

Clarke, Mo

COLOM

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 05-107300- -00009-0000

Fecha: 2010-10-22 15:15:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 412 REPOSPRESRECU Folios: 38

P-699

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E.

S.

D.

Re: Expediente No. 05-107300

Solicitud de patente a nombre de **CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR**

Yo, DILIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la carrera 11 No. 86-53, piso 6, obrando como apoderada sustituta de la sociedad **CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR**, domiciliada en Ciudad de la Habana, Cuba, solicitante de la patente de la referencia, interpongo recurso de reposición contra la resolución No. 50298 del día 22 de Septiembre de 2010, expedida por el Superintendente de Industria y Comercio, por medio de la cual se niega el privilegio de patente para la solicitud contenida en el expediente de la referencia.

1. FUNDAMENTOS DEL RECURSO

1.1 Mi mandante se permite manifestar a ese despacho que se reafirma en todos y cada uno de los argumentos que hacen parte integrante de la respuesta al oficio de fondo No. 4330 notificado por fijación en lista el día 26 de marzo de 2010, presentada ante ese despacho el 3 de junio de 2010.

1.2 El indebido análisis de nivel inventivo.

En esencia fundamento este recurso en el hecho que el examinador no realizó un análisis apropiado del arte previo y niega la solicitud basándose en apreciaciones subjetivas sin el debido sustento técnico, así como en un estudio retrospectivo del arte previo, como se demuestra a continuación:

Como bien afirma el examinador el problema existente en el estado de la técnica antes de la fecha de prioridad de la presente solicitud era que los únicos anticuerpos dirigidos contra ese antígeno eran anticuerpos murinos, como el anticuerpo 14F7, que presentaba tres inconvenientes:

1. Ocasionar reactividad cruzada en humanos,
2. Tener una vida media en sangre corta y
3. Producir una inmoreactividad incrementada.

P-699

Estos tres inconvenientes hacían que dichos anticuerpos murinos no fueran eficientes y no pudieran ser utilizados como base para la fabricación de medicamentos.

De acuerdo con lo expresado por ese Despacho en la Resolución No. 50298, la solicitud de patente EP 0972782, en adelante D1, afecta el requisito de nivel inventivo de la presente solicitud toda vez que describe el anticuerpo monoclonal **murino 14F7**, el cual se une al mismo antígeno, el gangliósido N-glicolil GM3 (NGcGM). Siendo así, es un hecho que las secuencias CDR y el epítipo del anticuerpo eran conocidos. Sumado a lo anterior y según lo reportado por D1, dicho anticuerpo es utilizado para el tratamiento y el diagnóstico de enfermedades neoplásicas, tales como mieloma y cáncer de mama. Además, D1 también suministra una línea celular que produce de manera recombinante el anticuerpo 14F7 y suministra un reactivo de diagnóstico.

Considerando lo expuesto en el párrafo anterior, el examinador concluye que el producto de D1 es muy similar al anticuerpo murino 14F7 y que la diferencia es que la presente solicitud realiza modificaciones o mutaciones puntuales en segmentos de Frs de las cadenas pesada y ligera de dicho anticuerpo murino 14F7, específicamente en 9 posiciones de la cadena pesada y 4 posiciones de la cadena ligera. A pesar de dichas mutaciones, esa Superintendencia hace énfasis en que tal como está caracterizado el anticuerpo posee exactamente las mismas secuencias para las regiones hipervariables (CDRs) de las cadena liviana y pesada del anticuerpo murino 14F7. En consecuencia, el examinador considera que dado que los CDRs son iguales y ellos determinan la especificidad del anticuerpo, el producto reivindicado no difiere del anticuerpo conocido en el estado de la técnica.

Complementando la idea antes señalada, el examinador argumenta que la humanización es una técnica ampliamente conocida y que no es un gran avance en la técnica utilizar la región constante de la cadena pesada IgG1 humana y la región constante de la cadena ligera humana Ck. Adicionalmente, el examinador argumenta que no hay un incremento en la afinidad del anticuerpo de esta solicitud con relación con el anticuerpo murino 14F7.

Otro argumento indicado por ese Despacho destaca el hecho que las mutaciones puntuales realizadas en los Frs del anticuerpo de la invención con el propósito de reducir la inmunogenicidad son 9 mutaciones de la cadena pesada, 5 corresponden a la sustitución conservadora preferida para el aminoácido del anticuerpo murino 14F7, y las 4 mutaciones de la cadena liviana, 1 corresponde a la sustitución conservadora preferida para el aminoácido del anticuerpo murino 14F7. Teniendo en cuenta este hecho, concluye entonces el examinador que los Frs son las regiones intermedias entre los CDRs y no corresponden a regiones

determinantes de la unión al antígeno, por lo que en su concepto los cambios realizados no afectan la inmunogenicidad del anticuerpo, pese a lo expuesto en la reivindicación 3 de la solicitud en estudio, que ahora indica el examinador que no es una característica sustentada en la solicitud.

Finalmente, se establece que la deducción de la secuencia del anticuerpo murino 14F7 tampoco es un aporte al estado de la técnica.

En primer lugar la materia reivindicada en la presente solicitud no es ni la deducción de la secuencia del anticuerpo murino 14F7, ni el anticuerpo murino 14F7, ni los CDRs del anticuerpo murino 14F7 y menos aún, cualquier anticuerpo que comprenda los CDRs del ni el anticuerpo murino 14F7 como mal interpreta ese Despacho. Las reivindicaciones son muy clara en que se pretende protección para un anticuerpo derivado del anticuerpo monoclonal murino 14F7 caracterizado porque las secuencias de las regiones hipervariables (CDRs) de las cadenas pesadas y ligeras se muestran a continuación:

CADENA PESADA

CDR1: SYWIH

CDR2: YIDPATAYTESNQKFKD

CDR3: ESPRLRRGIYYAMDY

CADENA LIGERA

CDR1: RASQSI>NNLH

CDR2: YASQSI

CDR3: QQSNRWPLT

Siendo así, el comentario que la deducción de la secuencia del anticuerpo murino 14F7 tampoco es un aporte al estado de la técnica, es irrelevante pues de ninguna manera el solicitante busca protección para la secuencia de aminoácidos del anticuerpo murino 14F7.

Igualmente, no es correcta la afirmación de que las modificaciones en los Frs no afectