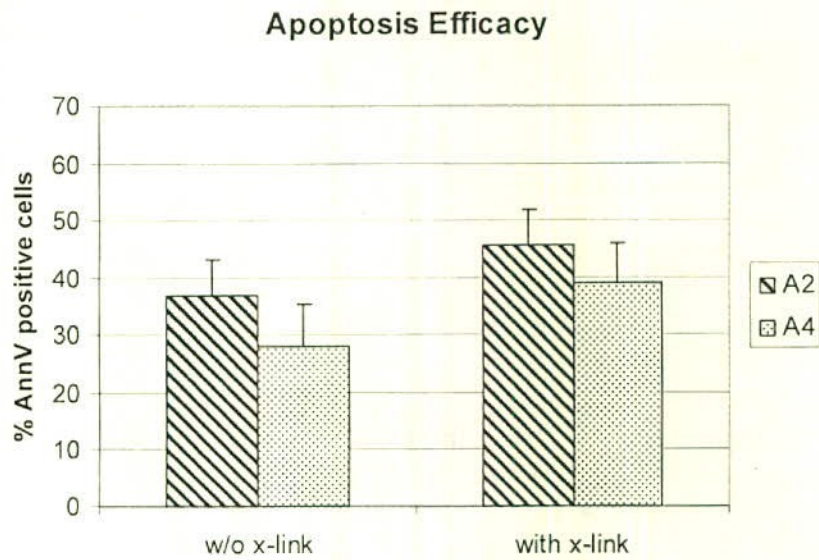


Figure description: Pro-apoptotic activity of Fc-engineered antibodies A2 and A4 in the absence or presence of IgG cross-linking antibodies

To assess the pro-apoptotic activity of A2 and A4, Ramos cells were incubated with serial dilutions of the antibody for 18 to 24 h at 37°C, the tested antibody concentrations were in the range from 0.3 ng/ml to 30 µg/ml. The percentage of apoptotic cells was determined for each antibody concentration by FACS analysis using Annexin V binding as a marker for apoptosis. Additional experiments were performed using an anti-human IgG antibody to cross-link A2 and A4 on the surface of the target cells. For each experimental condition three independent experiments were performed. The potency and efficacy of the antibody effect was calculated using the GraphPad Prism5 software program by applying a non-linear regression curve-fit. Potency was displayed as EC₅₀ (effective antibody concentration needed to achieve a 50% effect), efficacy was calculated by using the top best fit values (maximum effect at high antibody concentrations). The assay background was determined using the bottom best fit values.

A2 and A4 were potent inducer of apoptosis even in the absence of an IgG cross-linking antibody. Mean EC₅₀ values ranged were 66 ng/ml for A2 and 189 ng/ml for A4 (lower graph, w/o x-link). The mean maximum percentage of AnnexinV positive cells at high antibody concentrations was already 37% for A2 and 28% for A4 even in the absence of IgG cross-linking (upper graph, w/o x-link), the background AnnexinV binding was in the range from 8% to 12% in these assays.

Cross-linking of A2 and A4 with an anti-human IgG antibody did only slightly alter the potency for apoptosis induction (mean EC₅₀ = 41 ng/ml for A2 and 87 ng/ml for A4) (lower graph, with x-link), indicating that both antibodies A2 and A4 have similar potency of apoptosis induction, e.g. the half-maximal effect is achieved at similar antibody concentrations for both antibodies. Both A2 and A4 showed a slightly higher maximum level of apoptosis induction at high antibody concentrations (46% for A2 and 39% for A4, upper graph, with x-link), the background AnnexinV binding was in the range from 7% to 16% in these assays.

In conclusion antibody A2 and A4 surprisingly display high and potent pro-apoptotic activity both in the presence and absence of an IgG cross-linking antibody.

Targeting CD37-positive lymphoid malignancies with a novel engineered small modular immunopharmaceutical

Xiaobin Zhao,^{1,2} Rosa Lapalombella,¹ Trupti Joshi,³ Carolyn Cheney,¹ Aruna Gowda,¹ Martha S. Hayden-Ledbetter,⁶ Peter R. Baum,⁶ Thomas S. Lin,¹ David Jarjoura,⁵ Amy Lehman,⁵ Donna Kussewitz,⁴ Robert J. Lee,² Michael A. Caligiuri,^{1,4} Susheela Tridandapani,³ Natarajan Muthusamy,^{1,4} and John C. Byrd^{1,2}

¹Division of Hematology-Oncology, Department of Medicine, College of Medicine; ²Division of Pharmaceutics, College of Pharmacy; ³Division of Pulmonary Medicine, Department of Medicine, College of Medicine; ⁴Department of Veterinary Biosciences; ⁵Center for Biostatistics, the Ohio State University, Columbus; and ⁶Trubion Pharmaceuticals, Seattle, WA

CD37 is a lineage-specific B-cell antigen that to date has been neglected as an attractive therapeutic target. To exploit this, novel CD37-specific small modular immunopharmaceuticals (CD37-SMIP) that include variable regions linked to modified human IgG₁ hinge, CH₂, and CH₃ domains were designed. The lead CD37-SMIP molecule induces potent apoptosis in the presence of a cross-linker, and antibody-dependent cellular cytotoxicity

against B-cell leukemia/lymphoma cell lines and primary chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells superior to therapeutic antibodies used in these diseases. The CD37-SMIP-dependent ADCC function in vitro was mediated by natural killer (NK) cells but not naive or activated monocytes. Significant in vivo therapeutic efficacy was demonstrated in a SCID mouse xenograft leukemia/lymphoma model. Depletion of NK cells in this mouse model

resulted in diminished efficacy further supported the in vivo importance of NK cells in SMIP therapy. These findings provide strong justification for CD37 as a therapeutic target and introduce small modular immunopharmaceuticals as a novel class of targeted therapies for B-cell malignancies. (*Blood*. 2007;110:2569-2577)

© 2007 by The American Society of Hematology

Introduction

Immunotherapy using monoclonal antibodies (MAbs) is emerging as a safe and selective method for the treatment of cancer.¹ The role of monoclonal antibodies in B-cell malignancies has expanded since the introduction of rituximab (Rituxan) targeted against the CD20 antigen on the B-cell surface in 1997. Numerous studies have confirmed the efficacy of rituximab as a single agent and in combination therapy in low-grade non-Hodgkin lymphoma (NHL),²⁻⁶ mantle-cell lymphoma,⁷⁻¹¹ diffuse large-cell lymphoma,^{12,13} and Burkitt leukemia/lymphoma.¹⁴ However, only a subset of patients respond to therapy and the majority of those eventually relapse after rituximab treatment. Therefore, identification of new therapeutic targets on B cells that are potentially more effective than CD20 represents a novel strategy for therapy of B-cell malignancies.

The CD37 antigen is one potential target that has not been adequately evaluated. CD37 is a heavily glycosylated 40- to 52-kDa glycoprotein and a member of the tetraspan transmembrane family of proteins.^{15,16} CD37 is expressed strongly on the surface of B cells and transformed mature B-cell leukemia and lymphoma cells^{17-20,22,23,25,26} but is either absent or minimally expressed on normal T cells.²¹ The CD37 antigen is expressed on monocytes and granulocytes at very low density and is absent on natural killer (NK) cells, platelets, and erythrocytes.^{18,22} During B-cell development, CD37 is expressed in cells progressing from pre-B to peripheral mature B-cell stages and is absent on terminal differentiation to plasma cells.²³ Although the precise function of CD37 remains unknown, it has been found to form complexes with CD53,

CD81, CD82, and class II glycoprotein on B-cell surface that may represent an ion channel or a transporter.²⁴ CD37 has modest internalization and shedding in transformed B cells expressing the antigen.^{25,26} It is highly expressed in endosomes and exosomes in B lymphocytes, reflecting possible involvement in intracellular trafficking and antigen presentation.¹⁵ Targeted inactivation of CD37 in mice revealed no changes in the development of lymphoid organs but a reduced IgG1 level in the sera and an alteration of response to T-cell-dependent antigens, indicating a possible role of CD37 in T cell-B cell interaction.²⁷

Given the relative B-cell selectivity, CD37 thus represents a valuable therapeutic target for malignancies derived from peripheral mature B cells, such as B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL), hairy-cell leukemia (HCL), and B-cell NHL.^{25,26} In particular, CLL may be a good target of CD37-based immunotherapy, because the expression of CD37 is relatively high, even compared with CD20, in this type of leukemia.¹⁷ Efforts to target CD37 clinically have been limited. One reported preclinical trial performed in the late 1980s examined the efficacy of ¹³¹I-labeled MB-1, a murine CD37 MAb in a mouse model.²⁸ This was later examined as part of a clinical trial in patients with NHL,²⁹⁻³³ in which both CD37 and CD20 antibodies were evaluated. Despite clinical responses observed in this study, CD20 was chosen as the target antigen by many for therapeutic antibody therapy, and no subsequent efforts have been made to target CD37.

A CD37-small modular immunopharmaceutical (SMIP) was developed by Trubion Pharmaceuticals, using variable regions (V_L

Submitted December 13, 2006; accepted February 21, 2007. Prepublished online as Blood First Edition Paper, April 17, 2007; DOI 10.1182/blood-2006-12-062927.

An Inside Blood analysis of this article appears at the front of this issue.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2007 by The American Society of Hematology

and V_H) from G28-1 hybridoma and engineered constant regions encoding human IgG₁ domains (hinge, CH₂, and CH₃) (Figure 1). Initial expressions were performed by transfection of COS-7 monkey kidney cells and screened for specific binding to human B cell lines. The selected recombinant expression plasmid was used to transfect Chinese hamster ovary (CHO) cells and further selected under methotrexate pressure. The final stably expressing cell line was used in production of the fusion protein by purification from CHO culture supernatant by chromatography. To enhance the production of sufficient high-quality material, acceptable pharmacokinetics, and therapeutic efficacy, several technical considerations were made. These modifications provided a production efficiency that will allow sufficient production of CD37-SMIP for clinical investigation and were further screened for their ability to recruit effector cells to mediate cellular cytotoxicity. In addition, CD37-SMIP was engineered to have a molecular weight above that filtered by the glomerulus to avoid rapid elimination. This size feature of the CD37 SMIP offers the potential advantage of an extended half-life in vivo compatible with other biologic therapies such as monoclonal antibodies. Herein, we validate that CD37 is an exciting therapeutic target and provide strong in vitro and in vivo evidence to support clinical development of this novel CD37-SMIP in CLL, B-NHL, and related B-cell malignancies.

Patients, materials, and methods

Reagents and antibodies

CD37-SMIP (G28-1 scFv-Ig) and fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled CD37-SMIP were provided by Trubion Pharmaceuticals (Seattle, WA). Phycoerythrin (PE)-labeled mouse anti-human CD37 antibody (clone BL14), PE-labeled isotype control mouse IgG₁, FITC-labeled annexin V, and propidium iodide (PI) were purchased from BD Pharmingen (San Diego, CA). *N*-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-(OMe)-fluoromethylketone (Z-VAD-fmk) was purchased from EMD Biosciences (San Diego, CA). Alemtuzumab was produced by Ilex Pharmaceuticals (San Antonio, TX) and purchased commercially. Rituximab and trastuzumab were produced by Genentech (South San Francisco, CA) and purchased commercially. Goat anti-human IgG antibody (Fcy fragment-specific) was purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). Anti-Caspase-3 (Mab AR-14) was gift from John Reed (Burnham Institute, La Jolla, CA). Anti-poly(ADP-ribose) polymerase (PARP; Mab C-2-10) was from Calbiochem (San Diego, CA). Anti-phosphotyrosine antibody clone 4G10 was from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). Anti-GAPDH antibody was from Chemicon International Inc. (Temecula, CA). Herbimycin was purchased from Sigma (St. Louis, MO).

Patient sample processing and cell culture

All the patients enrolled in this study had immunophenotypically defined B-CLL as outlined by National Institute criteria.³⁴ Blood was obtained from patients with informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki and under a protocol approved by the institutional review board of Ohio State University (Columbus, OH). All of the patients with B-CLL had been without prior therapy for a minimum of 2 months. B-CLL cells were isolated immediately after donation using Ficoll density gradient centrifugation (Ficoll-Paque Plus; GE Healthcare, Chalfont St Giles, Buckinghamshire, United Kingdom). Isolated mononuclear cells were incubated in

RPMI 1640 media supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; Hyclone Laboratories, Logan, UT), 2 mM L-glutamine (Invitrogen, Carlsbad, CA), and penicillin (100 U/mL)/streptomycin (100 µg/mL; Sigma-Aldrich) at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂. Freshly isolated B-CLL cells were used for all the experiments described herein except for the surface staining. Samples used were more than 90% B cells as determined by CD19 surface staining and fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis. For those samples with less than 90% B cells, negative selection was applied to deplete non-B cells using B cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) or by "Rosette-Sep" kit from Stem Cell Technologies (Vancouver, BC, Canada) according to the manufacturer's suggested protocol. Normal T-lymphocytes were separated from human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) using negative selection using Pan T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec Inc).

In vitro treatment of cells with antibodies

Cells were suspended in media at a density of 1×10^6 cells/mL immediately after isolation. CD37-SMIP treatment used a 5 µg/mL concentration except for the dose-response studies. All other antibodies (trastuzumab, rituximab, and alemtuzumab), were used at 10 µg/mL. The cross-linker, goat anti-human IgG (Fc specific) was added to the cell suspension 5 minutes after adding the primary antibodies, at a concentration 5 times that of the primary antibodies (ie, 25 µg/mL for 5 µg/mL). For all CD37-SMIP treatment, a group of samples with the same concentration of trastuzumab treatment was applied as isotype control. In addition, a group of samples with no treatment was collected as media control, and a group treated with fludarabine (6.6 µmol/L) was also set up as a positive control. For examination of caspase inhibition, 150 µmol/L Z-VAD-fmk was added 10 minutes before the addition of the indicated reagents.

Assessment of apoptosis by flow cytometry

The apoptosis of cells was measured using annexin V-FITC/PI staining followed by FACS analysis according to the manufacturer's protocol (BD Pharmingen). Unstained cell samples and cells stained with annexin V-FITC or PI only were also processed for compensation. Results were presented as percentage cytotoxicity, which was defined as (% annexin V⁺ and/or PI⁺ cells of treatment group) - (% annexin V⁺ and/or PI⁺ cells of media control). FACS analysis was performed using a Beckman Coulter EPICS XL cytometer (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Ten thousand events were collected for each sample and data were acquired in list mode. System II software package (Beckman Coulter) was used to analyze the data.

Cell-surface immunostaining and flow cytometry analysis

For CD37 surface expression analysis, B-CLL cells were isolated as described above, and used fresh or preserved in cryovials in 10% dimethyl sulfoxide (DMSO), 40% FBS, and 50% RPMI 1640 media in -180°C for less than 4 months. The expression level of CD37 was not altered as a result of the cryopreservation process. Cryopreserved samples were quickly thawed and washed twice in ice-cold PBS before use. Cells were incubated with PE-labeled anti-CD37, CD37-SMIP, or mouse IgG₁ isotype control antibodies at 4°C for 30 minutes. The cells were then spun down at 300g for 10 minutes and rinsed twice with ice-cold PBS and analyzed by FACS. For the binding study, cells were preincubated with CD37-SMIP or trastuzumab (5 µg/mL) for 5 minutes followed by PE-labeled anti-CD37 mouse IgG. The incubation and wash procedure was identical to the surface-staining protocol. For cell lines, cells were split the night before, and fresh cells were used for immunostaining as described for B-CLL cells.

Western blotting

Immunoblot assays were performed with the multiple antigen detection (MAD) immunoblotting method as described previously.³⁵ Whole-cell lysates were prepared and stored in -80°C. Protein concentration in the lysates was quantified by the bicinchoninic acid (BCA) method (Pierce, Rockford, IL). Protein samples (50 µg) were separated by SDS-PAGE (10% for PARP and phosphotyrosine and 12% for Caspase-3 blots), and transferred to 0.2 µmol/L nitrocellulose membranes (Whatman Schleicher

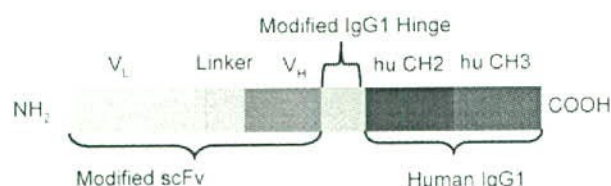


Figure 1. Schematic diagram of small modular immunopharmaceuticals (SMIP).

& Schuell, Keene, NH). After incubation with indicated primary antibodies, horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG or goat anti-mouse IgG (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) were used as secondary antibodies. The immune complexes were detected using a chemiluminescent substrate kit as described by the manufacturers (SuperSignal; Pierce, Rockford, IL).

Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) and complement dependent cytotoxicity (CDC) assay

ADCC activity was determined by standard 4-hour ^{51}Cr -release assay. ^{51}Cr -labeled target cells (5×10^4 B-CLL cells, Raji cells, or 697 cells) were placed in 96-well plates and various concentrations of antibodies were added to wells. Effector cells (PBMC, NK cells, or monocytes from healthy donors) were then added to the plates at indicated effector-to-target (E:T) ratios. After 4-hour incubation, supernatants were removed and counted in a gamma counter. The percentage of specific cell lysis was determined by: $\% \text{ lysis} = 100 \times (\text{ER} - \text{SR})/(\text{MR} - \text{SR})$, where ER, SR, and MR represent experimental, spontaneous, and maximum release, respectively.

For CDC assay, B-CLL cells at $10^6/\text{mL}$ were suspended in RPMI 1640 media, media with 30% autologous plasma from the patient blood samples, and media with 30% heat-inactivated (56°C , 30 minutes) plasma. Cells were then treated with antibodies for 10 minutes. After incubation at 37°C for 1 hour, cells were pelleted and resuspended with $100 \mu\text{L}$ $1 \times$ binding buffer (BD Pharmingen), then stained with $5 \mu\text{L}$ PI solution (BD Pharmingen). The extent of CDC was measured by FACS analysis of PI $^+$ cells in duplicate samples.

Development of disseminated leukemia xenograft model

Female 4- to 6-week-old C.B.-17 SCID mice (Taconic Farms, Germantown, NY) were housed in pathogen-free, isolated cages. To ensure the consistency of engraftment, Raji cells were frozen in cryovials (1×10^7 cells each) and stored in a vapor-phase liquid nitrogen environment (-180°C). Before *in vivo* inoculation, cryopreserved cells were thawed, cultured for 10 days, and examined for the viability, CD37, CD20, and CD19 positivity and sensitivity to CD37 or CD20 antibody treatment. Only cells with greater than 90% viability and greater than 50% CD37 positivity were used for injection. Cells were resuspended in PBS at room temperature at a density of 10^7 cells/mL, in $200 \mu\text{L}$ (2×10^6 cells) and inoculated intravenously through tail vein using a mouse tail illuminator (Braintree Scientific, Braintree, MA). Untreated SCID mice developed symptomatic central nervous system, liver, and pulmonary metastasis that resulted in death from massive tumor burden 17 to 20 days after inoculation. Tissues obtained from killed tumor-bearing SCID mice were subjected to histopathologic examination to confirm the presence of disease. Gross pathologic, histologic, and histopathologic examination and immunohistochemical analysis of the tissues from treated and untreated mice were performed at the Ohio State University Comprehensive Cancer Center mouse phenotyping core facility. The residual human Raji cells were evaluated in formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections of 4 to $5 \mu\text{m}$ by immunohistochemistry using monoclonal mouse anti-human CD45 (BD Pharmingen) followed by biotinylated goat anti-mouse secondary antibody. Counterstaining was done with Richard-Allan Hematoxylin 2. Slides were then dehydrated and coverslipped. All washes were carried out in Dako Wash Buffer (Tris-buffered saline/Tween 20) (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark). Bone marrow cell suspension was prepared by flushing fresh marrow-containing femurs with PBS and stained with PE-labeled antibodies to check the existence of human leukemia cells.

In vivo therapeutic efficacy evaluation in xenograft model

Antibody treatment was started 3 days after inoculation of Raji cells. CD37-SMIP or rituximab dissolved in 1 mg/mL saline were injected via tail vein, and maintained an every-other-day intravenous schedule for 2 weeks (5 mg/kg injection, 7 injections each mouse). Placebo (saline) and isotype control (trastuzumab) were administered on the same schedule and at the same dose. Animals were monitored daily for signs of illness and killed immediately if hind limb paralysis, respiratory distress, or 30% loss in body weight was noted. Body weight was measured once every week. Survival time (paralysis time) was used as primary endpoint for evaluation. For NK-cell depletion, anti-asialo GM1

antibody ($30\text{-}\mu\text{g}$ injection in $200 \mu\text{L}$ of saline) was injected to mouse through tail vein at -6 , -1 , 4 , 9 , and 14 d after Raji cell inoculation. At day 10, $50 \mu\text{L}$ peripheral blood was obtained by retro-orbital bleeding was analyzed for NK cells by flow cytometry to confirm the depletion effect. In a separate group, 4 control SCID mice were treated with or without the same dose of anti-asialo GM1 antibody, and the splenocytes were prepared 2 days after the injection for cytotoxicity experiment using YAC-1 cells as target cells.

Statistical analysis of data

Analysis was performed by statisticians in the Center for Biostatistics, the Ohio State University, using SAS software (SAS Institute, Cary, NC). Comparisons were made using a 2-sided $\alpha = .05$ level of significance. Mixed effects models were used to account for the dependencies in the cell-donor experiments, and analysis of variance (ANOVA) was used for the cell-line experiments. Synergy hypotheses were tested using interaction contrasts. Kaplan-Meier survival functions and log-rank tests were used to compare animal survival among different treatment groups.

Results

CD37-SMIP induced apoptosis of CD19 $^+$ B cells from CLL patients

Analysis of B cells from patients with CLL and T cells from healthy donors revealed a large number of cells expressing CD37 in B cells compared with T cells ($96 \pm 3\%$ in CLL B cells and $3 \pm 2\%$ in T cells). The specific binding of genetically engineered CD37-SMIP to CD37 molecule was confirmed by flow cytometric analysis of B cells from patients with CLL. Furthermore, CD37-SMIP but not control antibodies such as trastuzumab (Herceptin, anti-HER2), rituximab (Rituxan, anti-CD20) or alemtuzumab (Campath, anti-CD52) blocked the binding of CD37-FITC to CD19 $^+$ B cells from patients with CLL (data not shown).

Induction of apoptosis in B cells from patients with CLL has been reported with therapeutic antibodies such as alemtuzumab²⁹ and rituximab³⁷ that are currently used to treat patients with CLL. To determine the effect of CD37-SMIP on B-cell survival, CD19 $^+$ cells from patients with CLL were treated with CD37-SMIP in the presence or absence of a secondary cross-linking, Fe-specific, goat anti-human IgG antibody ($\alpha\text{-Fe[b]}$). Although no apoptosis was observed with CD37-SMIP in the absence of $\alpha\text{-Fe}$, addition of $\alpha\text{-Fe}$ promoted maximal apoptosis (Figure 2A). The CD37-SMIP mediated apoptosis in a dose-dependent manner, with a maximal effect seen at $5 \mu\text{g/mL}$, the CD37 saturating dose of CD37-SMIP in B-CLL cells (Figure 2B). We have thus applied $5 \mu\text{g/mL}$ for CD37-SMIP in the rest of our *in vitro* studies, and $10 \mu\text{g/mL}$ for other antibodies. This in part reflects the fact that CD37-SMIP has a lower molecular weight than other antibodies and thus is able to achieve sufficient molar concentration by using lower mass concentration. The cumulative results of these experiments with CD37-SMIP showed an increase in cytotoxicity in the presence of $\alpha\text{-Fe}$ compared with rituximab ($P < .0001$) or alemtuzumab ($P < .0001$) (Figure 2C) that represent the 2 therapeutic antibodies used to treat CLL currently. In addition, apoptosis with $\alpha\text{-Fe}$ was significantly higher for CD37 compared with rituximab (24.4% increase; 95% confidence interval [CI], 17%, 32%; $P < .0001$) or alemtuzumab (9% increase; 95% CI, 2%, 16%; $P = .0130$) (Figure 2C). The apoptosis induced by CD37-SMIP in B-CLL cells correlates with the expression of the target CD37 antigen ($r = 0.78$; $P = .002$; $n = 13$) (Figure 2D). Consistent with this, CD37-SMIP induced apoptosis in CD37 $^+$ B cells but not T cells that lack significant expression of CD37 (Figure 2E,F).

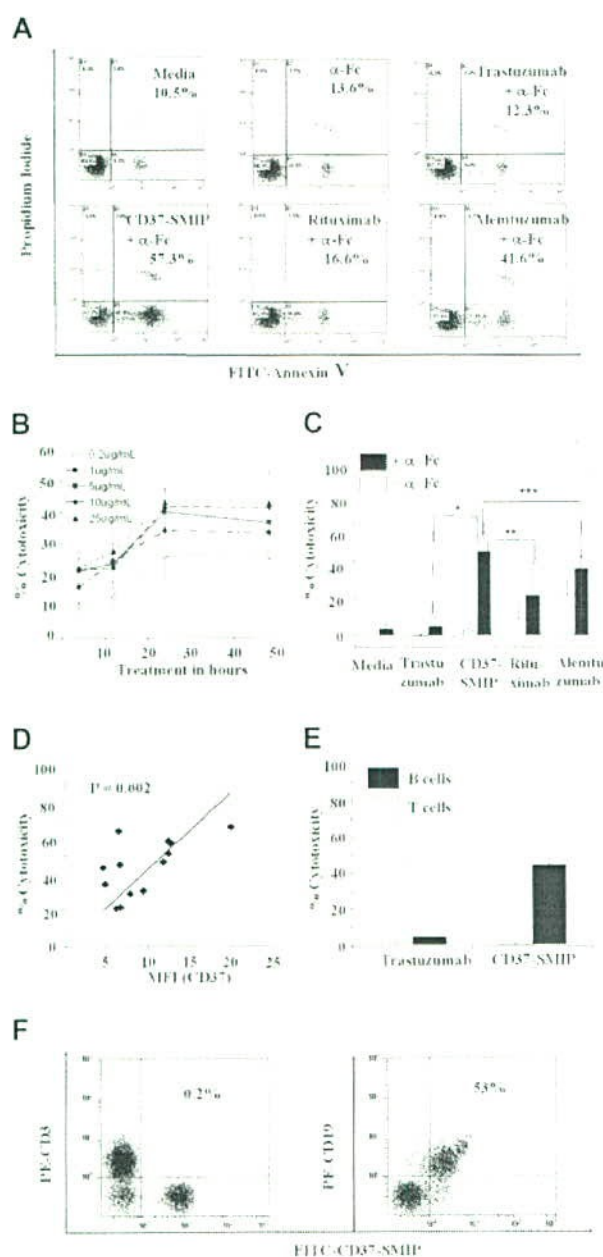


Figure 2. CD37-SMIP-induced cell death in B-CLL cells. (A) CD37-SMIP-induced cell death in CLL B cells. CLL B cells were treated with media, goat anti-human IgG (α -Fc), trastuzumab with α -Fc, CD37-SMIP with α -Fc, rituximab with α -Fc, or alemtuzumab with α -Fc for 24 hours. The cells were stained with FITC-annexin V and propidium iodide. The numbers shown in each panel represent percentage Annexin V⁺ and/or PI⁺ cells. Shown is a representative result from 14 patient samples analyzed. (B) Dose- and time-dependent induction of cytotoxicity by CD37-SMIP. B-CLL cells were treated with indicated concentrations of CD37-SMIP with cross-linker α -Fc. The direct cell death at indicated time points was assessed by FITC-Annexin V/PI staining. Percentage cytotoxicity shown represents Annexin V⁺ and/or PI⁺ cells normalized with the media control. Error bars represent standard deviation (SD) among 4 B-CLL patient cell samples. (C) Summary of CD37-SMIP-induced direct cytotoxicity. B-CLL cells isolated from 14 patients were subjected to indicated treatment for 24 hours with or without cross-linker (α -Fc). Cell death was examined with FITC-Annexin V and PI. Percentage cytotoxicity shown represents Annexin V⁺ and/or PI⁺ cells normalized with the media control. Error bars represent SD among 14 B-CLL patient samples. Statistical analysis of difference between antibody treatments is shown by *P* values: $\ast$, *P* < .001; $\ast\ast$, *P* < .001; $\ast\ast\ast$, *P* = .04. (D) Correlation of CD37 expression level and direct cytotoxicity by CD37-SMIP. MFI (CD37): mean fluorescence intensity of CD37 staining of different B-CLL cell samples. Percentage cytotoxicity shown represents Annexin V⁺ and/or PI⁺ cells normalized with the media control. (E) Flow cytometric analysis showing selective binding of CD37-SMIP to CD19⁺ but not CD3⁺ human PBMC. (F) CD37-SMIP-induced cytotoxicity in B but not T cells. Results shown are summary of FITC-Annexin V⁺ and/or PI⁺ cells normalized with media control in normal T cells (open bar, *n* = 5) or B-CLL cells (filled bar, *n* = 15) 24 hours after treatment with CD37-SMIP or trastuzumab. Error bars represent SD among samples.

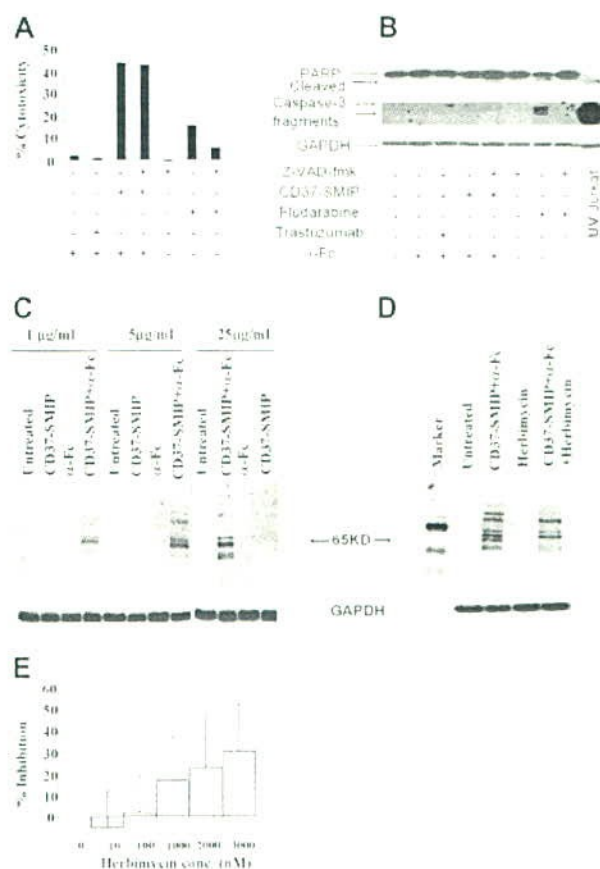


Figure 3. CD37-SMIP induces caspase-independent cell death in B-CLL cells. Freshly isolated B cells from 5 patients with CLL were treated with cross-linker alone (α -Fc), trastuzumab + α -Fc, CD37-SMIP + α -Fc, or fludarabine in the presence or absence of the pan-caspase inhibitor Z-VAD-fmk (150 μ M/L). (A) Z-VAD-fmk failed to inhibit CD37-SMIP-induced cell death. Percentage cytotoxicity shown represents Annexin V⁺ and/or PI⁺ cells normalized with the media control. Error bars represent SD among 5 B-CLL patient cell samples. (B) CD37-SMIP failed to induce activation of caspases in CLL cells. Cell lysates from primary CLL B cells treated with indicated conditions for 24 hours were assessed by Western blotting to detect PARP and caspase-3 cleavage. UV-irradiated Jurkat cell lysate was used as a positive control for both PARP and caspase-3 cleavage. (C) CD37-SMIP-induced tyrosine phosphorylation of cellular proteins. CLL cells were treated with indicated concentrations of CD37-SMIP with or without cross-linker in PBS for 10 minutes, and phosphotyrosine proteins were detected by Western blot analysis using anti-phosphotyrosine antibody 4G10. (D) Effect of tyrosine kinase inhibitor herbimycin on CD37-SMIP-induced inhibition of CD37-SMIP-induced cell death in primary CLL cells. CLL B cells were pretreated with media or herbimycin (3 μ M/L) before stimulation with CD37-SMIP + α -Fc. The tyrosine-phosphorylated proteins were detected by Western blot using anti-phosphotyrosine antibody 4G10. (E) Herbimycin inhibited CD37-SMIP-induced cell death in primary CLL cells. CLL B cells were treated with indicated concentrations of herbimycin followed by CD37-SMIP (5 μ g/mL) + α -Fc. The cellular cytotoxicity was measured by FITC-Annexin V/PI staining at 48 hours after treatment. Data shown represents percentage inhibition of CD37-SMIP-induced cytotoxicity in the presence of indicated concentrations of herbimycin. Results are summary of 11 CLL patient samples. Error bars are the SD among these samples.

CD37-SMIP-induced CLL cell apoptosis was independent of caspase activation

Antibody-induced cellular cytotoxicity is mediated through various mechanisms, including caspase activation dependent^{35,36} and/or independent pathways.³⁷ In this context, we examined the mechanism by which CD37-SMIP induced apoptosis in CLL B cells. Fludarabine is widely used as a therapeutic agent in CLL and mediates death through a caspase-dependent pathway.^{39,40} Treatment of CLL B cells with fludarabine promoted modest apoptosis that was inhibited by the pan caspase inhibitor Z-VAD-fmk (Figure 3A). The caspase dependence of fludarabine was further supported by demonstrable processing of the inactive pro-form of caspase 3

and cleavage of downstream target poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) after fludarabine treatment (Figure 3B). In contrast to fludarabine, CD37-SMIP promoted rapid apoptosis at 24 hours that was not prevented by Z-VAD-fmk treatment (Figure 3A). Furthermore, caspase 3 and downstream PARP were not processed after treatment with CD37-SMIP (Figure 3B). These data collectively suggest that CD37-SMIP induces apoptosis through a novel pathway different from fludarabine in primary CLL B cells. To determine protein tyrosine phosphorylation as a potential activation event responsible for CD37-SMIP-induced cell death, CD19⁺ B cells from patients with CLL were stimulated with CD37-SMIP with or without α -Fc. Western blot analysis of cellular lysates with anti-phosphotyrosine antibody revealed several tyrosine phosphorylated proteins including a predominant ~65 kDa protein in response to the cross-linking of CD37-SMIP within 10 minutes (Figure 3C). Further, herbimycin, an inhibitor of tyrosine kinase, prevented phosphorylation of several of these proteins including the predominant ~65 kDa protein (Figure 3D). It is noteworthy that increasing concentrations of herbimycin inhibited CD37-SMIP-induced apoptosis of CD19⁺ primary CLL cells (Figure 3E), supporting a potential role for tyrosine phosphorylation events in CD37-SMIP-induced apoptosis.

CD37-SMIP efficiently mediates ADCC but not CDC

We next investigated whether the modified Fc region on CD37-SMIP is efficient in mediating ADCC and CDC against primary CD19⁺ CLL cells. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from normal healthy volunteers mediated ADCC in the presence of CD37-SMIP (39.3% $\pm$ 18%, E:T = 50:1) but not in the presence of the negative control trastuzumab (5.3% $\pm$ 5%, E:T = 50:1; Figure 4A). Furthermore, for all effector/target ratios tested, the ADCC with CD37-SMIP was found to be significantly higher than the ADCC with either alemtuzumab (14.5% higher; 95% CI, 9.0%, 19.9%; $P < .0001$) or rituximab (15% higher; 95% CI, 9.7%, 20.6%; $P < .0001$) that are directed against CD52 and CD20

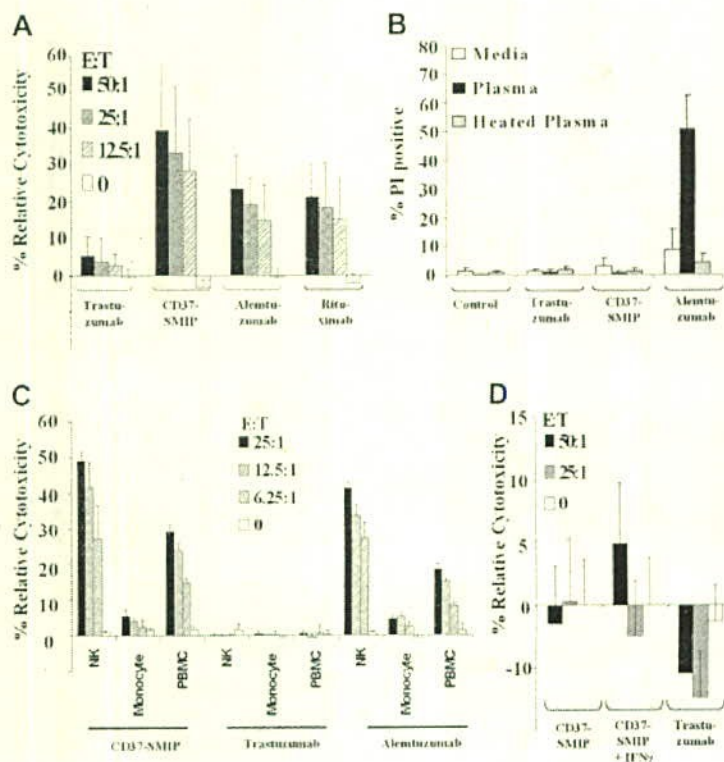
molecules, respectively (Figure 4A). In contrast to their ability to mediate ADCC function, CD37-SMIP or rituximab failed to mediate CDC against CLL cells, whereas alemtuzumab effectively mediated CDC in vitro (Figure 4B).

The efficient ADCC function prompted us to evaluate the potential effector cell populations that may be involved in CD37-SMIP-mediated ADCC. We compared the ability of PBMC, NK, or monocyte effector cells to mediate ADCC in vitro. Figure 4C shows that NK cells enriched from PBMC, mediated an increase in CD37-SMIP dependent ADCC compared with normal mononuclear effector cells. In contrast, enriched monocytes failed to cause CD37-SMIP dependent ADCC (NK cells, 49.2% $\pm$ 2.6%; PBMC, 29.0% $\pm$ 2.1%; monocytes, 5.4% $\pm$ 1.8%). Activation of monocytes by interferon- γ (IFN- γ) also failed to result in CD37-SMIP-mediated ADCC in CLL cells (Figure 4D). The importance of NK cells in CD37-SMIP-mediated ADCC was not unique to this target, as demonstrated by similar findings of NK-cell importance over monocytes in alemtuzumab-mediated ADCC (Figure 4C). These results indicate that NK cells, but not monocytes, are the major effector cell population in mediating the CLL cell death induced by CD37-SMIP.

CD37-SMIP mediated apoptosis and ADCC against CD37⁺ B-cell lymphoma cell lines

To confirm the relevance of our initial preclinical findings with CD37-SMIP described above, we sought to validate the efficacy of this agent in vivo. Initial screening of a panel of lymphoblastic B-cell lines, representing a variety of lymphoma/leukemia types revealed significant levels of expression of CD37 in Raji (62%, mean fluorescence intensity [MFI] = 70), Daudi (100%, MFI = 189), Ramos (100% MFI = 122), and RS1846 (99%, MFI = 70) lymphoblastic cell lines, whereas MEC-1 B-CLL cells (23%, MFI = 12) had medium expression. Both 697, an acute lymphoblastic lymphoma cell line (0.1% MFI = 0.93), and WAC B-CLL cell line (0.3%, MFI = 1) were negative for this antigen.

Figure 4. CD37-SMIP induced ADCC but not CDC in primary CLL B cells. (A) CD37-SMIP induced ADCC against CLL B cells. Ability of trastuzumab, CD37-SMIP, alemtuzumab, or rituximab to mediate ADCC was evaluated using fresh human PBMC as effector cells and CD19⁺ primary CLL B cells as target cells at the indicated effector/target (E:T) ratios. Data shown here are summary of 6 patient samples and error bars represent SD among patients. (B) CD37 SMIP does not mediate CDC. Primary CLL B cells were treated with media, trastuzumab, CD37-SMIP, or alemtuzumab in the presence of media, human plasma or heat-inactivated human plasma for 1 hour. The CDC function was evaluated by propidium iodide staining. Summary of the results from 4 CLL patient samples are shown. Error bars show SD among patients. (C) In vitro evaluation of CD37-SMIP-induced ADCC function by NK cells, monocytes, or PBMC effector cells. Effect of purified NK cells, monocytes, or PBMC effector cells to mediate CD37-SMIP-, trastuzumab-, or alemtuzumab-dependent ADCC function against CD19⁺ primary CLL B cells as target cells was evaluated at the indicated effector/target (E:T) ratios by standard chromium release assay as described under "Materials and methods." Data shown here are the summary of results from 6 patient samples, and error bars represent SD among patients. (D) Naive or IFN- γ activated monocytes failed to mediate CD37-SMIP-dependent ADCC function against CLL B cell targets. The effects of CD37-SMIP-induced ADCC using naive or IFN- γ -activated monocytes were measured as described above. Data shown here are summary of 3 patient samples ($\pm$ SD).



We used the Raji and Ramos cells as 2 representative CD37⁺ cell lines and 697 cells as a CD37⁻ cell line for our initial in vitro studies. CD37-SMIP promoted apoptosis in the CD37⁺ Ramos or Raji cell with the cross-linking antibody, whereas no death was noted in the CD37⁻ 697 cell line (Figure 5A). In Raji cells, the level of cell death induced by CD37-SMIP exposure was similar to that achieved by rituximab (Figure 5B). Raji cells lack significant CD52 expression and were not sensitive to alemtuzumab treatment, unless presented as a CD52 high expression clone (R.L., unpublished data, October 2006). We also examined the healthy donor-derived PBMC for ADCC after treatment of target cells with CD37-SMIP. A strong interaction effect between cell lines (Raji vs 697) and treatment was suggested ($P < .0001$), indicating no effect of CD37-SMIP in 697 (CD37⁻) cells but a strong effect in Raji (CD37⁺) cells (Figure 5C). Similar to primary B-CLL cells, no CD37-SMIP-mediated CDC was observed in Raji cells (Figure 5D).

CD37-SMIP had potent in vivo anti-lymphoma activity

Given that primary B-CLL cells fail to successfully engraft in immunodeficient mice with recapitulation of the disease or a measurable end point, we chose to test in vivo therapeutic efficacy of CD37-SMIP in an aggressive Raji cell-inoculated disseminated leukemia/lymphoma xenograft mouse model. Sixteen days after inoculation, the SCID mice revealed neoplastic cell infiltrates throughout the body, as revealed by tissue sections (Figure 6A). Extensive replacement by tumor cells was observed in the lymph nodes, thymus, bone marrow, liver, spleen, soft tissue, and middle ear. In central nerve system

(CNS), marked multifocal neoplastic cell infiltration was observed in meninges, and mild multifocal mineralization was also observed in brain. This was accompanied by neuropathy, degenerative spinal nerves and marked paresis of the hind legs at 17 to 20 days that preceded death by 1 to 2 days. In vitro, Raji cells in culture are also CD19 and CD20 positive (data now shown). Tumor cells derived from the bone marrow of engrafted mice maintained expression of hCD37 and hCD20 (Figure 6B), making this a valid model for in vivo investigation of CD37-SMIP and the relevant control antibody rituximab.

We next determined the therapeutic efficacy of CD37-SMIP relative to both trastuzumab and rituximab in this Raji cell-engrafted xenograft model. The depletion of transferred human B cells in the bone marrow was confirmed by flow cytometry using antibodies directed against human CD19, CD20, or CD37 molecules (Figure 6B). Consistent with this, hematoxylin-eosin staining and immunohistochemical analysis of tissue sections of thymus and lymph node with anti-human CD45 antibody revealed loss of human B cells in the CD37-SMIP treated but not untreated control groups (Figure 6C). Compared with placebo-treated (17 days; 95% CI, 16, 17; $P < .001$) or isotype-treated mice (17 days; 95% CI, 16, 17; $P < .001$), the median survival time for CD37-SMIP-treated mice (54 days, 95% CI, 45, 85) was significantly prolonged (Figure 6D). The hazard ratio and 95% confidence interval for rituximab versus CD37-SMIP (1.57; 95% CI, 0.87, 2.8; $P = .137$) suggest that CD37-SMIP is not inferior and could in fact be superior to rituximab. These data are in agreement with our in vitro data

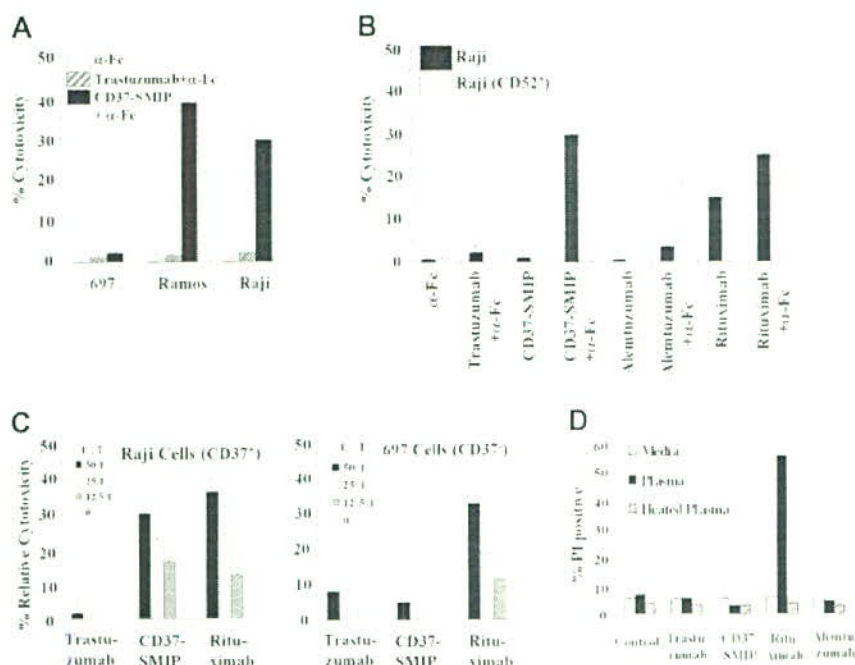
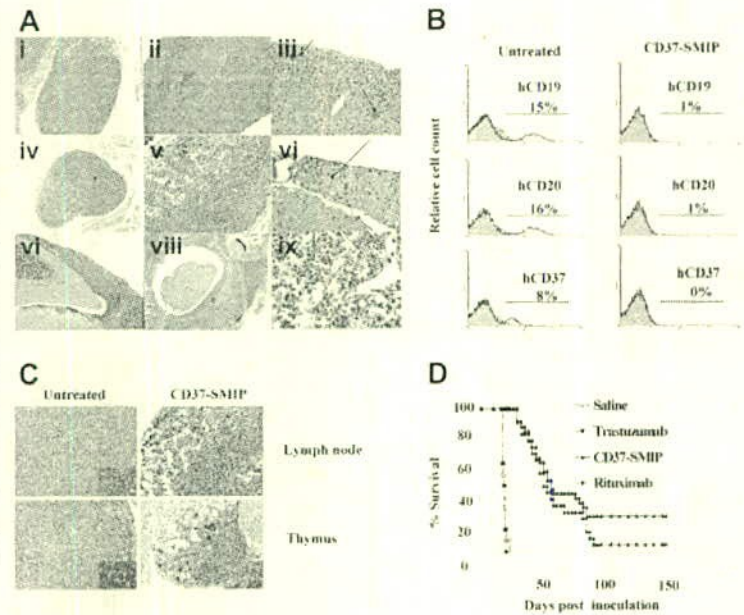


Figure 5. CD37-SMIP induced direct cytotoxicity and ADCC in human B-cell lines. (A) CD37-SMIP induced direct cytotoxicity in CD37⁺ (Raji and Ramos), but not in CD37⁻ (697) human B-cell lines. Cytotoxicity was measured using FITC-Annexin V/PI staining at 24 hours after treatment as described in the legend to Figure 1A. Representative results from 3 independent experiments are shown. Error bars are SD among triplicate samples within the same experiment. (B) CD37-SMIP induced direct cytotoxicity in Raji B-cell lines comparable with that seen with alemtuzumab or rituximab. In vitro direct cytotoxic effects of CD37-SMIP, alemtuzumab, or rituximab in the presence or absence of cross-linker (α-Fc) was evaluated by FITC-Annexin V/PI staining. Percentage cytotoxicity was measured using FITC-annexin V/PI staining at 24 hours after treatment as described above. Raji parent clone (CD52⁺) and variant CD52⁻ clones were used in these studies. (C) CD37-SMIP induced ADCC in CD37⁺ Raji cells but not in CD37⁻ 697 B-cell line. Effect of PBMC from healthy donors to mediate trastuzumab-, CD37-SMIP-, alemtuzumab-, or rituximab-dependent ADCC function against CD37⁺ (Raji cells) or CD37⁻ (697 cells) target cells was evaluated at the indicated effector: target (E:T) ratios by standard chromium release assay as described in legend to Figure 3A. (D) Rituximab but not CD37-SMIP mediated CDC function against Raji B-cell line. Raji cells were treated with media, trastuzumab, CD37-SMIP, rituximab, or alemtuzumab in the presence of media, human plasma, or heat-inactivated human plasma for 1 hour. The CDC function was evaluated by propidium iodide staining and presented as percentage of PI positive cells in response to the various treatments. Results shown are representative of three independent experiments.

24

Figure 6. In vivo therapeutic evaluation of CD37-SMIP. A Raji cell-inoculated xenograft mouse model of disseminated leukemia/lymphoma was used to evaluate the therapeutic efficacy. (A) H&E staining of tissue sections from Raji cell-inoculated SCID mouse (placebo-treated). (i) Thymus infiltrated with neoplastic cells. (ii) Lymphoid atrophy/hypoplasia in spleen. (iii) Extramedullary hematopoiesis in liver (arrows). (iv) Atrophic lymph node partially replaced by tumor cells. (v) Markedly atrophic cervical lymph node. (vi) Spinal nerve showing rare swollen axons (arrow). (vii) Neoplastic cells in meninges over cerebellum. (viii) Neoplastic cells in vertebral bone marrow and within spinal canal. (ix) Neoplastic cells in bone marrow. (B) Flow cytometric analysis of bone marrow cells from Raji cells-engrafted mice at day 17 after inoculation. Mice were treated with placebo (saline) or CD37-SMIP, and the percentage of human CD19⁺, human CD20⁺, or human CD37⁺ cells were analyzed by surface staining with PE-labeled antibodies. (C) Depletion of infiltrated human CD45⁺ cells in CD37-SMIP treated but not control mice. Histologic (H&E staining) analysis of thymus (top panels) and lymph node (bottom panels) from control untreated (left panels) or CD37-SMIP-treated (right panels) mice. Insert shows presence of human CD45⁺ cells in the untreated but not in CD37-SMIP-treated mice as detected by immunohistochemistry of the tissue sections. (D) Evaluation of therapeutic efficacy of CD37-SMIP in Raji cell-inoculated SCID mice. Raji cell-inoculated SCID mice were treated with saline (n = 22), negative control trastuzumab (n = 22), rituximab (n = 32), or CD37-SMIP (n = 32). Comparison among different groups was made by log-rank test ($P < .001$ between CD37-SMIP and trastuzumab, and $P = .124$ between CD37-SMIP and rituximab).



suggesting that CD37-SMIP may be comparable with or exceed rituximab efficacy.

In vivo anti-lymphoma activity by CD37-SMIP was dependent on NK cells

Our in vitro studies suggested that NK cells, but not naive or activated monocytes, are critical mediators of CD37-SMIP-dependent ADCC. To determine the in vivo importance of NK cells, we evaluated the efficacy of CD37-SMIP or rituximab treatment in the above-described mouse model depleted of NK cells using anti-asialo GM1 antibody. Depletion of NK cells after anti-asialo GM1 antibody treatment, resulted in reduction of YAC-1 cell targeted cytotoxicity by the mouse splenocytes (Figure 7A). Consistent with this finding, immunostaining of peripheral blood mononuclear cells using mouse NK-cell-specific CD122 and DX5 antibodies also showed decreased NK cells (data not shown). Consistent with these in vitro results, the in vivo therapeutic efficacy of CD37-SMIP or rituximab was significantly compromised by depletion of NK cells (Figure 7B). The median survival time of CD37-SMIP-treated mice decreased from 51 days (95% CI, 38, 78) to 27 days (95% CI, 25, 37) ($P = .017$) with the depletion of NK cells. A similar result was also observed with the rituximab-treated group (49 days vs 25 days), which is consistent with an earlier report.³⁴ The depletion of NK cells failed to exhibit significant effect to the trastuzumab control groups (16 days vs 17 days, $P = .16$). These data provide further support to the importance of NK cells in mediating CD37-SMIP efficacy in vivo.

Discussion

Herein, we describe a new targeted therapeutic approach using the SMIP directed at the lineage-specific CD37 antigen in CLL and related B-cell malignancies. CLL is currently incurable, and available antibody therapies targeting CD20 (rituximab) or CD52 (alemtuzumab) are either less effective or highly immunosuppressive. CD37 therefore represents a potentially superior target for peptide-based therapy, based on either expression features relative to CD20 or selectivity relative to CD52. Our data herein against primary CLL cells demonstrate that CD37-SMIP is superior to both rituximab and alemtuzumab relative to direct cytotoxicity (in the presence of a cross-linker) and ADCC efficacy. In addition, CD37 targeted SMIP therapy has B-cell selectivity that contrasts with alemtuzumab.³⁷

CD37-SMIP differentiates itself from several other therapies used in CLL by mediating apoptosis through a novel caspase-independent pathway not used by other therapies used in this disease. Our data demonstrates that apoptosis by CD37-SMIP is directly proportionate to CD37 surface antigen expression and dependent in part on signal transduction and tyrosine phosphorylation of specific proteins. Disruption of CD37-SMIP-mediated tyrosine phosphorylation results in protection against apoptosis, a finding that contrasts with rituximab where herbimycin actually enhances apoptosis.³⁸ Identification of these specific proteins phosphorylated by CD37-SMIP is currently under active investigation by our group. A difference in CD37-SMIP mechanism of

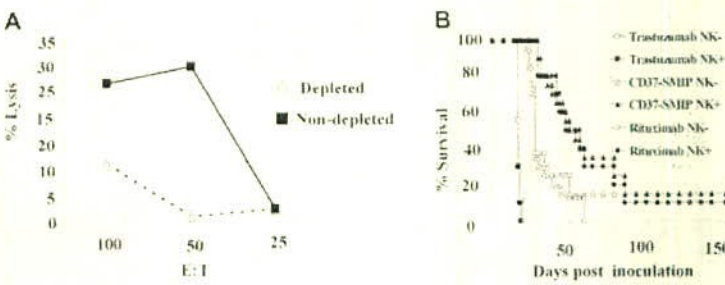


Figure 7. In vivo anti-lymphoma activity by CD37-SMIP is dependent on NK cells. (A) Decreased ex vivo NK-cell activity in splenocytes from mice treated with anti-asialo GM1 antibody. Splenocytes from control or mice treated with NK-cell-depleting anti-asialo GM1 antibody were tested for their ability to mediate cytotoxicity against NK-cell target Yac-1 cells. Solid and broken lines represent percentage lysis mediated by cells from NK-undepleted and -depleted mice, respectively. (B) Depletion of NK cells reduced therapeutic efficacy of CD37-SMIP in vivo. In vivo therapeutic efficacy of trastuzumab, CD37-SMIP or rituximab were compared in control (NK⁺) or anti-asialo GM1 antibody-treated (NK⁻) Raji xenograft model. Survival is determined based on the paralysis time after inoculation. Log-rank test was applied for statistical analysis.

action compared with rituximab is further supported by a preliminary report demonstrating synergy between rituximab and CD37-SMIP in lymphoma xenograft models.⁴¹

How CD37-SMIP cross modulates other cell-surface molecules, such as CD20 and CD52, is an important question to be addressed for potential combination of CD37-SMIP with other therapeutic antibodies currently being used for B-cell malignancies. We have conducted studies in both Raji cell lines and CLL cells, examining the effect of CD37-SMIP treatment toward the expression level of CD19, CD20, CD52, CD40, CD86, and HLA-DR. So far, our preliminary results have failed to reveal significant changes in expression of CD19, CD52, CD40, or CD86 in response to treatment with CD37-SMIP (with or without cross-linker). However, detectable modulation of CD20 expression as evidenced by decreased mean fluorescence intensity with minimal decrease in CD20⁺ cells have been variably observed. In contrast, both Raji cells and CLL cells seemed to have diminished binding affinity toward mouse anti-human CD37 monoclonal antibody, which may indicate either blocking of binding by CD37-SMIP or shedding of CD37 molecule from the cell surface. It will be a valuable approach to investigate whether combination of CD37-SMIP with other therapeutic antibodies currently used for B-cell malignancies therapy will bring synergistic effect.

The success of therapeutic antibodies to eliminate both normal B cells and NHL tumor cells seems to be greatly influenced by ability to mediate ADCC as demonstrated by both preclinical *in vivo* studies⁴²⁻⁴⁴ and clinical trials in NHL where high affinity FcγRIIIa polymorphisms associated with enhanced ADCC are linked to superior response to rituximab.⁴⁵⁻⁴⁸ The critical role of FcγR in *in vivo* effects of therapeutic antibodies has also been supported by studies in mice deficient of FcγR.^{42,44} In CLL cells, however, rituximab mediates relatively poor ADCC, possibly explaining diminished efficacy of this antibody. Our data provide evidence that CD37-SMIP mediates significantly greater selective ADCC against CLL cells and related B-cell lymphoma cell lines compared with rituximab and alemtuzumab ADCC mediated by CD37-SMIP in CLL cells occurs predominantly through human NK cells but not monocytes. In contrast to what was observed in human systems, murine effector cells mediate less effective ADCC with CD37-SMIP compared with rituximab and alemtuzumab (data not shown). We nonetheless pursued *in vivo* studies in a highly aggressive Raji-disseminated leukemia/lymphoma model in which the therapeutic efficacy of CD37-SMIP may be superior than that observed with rituximab. A subsequent experiment demonstrated the importance of NK cells to the effectiveness of CD37-SMIP therapy and possibly rectified why only equivalent efficacy to rituximab was observed in this murine model of lymphoma. The ultimate test of CD37 SMIP efficacy will require pursuit of clinical studies in patients with CLL and related diseases. Despite macrophage/monocytes-mediated ADCC activity being observed with several antibodies,^{49,50} we failed to demonstrate that CD37-SMIP is associated with phagocytic efficacy in our studies. How the absence of CD37-SMIP-induced phagocytosis will differentiate this engineered protein from other Ab-based therapeutics will be interesting to further define the *in vivo* function of this molecule. Future studies on the importance of FcγRIIIa polymorphisms toward SMIP-based therapeutics will also be important to elucidate the clinical activity for this class of SMIP molecules compared with

existing Ab therapeutics. The ultimate test of CD37 SMIP efficacy will require pursuit of clinical studies in patients with CLL and related diseases.

The development of targeted peptide therapies that depend on signaling and ADCC has been unsuccessful so far because of limited production capability and poor pharmacokinetic features relative to therapeutic antibodies. Preclinical development of the first CD20-directed SMIP Tru15 has demonstrated absence of immunogenicity in cynomolgus monkeys, and superior B-cell depletion compared with rituximab.⁵¹ Preliminary results of the first phase I study with Tru15 demonstrated it to be clinically well tolerated, and successful at depleting B-cells in a dose-dependent manner with an extended serum half-life (12-19 days).⁵² Thus, development of CD37-SMIP for clinical investigation in CLL based on our data herein represents an obvious extension of this exciting targeted therapeutic class of agents directed at a B-cell-selective antigen not yet pursued. The unique engineered features of SMIP-based therapies may offer an advantage over classic antibody based-therapies, including improved effector function, target affinity, and apoptotic signaling. Detection of immunogenicity-related neutralizing antibody response against CD37-SMIP after multiple injections at various frequencies in cynomolgus monkeys will be valuable to further investigate the immune response toward this class of engineered proteins with modified Fc region. In addition, pharmacokinetic studies to define the plasma half-life, and biodistribution studies to define the targeting effect will also be important to determine the clinical application of this novel targeted therapy in CD37⁺ lymphoid malignancies. Based on these exciting preclinical data, further clinical development of CD37-SMIP is warranted.

Acknowledgments

This work was supported by the National Cancer Institute (P01-CA95426), the Leukemia and Lymphoma Society of America, and the D. Warren Brown Foundation. J.C.B. is a clinical scholar of the Leukemia and Lymphoma Society of America.

Authorship

Contribution: X. Z. performed research, analyzed data, and wrote the manuscript; R.L., T.J., C.C., and A.G. performed research; M.S.H.-L. and P.R.B. contributed vital new reagents, including construction of CD37-SMIP; T.S.L. contributed clinical patient samples; D.J. and A.L. performed statistical analysis; D.K. directed mouse pathology analysis; R.J.L. advised students and reviewed the manuscript; M.A.C. directed the program and contributed in raising funds; S.T. advised students and reviewed the manuscript; N.M. designed and supervised research and wrote the manuscript; J.C.B., the senior author, designed and supervised research and wrote the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: M.S.H.-L. and P.R.B. are employees of Trubion Pharmaceuticals and have a financial interest in CD37-SMIP. The remaining authors declare no competing financial interests.

Correspondence: John C. Byrd, MD, B302 Starling Loving Hall, The Ohio State University, 320 West 10th Avenue, Columbus, Ohio 43210; e-mail: john.byrd@osumc.edu.

References

- White CA, Weaver RL, Grillo-Lopez AJ. Antibody-targeted immunotherapy for treatment of malignancy. *Annu Rev Med*. 2001;52:125-145.
- Hiddemann W, Kloha M, Dreyling M, et al. Front-line therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with

25

- therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood*. 2005;106:3725-3732.
3. Hiddemann W, Buske C, Dreyling M, et al. Treatment strategies in follicular lymphomas: current status and future perspectives. *J Clin Oncol*. 2005;23:6394-6399.
4. van Oers MH, Klasa R, Marcus RE, et al. Rituximab maintenance improves clinical outcome of relapsed/resistant follicular non-Hodgkin lymphoma in patients both with and without rituximab during induction: results of a prospective randomized phase 3 intergroup trial. *Blood*. 2006;108:3295-301.
5. Hainsworth JD. Prolonging remission with rituximab maintenance therapy. *Semin Oncol*. 2004;31(1 Suppl 2):17-21.
6. McLaughlin P, Grillo-Lopez AJ, Link BK, et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a 4-dose treatment program. *J Clin Oncol*. 1998;16:2825-2833.
7. Forstpointner R, Dreyling M, Repp R, et al. The addition of rituximab to a combination of fludarabine, cyclophosphamide, mitoxantrone (FCM) significantly increases the response rate and prolongs survival as compared with FCM alone in patients with relapsed and refractory follicular and mantle cell lymphomas: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood*. 2004;104:3064-3071.
8. Kahl BS, Longo WL, Eickhoff JC, et al. Maintenance rituximab following induction chemotherapy may prolong progression-free survival in mantle cell lymphoma: a pilot study from the Wisconsin Oncology Network. *Ann Oncol*. 2006;17:1418-1423.
9. Foran JM, Rohatiner AZ, Cunningham D, et al. European phase II study of rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) for patients with newly diagnosed mantle-cell lymphoma and previously treated mantle-cell lymphoma, immunocytoma, and small B-cell lymphocytic lymphoma [published erratum appears in *J Clin Oncol*. 2000;18:2006]. *J Clin Oncol*. 2000;18:317-324.
10. Howard OM, Gribben JG, Neuberg DS, et al. Rituximab and CHOP induction therapy for newly diagnosed mantle-cell lymphoma: molecular complete responses are not predictive of progression-free survival. *J Clin Oncol*. 2002;20:1288-1294.
11. Romaguera JE, Fayad L, Rodriguez MA, et al. High rate of durable remissions after treatment of newly diagnosed aggressive mantle-cell lymphoma with rituximab plus hyper-CVAD alternating with rituximab plus high-dose methotrexate and cytarabine [published erratum appears in *J Clin Oncol*. 2006;24(4):724]. *J Clin Oncol*. 2005;23:7013-7023.
12. Coiffier B, Haioun C, Ketterer N, et al. Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) for the treatment of patients with relapsing or refractory aggressive lymphoma: a multicenter phase II study. *Blood*. 1998;92:1927-1932.
13. Feugier P, Van Hoof A, Sebban C, et al. Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol*. 2005;23:4117-4126.
14. Thomas DA, Faderl S, O'Brien S, et al. Chemotherapy with hyper-CVAD plus rituximab for the treatment of adult Burkitt and Burkitt-type lymphoma or acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 2006;106:1569-1580.
15. Schwartz-Albiez R, Dorken B, Hofmann W, Moldenhauer G. The B cell-associated CD37 antigen (gp40-52). Structure and subcellular expression of an extensively glycosylated glycoprotein. *J Immunol*. 1988;140:905-914.
16. Classon BJ, Williams AF, Willis AC, Seed B, Stamenkovic I. The primary structure of the human leukocyte antigen CD37, a species homologue of the rat MRC OX-44 antigen [published erratum appears in *J Exp Med*. 1990;172:1007]. *J Exp Med*. 1989;169:1497-1502.
17. Belov L, de la Vega O, dos Remedios CG, Mulligan SP, Christopherson RL. Immunophenotyping of leukemias using a cluster of differentiation antibody microarray. *Cancer Res*. 2001;61:4483-4489.
18. Barrera S, Almeida J, Yunta M, et al. Aberrant expression of tetraspanin molecules in B-cell chronic lymphoproliferative disorders and its correlation with normal B-cell maturation. *Leukemia*. 2005;19:1376-1383.
19. Campo E, Cardesa A, Alos L, et al. Non-Hodgkin's lymphomas of nasal cavity and paranasal sinuses. An immunohistochemical study. *Am J Clin Pathol*. 1991;96:184-190.
20. Carbone A, Pinto A, Ghoghini A, Volpe R, Zagonel V. B-zone small lymphocytic lymphoma: a morphologic, immunophenotypic, and clinical study with comparison to "well-differentiated" lymphocytic disorders. *Hum Pathol*. 1992;23:438-448.
21. van Spruiel AB, Puls KL, Sofi M, et al. A regulatory role for CD37 in T cell proliferation. *J Immunol*. 2004;172:2953-2961.
22. Link MP, Bindl J, Meeker TC, et al. A unique antigen on mature B cells defined by a monoclonal antibody. *J Immunol*. 1986;137:3013-3018.
23. Moldenhauer G. Cd37. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2000;14:281-283.
24. Angelisová P, Hilgert I, Horejsi V. Association of four antigens of the tetraspanin family (CD37, CD53, TAPA-1, and R2/C33) with MHC class II glycoproteins. *Immunogenetics*. 1994;39:249-256.
25. Press OW, Farr AG, Borroz KI, Anderson SK, Martin PJ. Endocytosis and degradation of monoclonal antibodies targeting human B-cell malignancies. *Cancer Res*. 1989;49:4906-4912.
26. Press OW, Howell-Clark J, Anderson S, Bernstein I. Retention of B-cell-specific monoclonal antibodies by human lymphoma cells. *Blood*. 1994;83:1390-1397.
27. Knobeloch KP, Wright MD, Ochsenbein AF, Liesenfeld O, Lohler J, Zinkernagel RM, Horak I, Orinska Z. Targeted inactivation of the tetraspanin CD37 impairs T-cell-dependent B-cell response under suboptimal costimulatory conditions. *Mol Cell Biol*. 2000;20:5363-5369.
28. Buchsbaum DJ, Wahl RL, Normolle DP, Kaminski MS. Therapy with unlabeled and ¹³¹I-labeled pan-B-cell monoclonal antibodies in nude mice bearing Raji Burkitt's lymphoma xenografts. *Cancer Res*. 1992;52:6476-6481.
29. Brown RS, Kaminski MS, Fisher SJ, Chang AE, Wahl RL. Intratumoral microdistribution of [¹³¹I]MB-1 in patients with B-cell lymphoma following radioimmunotherapy. *Nucl Med Biol*. 1997;24:657-663.
30. Eary JF, Press OW, Badger CC, et al. Imaging and treatment of B cell lymphoma. *J Nucl Med*. 1990;31:1257-1268.
31. Press OW, Eary JF, Appelbaum FR, et al. Radio-labeled-antibody therapy of B-cell lymphoma with autologous bone marrow support. *N Engl J Med*. 1993;329:1219-1224.
32. Press OW, Eary JF, Badger CC, et al. Treatment of refractory non-Hodgkin's lymphoma with radio-labeled MB-1 (anti-CD37) antibody. *J Clin Oncol*. 1989;7:1027-1038.
33. Kaminski MS, Fig LM, Zasadny KR, et al. Imaging, dosimetry, and radioimmunotherapy with iodine 131-labeled anti-CD37 antibody in B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 1992;10:1696-1711.
34. Cheson BD, Bennett JM, Grever M, et al. National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood*. 1996;87:4990-4997.
35. Mone AP, Huang P, Pelicano H, et al. Hu1D10 induces apoptosis concurrent with activation of the AKT survival pathway in human chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*. 2004;103:1846-1854.
36. Byrd JC, Kitada S, Flinn IW, et al. The mechanism of tumor cell clearance by rituximab in vivo in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: evidence of caspase activation and apoptosis induction. *Blood*. 2002;99:1038-1043.
37. Mone AP, Cheney C, Banks AL, et al. Alemtuzumab induces caspase-independent cell death in human chronic lymphocytic leukemia cells through a lipid raft-dependent mechanism. *Leukemia*. 2006;20:272-279.
38. Shan D, Ledbetter JA, Press OW. Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies. *Blood*. 1998;91:1644-1652.
39. Pettitt AR, Cawley JC. Caspases influence the mode but not the extent of cell death induced by purine analogues in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2004;109:800-804.
40. Bellosillo B, Villamor N, Lopez-Guillermo A, et al. Spontaneous and drug-induced apoptosis is mediated by conformational changes of Bax and Bak in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;100:1810-1816.
41. Barone D, Ledbetter J, Hayden-Ledbetter M, Mohler K. Efficacy of SMIP-016, a novel CD37-directed biologic therapy, in human NHL tumor xenograft models [abstract]. *J Clin Oncol*. 2006;24S:2565.
42. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med*. 2000;6:443-446.
43. Hamaguchi Y, Xiu Y, Komura K, Nimmerjahn F, Tedder TF. Antibody isotype-specific engagement of Fcγ receptors regulates B lymphocyte depletion during CD20 immunotherapy. *J Exp Med*. 2006;203:743-753.
44. Uchida J, Hamaguchi Y, Oliver JA, et al. The innate mononuclear phagocyte network depletes B lymphocytes through Fc receptor-dependent mechanisms during anti-CD20 antibody immunotherapy. *J Exp Med*. 2004;199:1659-1669.
45. Carton G, Dacheux L, Salles G, et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood*. 2002;99:754-758.
46. Weng WK, Levy R. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2003;21:3940-3947.
47. Ghielmini M, Rutibach K, Salles G, et al. Single agent rituximab in patients with follicular or mantle cell lymphoma: clinical and biological factors that are predictive of response and event-free survival as well as the effect of rituximab on the immune system: a study of the Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK). *Ann Oncol*. 2005;16:1675-1682.
48. Treon SP, Hansen M, Branagan AR, et al. Polymorphisms in FcγRIIIA (CD16) receptor expression are associated with clinical response to rituximab in Waldenström's macroglobulinemia. *J Clin Oncol*. 2005;23:474-481.
49. Lefebvre ML, Krause SW, Salcedo M, Nardin A. Ex vivo-activated human macrophages kill chronic lymphocytic leukemia cells in the presence of rituximab: mechanism of antibody-dependent cellular cytotoxicity and impact of human serum. *J Immunother*. 2006;29:388-397.
50. Manches O, Lui G, Chaperot L, et al. In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas. *Blood*. 2003;101:949-954.
51. Barone D, Baum P, Ledbetter J, Ledbetter MH, Mohler K. Prolonged depletion of circulating B-cells in cynomolgus monkeys after a single dose of Tru-015, a novel CD20 directed therapeutic. *Ann Rheum Dis*. 2005;64:159.
52. Burge DJ, Kivitz AJ, Fleischmann RM, Shu C, Bannink J, Barone D. Phase I study of Tru-015, a CD20 directed small modular immune pharmaceutical (SMIP TM) protein therapeutic in subjects with rheumatoid arthritis [abstract]. *Ann Rheum Dis*. 2006;65:180.



PERÚ

Presidencia
del Consejo de Ministros

INDECOPI

DIRECCIÓN DE INVENCIONES Y NUEVAS TECNOLOGÍAS

EXPEDIENTE N° 001321-2008/OIN

RESOLUCIÓN N° 000676-2013/DIN-INDECOPI

Lima, 30 de mayo de 2013

Patente de invención: Concedida

Mediante expediente N° 001321-2008/OIN, iniciado el 07 de agosto de 2008, con prioridad de fecha 09 de agosto de 2007, BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH de Alemania, solicita patente de invención para "ANTICUERPOS ANTI-CD37", C.I.P.7 C07K 16/28; A61K 39/395; C12N 5/00; A61P 35/02, cuyos inventores son KARL-HEINZ HEIDER; ERIC BORGES y ELINBORG OSTERMANN.

1. EXAMEN DE PATENTABILIDAD

La invención solicitada reúne los requisitos establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina que aprueba el Régimen Común sobre Propiedad Industrial, conforme aparece del informe que corre de fojas 360 a 364 del expediente.

La presente resolución se emite en aplicación de la norma legal antes mencionada y en uso de las facultades conferidas por los artículos 37 y 40 de la Ley de Organización y Funciones del Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual (INDECOPI) sancionada por Decreto Legislativo N° 1033, concordado con el artículo 4 del Decreto Legislativo 1075 que aprueba las disposiciones complementarias a la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

2. RESOLUCIÓN DE LA DIRECCIÓN DE INVENCIONES Y NUEVAS TECNOLOGÍAS

OTORGAR patente de invención para "ANTICUERPOS ANTI-CD37", C.I.P.7 C07K 16/28; A61K 39/395; C12N 5/00; A61P 35/02, a favor de BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH de Alemania, por un plazo de veinte (20) años, contados desde el 07 de agosto de 2008, fecha de presentación de la solicitud, aprobándose las 15 reivindicaciones que corren de fojas 354 a 356 del expediente.

Regístrese y Comuníquese

BRUNO MÉRCCHOR VALDERRAMA
Director de Inventiones y
Nuevas Tecnologías
INDECOPI



INSTITUTO NACIONAL DE DEFENSA DE LA COMPETENCIA Y DE LA PROTECCIÓN DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL

Calle De la Prosa 10-1, San Borja, Lima 41 - Perú Tlf: 224 7800 / Fax: 224 0348

E-mail: postmaster@indecopi.gob.pe / Web: www.indecopi.gob.pe



INFORME TECNICO GMM 78-2012/A

EXPEDIENTE : N° 001321-2008/OIN de fecha 2008-08-07

SOLICITANTE : BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH, de ALEMANIA.

PRIORIDAD : 07114128.7 (EP) de fecha 2007-08-09

ASUNTO : Examen adicional de la solicitud de patente de invención para "ANTICUERPOS ANTI-CD37", efectuado de acuerdo con el artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

1.- ANTECEDENTES.-

- Informe técnico GMM 78-2012 en el que se concluye que:
Las **REIVINDICACIONES 1-23 NO CUMPLEN** con los requisitos de claridad, concisión y sustento en la descripción según el Art. 30 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.
- Escrito de fecha 09 de abril de 2013 con el que la solicitante presenta un pliego de 25 reivindicaciones a fin de superar las observaciones realizadas en el informe técnico GMM 78-2012.

1.- TEXTOS A ANALIZAR.-

- Memoria descriptiva (M.D.) originalmente presentada.
- Reivindicaciones 1 a 53 originalmente presentadas.
- Pliego de 23 reivindicaciones presentado mediante escrito de fecha 04 de mayo del 2011.
- Pliego de 25 reivindicaciones presentado mediante escrito de fecha 09 de abril del 2013.

MODIFICACIÓN DE LA SOLICITUD:

El nuevo pliego de 25 reivindicaciones presentado mediante el escrito de fecha 09 de abril del 2013, **NO CONSTITUYE UNA AMPLIACIÓN** y **CUMPLE** lo definido en el Art. 34 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina

2.- NO INVENCIONES Y EXCLUSIONES A LA PATENTABILIDAD.-

- Las **REIVINDICACIONES 1-25** se refieren a un producto o un procedimiento, por lo que son susceptibles de patentarse conforme al Artículo 14 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina y asimismo, porque no están consideradas como no invenciones ni excluidas de patentabilidad según lo dispuesto en los Artículos 15 y 20 de la referida Decisión 486, respectivamente.

3.- SUFICIENCIA Y CLARIDAD.-

3.1.- La descripción de la invención permite la comprensión del problema técnico y la solución que plantea la invención a dicho problema, y por tanto la memoria descriptiva CUMPLE los requisitos del artículo 28 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

3.2.- Las REIVINDICACIONES 1-5 y 22-25 CUMPLEN con los requisitos de claridad, concisión y sustento en la descripción según el Art. 30 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

3.3.- Las REIVINDICACIONES 6-21 NO CUMPLEN con los requisitos de claridad, concisión y sustento en la descripción según el Art. 30 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, ya que:

La reivindicación 6:

Define "Una molécula de ADN que comprende una región que codifica la región variable de cadena pesada variable de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5"

En el informe técnico precedente se manifestó que al haber sido descrita como "*Una molécula de ADN que comprende una región que codifica la cadena pesada variable de un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10*", definía a la molécula de ADN mediante la cadena pesada variable que codifica mas no mediante su propia secuencia, lo cual comprende un resultado a alcanzar. Esta reivindicación debía definir el par de moléculas de ADN que corresponden a las regiones variables de cadena pesada y liviana o a las cadenas pesada y liviana definidos mediante sus propias secuencias de nucleótidos.

Mediante el escrito de fecha 09 de abril de 2013 la solicitante manifiesta que el inventor está en su derecho de reclamar protección para la totalidad de un concepto inventivo desarrollado sin importar la amplitud de este y que no existe requerimiento alguno que determine que los ejemplos deban ilustrar todos y cada uno de los compuestos que se encuentren dentro del alcance de la invención. Por otro lado manifiestan que el hecho de solicitar la inclusión de tales secuencias solamente limita el derecho a reclamar protección sobre el concepto inventivo desarrollado, es decir, cualquier molécula de ADN que produzca los anticuerpos quiméricos de la presente invención.

Al respecto se REITERA que tal como está redactado se describe un resultado a alcanzar y que la definición correcta del ADN es mediante la definición de sus secuencias de nucleótidos tal como fue informado en el informe técnico GMM 78-2012.

Adicionalmente cabe señalar que las reivindicaciones son la parte mas importante de la solicitud, pues definen la invención a proteger y delimitan el alcance de esa protección (Art. 51). Es fundamental que sean claras y concisas (Art. 30) para que:

- Se puedan comparar y diferenciar del estado de la técnica con el fin de verificar los requisitos de patentabilidad; y
- Puedan determinar sin ambigüedad hasta donde llegan los derechos del titular de la patente.

Por último, las reivindicaciones deben definir la invención por sus características esenciales, estructurales o funcionales. No se admite que la reivindicación defina la invención por el resultado a alcanzar puesto que equivaldría a definir el problema técnico a resolver y el alcance de la reivindicación incluiría no solo la solución propuesta por el solicitante, sino todas las alternativas presentes o futuras que lleguen a ese resultado.

18

Las reivindicaciones 7 a 10 son dependientes de la reivindicación 6, cuestionada, por lo que no cumplen con el Art. 30 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

La reivindicación 11:

Define "Una molécula de ADN que comprende una región que codifica la región variable de cadena ligera de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5"

En el informe técnico precedente se manifestó que al no haber sido descrita mediante su propia secuencia, comprendía un resultado a alcanzar.

Mediante el escrito de fecha 09 de abril de 2013 la solicitante manifiesta que el inventor esta en su derecho de reclamar protección para la totalidad de un concepto inventivo desarrollado sin importar la amplitud de este y que no existe requerimiento alguno que determine que los ejemplos deban ilustrar todos y cada uno de los compuestos que se encuentren dentro del alcance de la invención. Por otro lado manifiestan que el hecho de solicitar la inclusión de tales secuencias solamente limita el derecho a reclamar protección sobre el concepto inventivo desarrollado, es decir, cualquier molécula de ADN que produzca los anticuerpos quiméricos de la presente invención.

Al respecto se REITERA que tal como está redactado se describe un resultado a alcanzar y que la definición correcta del ADN es mediante la definición de sus secuencias de nucleótidos.

Adicionalmente cabe señalar que las reivindicaciones son la parte mas importante de la solicitud, pues definen la invención a proteger y delimitan el alcance de esa protección (Art. 51). Es fundamental que sean claras y concisas (Art. 30) para que:

- Se puedan comparar y diferenciar del estado de la técnica con el fin de verificar los requisitos de patentabilidad; y
- Puedan determinar sin ambigüedad hasta donde llegan los derechos del titular de la patente.

Por último, las reivindicaciones deben definir la invención por sus características esenciales, estructurales o funcionales. No se admite que la reivindicación defina la invención por el resultado a alcanzar puesto que equivaldría a definir el problema técnico a resolver y el alcance de la reivindicación incluiría no solo la solución propuesta por el solicitante, sino todas las alternativas presentes o futuras que lleguen a ese resultado.

Las reivindicaciones 12 a 15 son dependientes de la reivindicación 11, cuestionada, por lo que no cumplen con el Art. 30 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

Las reivindicaciones 16 a 19 definen el vector de expresión que contiene una molécula de ADN de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, cuestionadas; y/o una molécula de ADN de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, cuestionadas; por lo que no cumplen con el Art. 30 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

La reivindicación 20 define una célula anfitriona que porta uno o más vectores de acuerdo con las reivindicaciones 16 a 19, cuestionadas; por lo que no cumple con el Art. 30 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

La reivindicación 21 define un método para producir un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende transfectar una célula anfitriona de mamífero con uno o mas vectores de las reivindicaciones 16 a 19, cuestionadas; por lo que no cumple con el Art. 30 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

4.1.- NOVEDAD

Reivindicaciones independientes: 1, 2, 4, 22 y 25.
Reivindicaciones dependientes: 3, 5, 23 y 24.

ESTADO DE LA TECNICA:

- El documento D1 es la solicitud de patente WO 2005/017148 A1, publicada en 2005.02.24 (TRUBION PHARMACEUTICALS, INC.), titulada "CONSTRUCCIONES DE UNIÓN Y MÉTODOS DEL USO DE LOS MISMOS".
- El documento D2 es la publicación de Boulianne et al., titulada: "PRODUCCIÓN DE UN ANTICUERPO FUNCIONAL QUIMÉRICO DE RATÓN/ HUMANO" de *Nature*, 1984, vol. 312, no. 5995: 643-646.
- El documento D3 es la patente US 6,548,640 B1, publicada en 2003.04.15 (BTG INTERNATIONAL LIMITED), titulada "ANTICUERPOS ALTERADOS".
- El documento D4 es la solicitud de patente WO 2007/041635 A2, publicada en 2007.04.12 (XENCOR, INC.), titulada "VARIANTES FC CON PROPIEDADES DE UNIÓN AL RECEPTOR FC OPTIMIZADAS".
- El documento D5 es la solicitud de patente WO 2007/014278 A2, publicada en 2007.02.01 (TRUBION PHARMACEUTICALS), titulada "REDUCCIÓN DE CÉLULAS B USANDO MOLÉCULAS DE UNIÓN ESPECÍFICAS A CD37 Y CD20".

ANÁLISIS DE LA NOVEDAD:

REIVINDICACION 1:

Define un anticuerpo quimérico que se une a CD37 humano que se define por:

- i) una región variable de cadena pesada de SEQ ID N° 2
- ii) una región variable de cadena ligera de SEQ ID N° 4
- iii) una región constante de cadena pesada de secuencia SEQ ID N° 24
- iv) una región constante de cadena ligera de secuencia SEQ N° 26.

Con respecto a D1-D5:

Los documentos D1-D5 no describen un anticuerpo quimérico de regiones variables de SEQ ID NO: 2 y 4 y regiones constantes humanas como se describe en esta reivindicación, por lo que estos documentos no anticiparían a esta reivindicación.

Por lo que, la reivindicación 1 CUMPLE con el requisito de Novedad establecido por el Art. 16 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

REIVINDICACION 2:

Define un anticuerpo quimérico que se une a CD37 humano que se define por:

- i) una región variable de cadena pesada de SEQ ID N° 2
- ii) una región variable de cadena ligera de SEQ ID N° 4
- iii) una región constante de cadena pesada de secuencia SEQ ID N° 28
- iv) una región constante de cadena ligera de secuencia SEQ N° 30.

Con respecto a D1-D5:

Los documentos D1-D5 no describen un anticuerpo quimérico de regiones variables de SEQ ID NO: 2 y 4 y regiones constantes humanas como se describe en esta reivindicación, por lo que estos documentos no anticipan a esta reivindicación.

Por lo que, la reivindicación 2 CUMPLE con el requisito de Novedad establecido por el Art. 16 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

La **reivindicación 3** es dependiente de la reivindicación 2, novedosa, por lo que CUMPLE con el requisito de Novedad establecido por el Art. 16 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

REIVINDICACION 4:

Define un anticuerpo quimérico que se une a CD37 humano que se define por:

- i) una región variable de cadena pesada de SEQ ID N° 2
- ii) una región variable de cadena ligera de SEQ ID N° 4
- iii) una región constante de cadena pesada de secuencia SEQ ID N° 32
- iv) una región constante de cadena ligera de secuencia SEQ N° 34.

Con respecto a D1-D5:

Los documentos D1-D5 no describen un anticuerpo quimérico de regiones variables de SEQ ID NO: 2 y 4 y regiones constantes humanas como se describe en esta reivindicación, por lo que estos documentos no anticipan a esta reivindicación.

Por lo que, la reivindicación 4 CUMPLE con el requisito de Novedad establecido por el Art. 16 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

La **reivindicación 5** es dependiente de la reivindicación 4, novedosa, por lo que CUMPLE con el requisito de Novedad establecido por el Art. 16 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

Las **reivindicaciones 22 a 24** describen una composición que comprende el anticuerpo anti-CD37 de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, novedosa, por lo que CUMPLEN con el requisito de Novedad establecido por el Art. 16 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

La **reivindicación 25** describe un método para suprimir células B que expresan CD37 administrando un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, novedosas, por lo que CUMPLE con el requisito de Novedad establecido por el Art. 16 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

4.2.- NOTA SOBRE NIVEL INVENTIVO:

En vista del estado de la técnica anteriormente citado, el problema que pretende resolver la presente solicitud consiste en proveer anticuerpos útiles en el tratamiento de cáncer de células B y de enfermedades autoinmunes e inflamatorias.

La solución propuesta por la solicitud consiste en proveer los anticuerpos quiméricos de las reivindicaciones y las composiciones que los comprenden.

El estado de la técnica más cercano son los documentos D1 y D2.

El documento D1 describe un anticuerpo murino denominado G28-1 anti-CD37 que posee una región variable de cadena pesada idéntica a la SEQ ID N° 2 y una región variable de cadena liviana que comprende la SEQ ID NO: 4 salvo por un aminoácido final R (Arginina).

El documento D2 describe métodos para producir anticuerpos quiméricos.

En el informe técnico precedente se indicó que la diferencia entre los anticuerpos quiméricos de las reivindicaciones 1, 8 y 9 (ahora 1, 2 y 4) consiste en que dichos anticuerpos son quiméricos a diferencia del anticuerpo de D1 que es un anticuerpo murino con un solo residuo de aminoácido final diferente. Las ventajas de usar anticuerpos quiméricos son de conocimiento común en el estado del arte y se conocen técnicas para producirlos rutinariamente, ver documento D2. Por lo que una persona normalmente versada en el arte, podría proveer anticuerpos anti-CD37 quiméricos derivados del anticuerpo murino revelado en D1. Con respecto al anticuerpo quimérico de la reivindicación 4 (ahora 5) con mutaciones en el Fc que modulan la función efectora, se conocen técnicas para obtener anticuerpos con variantes Fc. Se conocen anticuerpos con sustituciones de aminoácidos en las posiciones 332 y/o 239 y/o 236. Sus propiedades modificadas con respecto a la modulación de la función efectora son conocidas (ver el documento D4). Por lo que dicha reivindicación 4 (ahora 5) tampoco sería inventiva de redactarse como una reivindicación independiente. Por último se hizo notar que las ventajas de usar anticuerpos humanizados también son de conocimiento común en el estado del arte y las técnicas para producirlos rutinariamente también se conocen (ver por ejemplo el documento D3). Por lo que si el solicitante quisiera reivindicar anticuerpos humanizados deberá demostrar las ventajas de estos frente al anticuerpo murino original revelado en D1 (anticuerpo G28-1).

Mediante el escrito de fecha 09 de abril de 2013 la solicitante presenta argumentos a fin de superar las observaciones sobre el nivel inventivo de los anticuerpos que pretende reivindicar.

A la luz de los argumentos mencionados por la solicitante se tiene que los anticuerpos que se pretenden reivindicar presentan las siguientes ventajas frente al del arte previo G28.1:

La figura 6 de la memoria descriptiva muestra que los anticuerpos de tipo A tienen una mejor actividad apoptótica marcada, con respecto a otros anticuerpos evaluados; dicha actividad apoptótica es superior al 70%.

El ejemplo 9 y la figura 9 enseñan que el anticuerpo AO es un potente inductor de la apoptosis, incluso sin entrecruzamiento.

El ejemplo 10 y la figura 10 muestran que el anticuerpo AO y las variantes Fc (A2 y A4 en la figura 10) muestran una actividad pro-apoptótica similar.

Por ultimo, menciona que el experimento 10 muestra que la ingeniería Fc del anticuerpo AO no altera su actividad pro-apoptótica.

30

Mientras que en el anticuerpo murino G28.1 la actividad proapoptótica sin entrecruzamiento es menor.

De tal manera que al ser favorable en un anticuerpo una alta actividad proapoptótica ya que contribuye en la eliminación de células B del cuerpo del paciente, los anticuerpos que se pretenden reivindicar demuestran el efecto farmacológico mejorado distintivo sobre la actividad proapoptótica, incluso sin entrecruzamiento, lo que no había sido reportado para el anticuerpo murino G28.1 del antecedente D1.

En consecuencia, las reivindicaciones 1 a 5 y 22 a 25 CUMPLEN con el requisito de Nivel Inventivo establecido por el Art. 18 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

7. APLICACIÓN INDUSTRIAL

El objeto de la presente invención puede ser utilizado en la industria farmacéutica, por lo tanto cumple con el Artículo 19 de la Decisión 486.

8. CONCLUSIONES

Las REIVINDICACIONES 1 a 5 y 22 a 25 CUMPLEN con los requisitos de Novedad (Art. 16), Nivel Inventivo (Art. 18) y Aplicación Industrial (Art. 19) definidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

Las REIVINDICACIONES 6 a 21 NO CUMPLEN con los requisitos de claridad, concisión y sustento en la descripción según el Art. 30 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina

Realizado por:



Gianinna Márquez Mendoza
Examinadora de Patentes
CQF 6519L

RESPUESTA DEL PERITO

SOLICITUD NUMERO:
2349 - 2008
FECHA SOLICITUD:
08/08/2008

1.- SOLICITANTE:
BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GmbH

2.- TITULO: (NO MAYOR DE 330 CARACTERES) Anticuerpo que se une a CD37 humano; Molécula de ADN que la codifica; vector de expresión y células huésped; método de producción; composición farmacéutica que lo comprende; y su uso para tratar enfermedades relacionadas con células B.

3.- PERITO:
Amaya Puig G.

Expediente N°
4347

4.- RESULTADO DEL EXAMEN PERICIAL:

☐	SE RECOMIENDA LA CONCESIÓN DE LA PATENTE
☒	LA SOLICITUD NO CUMPLE CON LOS REQUISITOS ESTABLECIDOS POR LA LEY Y EL REGLAMENTO
☐	CON OBSERVACIONES

5.- ESTE INFORME SE BASA EN LA SIGUIENTE DOCUMENTACIÓN PRESENTADA :

HOJA TÉCNICA PRESENTADA ORIGINALMENTE CON FECHA:	08/08/2008
HOJA TÉCNICA PRESENTADA CON FECHA:	
MEMORIA DESCRIPTIVA, PAGINAS: 1 - 100	PRESENTADAS ORIGINALMENTE CON FECHA: 08/08/2008
MEMORIA DESCRIPTIVA, PAGINAS:	PRESENTADAS CON FECHA:
MEMORIA DESCRIPTIVA, PAGINAS:	PRESENTADAS CON FECHA:
REIVINDICACIONES: 1 - 27	PRESENTADAS EN LA SOLICITUD CON FECHA: 22/08/2012
REIVINDICACIONES:	PRESENTADAS CON FECHA:
REIVINDICACIONES:	PRESENTADAS CON FECHA:
REIVINDICACIONES:	PRESENTADAS CON FECHA:
DIBUJOS, LAMINAS: 1/17 - 17/17	PRESENTADAS EN LA SOLICITUD CON FECHA: 08/08/2008
LISTADOS DE SECUENCIA SEQ ID N°: 1 - 42	PRESENTADAS CON FECHA: 08/08/2008
DIBUJOS, LAMINAS:	PRESENTADAS CON FECHA:
DIBUJOS, LAMINAS:	PRESENTADAS CON FECHA:

Perito - Entrega Respuesta
del Perito
Folio P/2013/000748
Solicitud 2008-02349
Fecha 26/02/2013 00:00:00

6.- PRONUNCIAMIENTO SOBRE LA PRIORIDAD (ARTICULO 34 DE LA LEY Y ARTÍCULOS 59 A 62 DEL REGLAMENTO):

☐	LA(S) COPIA(S) DE PRIORIDAD(ES) HA(N) SIDO PRESENTADA(S) DENTRO DEL PLAZO (Art 34 Ley y 60 Reg) Y CORRESPONDE(N) A LA SOLICITUD CHILENA.
☒	LA(S) COPIA(S) DE PRIORIDAD(ES) HA(N) SIDO PRESENTADA(S) DENTRO DEL PLAZO (Art 34 Ley y 60 Reg), PERO SUSTENTA(N) LO REIVINDICADO EN LA SOLICITUD.
☐	LA(S) COPIA(S) DE PRIORIDAD(ES) HA(N) SIDO PRESENTADA(S) DENTRO DEL PLAZO (Art 34 Ley y 60 Reg), PERO NO SUSTENTA(N) LO REIVINDICADO EN LA SOLICITUD. NO SERÁ(N) CONSIDERADA(S).
☐	LA(S) COPIA(S) DE PRIORIDAD HA(N) SIDO PRESENTADA(S) FUERA DE PLAZO (Art 34 Ley y 60 Reg), NO SERÁ(N) CONSIDERADA(S).
☐	NO DECLARA PRIORIDAD.
☐	OTRO TIPO DE OBSERVACIÓN, VER ÍTEM 15.

RECEPCIÓN:

NACIONAL DE INTELIGENCIA
RECEPCION DE DOCUMENTOS
26 FEB 2013

7.- CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL DE PATENTES (CIP 7): C07K 16/28, C12N 15/13, A61K 39/395, A61P 35/02		SOLICITUD NUMERO: 2349 - 2008
8.- CAMPO DE LA BÚSQUEDA: C07K, C12N, A61K, A61P		
9.- RESULTADO DE BÚSQUEDA DEL ESTADO DE LA TÉCNICA:		
CATEGORIA	CITA DEL DOCUMENTO CON INDICACIÓN DE LAS PARTES RELEVANTES	REIVINDICACIONES AFECTADAS
	<u>BÚSQUEDA NACIONAL:</u> No se encontró ninguna solicitud concedida, abandonada, desistida o en trámite, presentada en Chile.	
A	<u>BÚSQUEDA INTERNACIONAL:</u> D 1 WO 2005 017149 (TRUBION PHARMACEUTICALS INC.) 24/02/2005.	Ninguna
A	D 2 DATABASE.BIOSIS Boulianne G. L. et al. Nature 312(5995) (1984)643 - 646.	Ninguna
A	D 3 US 6 548 640 (WINTER GREGORY PAUL) 15/04/2003	Ninguna
A	D 4 WO 2007 041635 (XENCOR INC) 12/04/2007	Ninguna
A	D 5 WO 2007 014278 (TRUBION PHARMACEUTICALS) 01/02/2007	Ninguna
W	D 6 Xiaobin Zhao et al. Blood 110(7) (2007): 2569	-----
X : DOCUMENTO RELEVANTE POR SÍ SOLO. Y : DOCUMENTO RELEVANTE EN COMBINACIÓN CON OTRO DE LA MISMA CATEGORÍA. A : ESTADO DE LA TÉCNICA. C : DOCUMENTO CITADO EN LA SOLICITUD. P : DOCUMENTO PUBLICADO ENTRE LA FECHA DE PRESENTACIÓN Y DE PRIORIDAD DE LA SOLICITUD.		E : ANTERIOR A LA PRIORIDAD DE LA SOLICITUD, PERO PUBLICADO DESPUÉS QUE LA SOLICITUD M : DOCUMENTO MIEMBRO DE LA MISMA FAMILIA DE PATENTES. O : DOCUMENTO DE OPOSICIÓN. D : DOBLE PROTECCIÓN Z : EN ESPERA DE MAYOR INFORMACIÓN. W : VER ÍTEM 15.

10.- EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE LAS REIVINDICACIONES: (VER ARGUMENTACIÓN EN ÍTEM 15)		SOLICITUD NUMERO: 2349 - 2008
HAY OBSERVACIONES A LA PRESENTACIÓN DE LAS REIVINDICACIONES: NO ☐ SI ☒		
NÚMERO DE REIVINDICACIONES PRESENTADAS: 27		
TIPO DE OBSERVACIÓN:	REIVINDICACIONES AFECTADAS	
NO TIENE APLICACIÓN INDUSTRIAL (Artículo 36 LEY)		
FALTA NOVEDAD (Artículo 33 LEY)		
FALTA NIVEL INVENTIVO (Artículo 35 LEY)		
NO DEFINE CLARAMENTE LA INVENCION (Artículos 41 y 44 REGLAMENTO)	25	
FALTAN CARACTERÍSTICAS ESENCIALES (Artículos 41 y 43 REGLAMENTO)		
FALTA SUSTENTO EN MEMORIA (Artículo 41 REGLAMENTO)		
CONTENIDO NO AUTOSUFICIENTE (Artículo 41 REGLAMENTO)		
NO HAY UNIDAD DE INVENCION (Artículos 40 y 44 REGLAMENTO)		
PREÁMBULO Y CARACTERIZACIÓN (Artículo 43 REGLAMENTO)		
FALTA LA PALABRA "CARACTERIZADO" (Artículo 42 Y 43 REGLAMENTO)	26	
NO HAY ENLACE APROPIADO (Artículos 40 y 44 REGLAMENTO)	1, 2, 4 - 20	
EXCLUSIÓN DE PATENTABILIDAD (Artículo 37 LEY, LETRA d)	26	
OTRAS: (VER ARGUMENTACIÓN EN ÍTEM 15)		
11.- EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE LA HOJA TÉCNICA: (VER ARGUMENTACIÓN EN ÍTEM 15)		
HAY OBSERVACIONES A LA PRESENTACIÓN DE LA HOJA TÉCNICA: NO ☒ SI ☐		
☐ FALTA CAMPO DE APLICACIÓN (Si procede)		
☐ NO MENCIONA PROBLEMA TÉCNICO QUE RESUELVE		
☐ NO HAY RESUMEN DE ETAPAS Y/O ELEMENTOS BÁSICOS		
☐ MODIFICAR EL TITULO		
12.- EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE LA MEMORIA DESCRIPTIVA: (VER ARGUMENTACIÓN EN ÍTEM 15)		
HAY OBSERVACIONES A LA PRESENTACIÓN DE LA MEMORIA DESCRIPTIVA: NO ☒ SI ☐		
☐ NO MENCIONA EL CAMPO DE APLICACIÓN DE LA INVENCION	(Artículo 39 REGLAMENTO)	
☐ NO CITA EL PROBLEMA TÉCNICO QUE LA INVENCION ABORDA	(Artículo 39 REGLAMENTO)	
☐ NO HACE REFERENCIA AL ESTADO DEL ARTE	(Artículo 39 REGLAMENTO)	
☐ NO CITA DOCUMENTOS CON SU NÚMERO DE PUBLICACIÓN (Si procede)	(Artículo 39 REGLAMENTO)	
☐ LA DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION NO ES CLARA	(Artículo 39 REGLAMENTO)	
☐ LA DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION NO PERMITE REPRODUCIR LA	(Artículo 39 REGLAMENTO)	
☐ NO HAY INDICACIÓN DE DEPÓSITO DE MATERIAL BIOLÓGICO (Si procede)	(Artículo 39 REGLAMENTO)	
☐ LA MEMORIA NO INCLUYE, AL MENOS, UN EJEMPLO DE APLICACIÓN	(Artículo 39 REGLAMENTO)	
☐ EL / LOS EJEMPLO(S) NO ESTÁN DETALLADOS	(Artículo 39 REGLAMENTO)	
☐ LOS EJEMPLOS NO CORRESPONDEN A LA MISMA UNIDAD DE INVENCION	(Artículo 39 y 40 REGLAMENTO)	
☐ NO DESCRIBE LOS DIBUJOS (Si procede)	(Artículo 39 REGLAMENTO)	
☐ LAS UNIDADES NO ESTÁN EXPRESADAS EN SISTEMA MÉTRICO DECIMAL	(Artículos 35 REGLAMENTO)	
☐ OTRAS: (VER ÍTEM 15)		
13.- EVALUACIÓN DE LOS DIBUJOS: (VER ARGUMENTACIÓN EN ÍTEM 15)		
HAY OBSERVACIONES A LA PRESENTACIÓN DE LOS DIBUJOS: NO ☒ SI ☐		
☐ LOS DIBUJOS CONTIENEN TEXTOS EXPLICATIVOS		
☐ FALTA CLARIDAD EN LAS LÁMINAS / FIGURAS		
☐ LOS DIBUJOS TIENEN COTAS O FALTA PROPORCIONALIDAD ENTRE LAS PARTES		
☐ OTRAS: (VER ÍTEM 15)		
14.- AMPLIACIÓN DEL CONTENIDO ORIGINAL (Artículo 49 REGLAMENTO): (VER ARGUMENTACIÓN EN ÍTEM 15)		
• AMPLIACIÓN CONTENIDO ORIGINAL MEMORIA DESCRIPTIVA	NO ☒ SI ☐ OTRA ☐	
• AMPLIACIÓN CONTENIDO ORIGINAL DE LAS REIVINDICACIONES	NO ☒ SI ☐ OTRA ☐	

15.- ARGUMENTACIÓN ANÁLISIS PERICIAL (Artículo 83 REGLAMENTO):		SOLICITUD NUMERO:
		2349 - 2008
ITEM	CITAS Y EXPLICACIONES	
6.-	PRONUNCIAMIENTO SOBRE LA PRIORIDAD Pronunciamento en informe pericial. INSTANCIAS DE OPOSICIÓN Oposición: Resumen en informe pericial. Contesta Oposición: Resumen en informe pericial. EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE LAS REIVINDICACIONES: Resumen de las reivindicaciones: El pliego consta de 27 reivindicaciones, estas son: Reivindicación 1: Molécula de anticuerpo quimérico que se une a CD37 humano y caracterizada por: i) Una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N ° 2; ii) Una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID N ° 4; iii) Una cadena pesada constante que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID N ° 24; y iv) Una cadena ligera constante que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID N ° 26. Reivindicación 2: Molécula de anticuerpo quimérico que se une a CD37 humano y caracterizada por: i) Una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N ° 2; ii) Una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID N ° 4; iii) Una cadena pesada constante que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID N ° 28; y iv) Una cadena ligera constante que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID N ° 30. La reivindicación 3 describe una alternativa de la cláusula 2. Reivindicación 4: Molécula de anticuerpo quimérico que se une a CD37 humano y caracterizada por: i) Una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N ° 2; ii) Una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID N ° 4; iii) Una cadena pesada constante que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID N ° 32; y iv) Una cadena ligera constante que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID N ° 34. La reivindicación 5 es una alternativa a la cláusula 5. Las reivindicaciones 7 a 15 corresponden a molécula de ADN porque comprende solamente una región que codifica la región variable de la cadena pesada y ligera de las reivindicaciones anteriores. Las cláusulas 16 a 21 se relacionan con vector de expresión, célula anfitriona y método para producir anticuerpos utilizando los ADN de las cláusulas 7 a 15. Las cláusulas 22 a 24 corresponden reivindicaciones de composición que comprenden las moléculas de anticuerpo anti-CD37. Las cláusulas 25 y 26 describen usos inadecuadamente definidos. La reivindicación 27 describe un método in vitro para suprimir células B que expresan CD37. No existe enlace apropiado: Existen 3 cláusulas independientes de anticuerpos, la reivindicación 1, 2 y 4. En el pliego debe existir una sola reivindicación independiente de cada categoría. Se sugiere redactar una cláusula múltiple con la materia de las reivindicaciones 1, 2 y 4. Las cláusulas 1 a 5 se relaciona una molécula de anticuerpo definida mediante su estructura ya sea la región variable como la región constante. El texto de las cláusulas 6 a 15 está ligado a una parte de las cláusulas 1 a 5, por esta razón, no están ligadas adecuadamente a dichas reivindicaciones. Lo que en el informe pericial se señaló es que anticuerpos quiméricos específicos del fragmento de anticuerpo de unión a antígenos del D 1 podrían superar la actividad inventiva. Sin embargo, como se redactan las cláusulas 6 a 15 no están incorporando las características inventivas. De la misma manera las reivindicaciones 16 a 20 no estarían ligadas a la características nuevas e inventivas de las reivindicaciones 1, 2 y 4. No define claramente la invención: La cláusula 25 en su preámbulo define el "uso de una composición", no obstante, caracterizan un antígeno de superficie celular. Esta cláusula no define ni la composición (caracterizada en las reivindicaciones 22 y 23) ni el uso. Exclusión de Patentabilidad: La cláusula 26 a pesar de tener un preámbulo de uso, tiene exclusión de patentabilidad de acuerdo al artículo 37, letra d, ya que define tratamientos terapéuticos. Falta la palabra CARCTAERIZADO: La cláusula 26 no tiene la palabra caracterizado separando el preámbulo de la caracterización. Unidad de invención: En el estado de la técnica se describe un fragmento de anticuerpo con las regiones variables SEQ ID N ° 2 y 4 (D 1). Sin embargo, en el estado de la técnica no existe descripción de anticuerpos quiméricos ratón/humano con regiones variables (de acuerdo a lo definido en las cláusulas 1, 2 y 4) y no es obvio proponer la actividad de las regiones constantes humanas y variables de ratón allí citadas. De acuerdo al análisis anterior, a juicio de este perito las reivindicaciones 1, 2 y 4 tienen unidad de invención.	

33

	15.- ARGUMENTACIÓN ANÁLISIS PERICIAL (Artículo 83 REGLAMENTO):	SOLICITUD NUMERO: 2349 - 2008
ITEM	CITAS Y EXPLICACIONES	
	ANÁLISIS DE NOVEDAD (Artículo 33 de la Ley) Pronunciamiento sobre el documento D 6 en informe pericial. El análisis de novedad y nivel inventivo se realizará para las cláusulas que cuentan con definir claramente el invento y no estar excluidas de patentabilidad: Reivindicaciones 1 - 5, 22 - 24 y 27. D 1 Este documento describe un anticuerpo anti- CD37 humano de cadena simple scFv, denominado G28-1 y que posee las mismas regiones variables de la cadena ligera y pesada de SEQ ID N ° 2 y 4. En su respuesta a la oposición el solicitante hace notar que existen diferencias entre la estructura de las SEQ ID N ° 2 de la solicitud y la SEQ ID N ° 44 del D 1 y diferencias entre la estructura de SEQ ID N ° 4 de la solicitud y la SEQ ID N ° 45 del D 1. Efectivamente, existen dichas diferencias y por lo tanto, las regiones variables serían novedosas, no obstante, dichas diferencias corresponden a estructuras que se requieren para unir la cadena ligera y pesada de una anticuerpo para formar un scFv. La otra diferencia con la solicitud es que en esta el anticuerpo quimérico que tiene la región Fc humana y la región variable murina. En cambio en el D 1 se describe un anticuerpo de cadena simple scFv G28-1 como una proteína de fusión que cuenta con las regiones CH2 y CH3 de la Fc de inmunoglobulina. La construcción scFv Ig fue producida en el ejemplo 35 y modificados en los ejemplos 64 a 69. El D 1 muestra que las construcciones de G28-1 se unen a CD37 en líneas celulares de linformas B, a BJAB y a células Ramos. También se unen moderadamente a células WIL-2 y en bajos niveles a células Raji y Namalwa (ejemplo 162). El D 1 demuestra que dos de las construcciones scFv Ig inducen apoptosis. En la figura 81 se ilustra que las construcciones scFv Ig son capaces de inhibir la proliferación de células Ramos. Las comparaciones de la actividad de scFv Ig anti CD37 se hacen en relación a un scFv Ig anti CD20 proveniente de un anticuerpo de GENETECH 2H7, distinto a Rituximab como el anticuerpo comparado en la solicitud en estudio. El D 5 se expone sobre la actividad terapéuticamente útil de scFv Ig anti CD37 derivado del anticuerpo G28 descrito en D 1. Si bien la región variable del anticuerpo de la solicitud y el fragmento de anticuerpo del D 1 es el mismo, la solicitud provee anticuerpos quiméricos específicos definidos en las reivindicaciones 1, 2 y 4 por las secuencias de las regiones variables y constantes. A la vista del estado de la técnica citado, las reivindicaciones 1 - 5, 22 - 24 y 27 son nuevas y, por tanto, cumplen con los requerimientos del Artículo 33 de la Ley 19.039. ANÁLISIS DE NIVEL INVENTIVO El documento D 1, que es considerado como el estado de la técnica más relevante, describe una construcción scFv Ig que se une a CD37 humano que tiene las cadenas pesada y ligera de SEQ ID N ° 45 y 46 (Ejemplo 35, 64 - 69 y 162). La materia de la reivindicación 1 difiere tan solo en que es un anticuerpo quimérico anti CD37 con la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada y ligera mostrada en SEQ ID N ° 2 y 4 y cadenas pesadas y ligeras constantes de origen humano que comprenden las regiones constantes pesadas y ligeras seleccionadas de las siguientes secuencias: - SEQ ID N ° 24 y 26 - SEQ ID N ° 28 y 30 - SEQ ID N ° 32 y 34. El problema a resolver por la presente invención se puede considerar por tanto, como proveer una alternativa de anticuerpo quimérico ratón / humano contra CD37. La solución sería un anticuerpo con la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada y ligera mostrada en SEQ ID N ° 2 y 4 y regiones constantes de las cadenas pesadas y ligeras de origen humano que comprenden las regiones constantes pesadas y ligeras seleccionadas de las siguientes secuencias: - SEQ ID N ° 24 y 26 - SEQ ID N ° 28 y 30 - SEQ ID N ° 32 y 34. Esta solución puede considerarse, sin embargo, como que tenga nivel inventivo por las siguientes razones: Si bien el D 2 describe una forma de producción de anticuerpos quiméricos ratón humano, los anticuerpos específicos no son divulgados. La persona del oficio normalmente versada en la materia le resultaría obvio quimerizar D 2 el anticuerpo murino del cual proviene el scFv Ig del D 1, pues no esperaría un comportamiento sorprendente de dicha aplicación, sin embargo, no sería obvio otorgar una quimerización específica con las secuencias constantes SEQ ID N ° 24 y 26, SEQ ID N ° 28 y 30 o SEQ ID N ° 32 y 34, con las propiedades señaladas en la solicitud. La selección realizada por el solicitante no es azarosa ya sea en la elección de Fc como en las sustituciones en la región constante. Los resultados promisorios del invento (ver análisis de la memoria descriptiva) se obtienen específicamente por los anticuerpos quiméricos A2 (SEQ ID N ° 28 y 30), A4 (SEQ ID N ° 32 y 34) y A 0 (SEQ ID N ° 24 y 26). El D 6 presentado por el solicitante con fecha 18/05/2011 apunta a describir los scFvIg anti CD37 descritos en D 1. Este documento tiene evidencias que si bien, no son comparativas con el producto de la solicitud, pueden proveer que los anticuerpos quiméricos A0, A 2 y A 4 son alternativas ventajosas en algunos puntos o solamente una alternativa ya que este documento hace comparaciones de scFv con rituximab que podrían proveer datos comparativos con el anticuerpos quimérico de la invención.	

	15.- ARGUMENTACIÓN ANÁLISIS PERICIAL (Artículo 83 REGLAMENTO):	SOLICITUD NUMERO: 2349 - 2008
ITEM	CITAS Y EXPLICACIONES	
	De acuerdo a lo anterior, los elementos de las reivindicaciones 1, 2 y 4 tendrían nivel inventivo, por ser alternativas concretas con buenas expectativas de solución a un problema no solucionado satisfactoriamente. Las reivindicaciones dependientes 3, 5, 22 - 24, 27 están ligadas a la actividad inventiva de las reivindicaciones 1, 2 y 4. En vista de lo anteriormente dicho la presente solicitud cumple con los requisitos del Artículo 35 de la Ley 19.039 porque las reivindicaciones 1 - 5, 22 - 24 y 27 tienen nivel inventivo. ANÁLISIS DE LA APLICACIÓN INDUSTRIAL La solicitud es susceptible de aplicación industrial, por tanto, cumple con el Artículo 36 de la Ley 19039. Análisis en informe pericial. 11.- EVALUACIÓN DE LA HOJA TÉCNICA Mientras no se superen las observaciones del pliego no es necesario solicitar modificaciones a la hoja técnica. 12.- EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE LA MEMORIA DESCRIPTIVA De acuerdo a lo anterior, la solicitud cuenta con un ejemplo preferido de la invención y suficiencia técnica para su reproducción. Resumen en informe pericial. 14.- AMPLIACIÓN DEL CONTENIDO ORIGINAL Con fecha 22/08/2012 se presenta un nuevo pliego de 27 reivindicaciones, sin presentar ampliación a la divulgación original. De acuerdo con los antecedentes que obran a la fecha en la solicitud 2349 - 2008 y sin perjuicio de la resolución definitiva del Instituto Nacional de Propiedad Industrial, el perito que suscribe recomienda rechazar el derecho solicitado toda vez que la materia cuya protección se solicita no se considera invención quedando excluida de protección por patente conforme a lo que dispone el artículo 37 letra d) de la Ley 19.039.  Amaya-Pulig G. Bioquímico Perito	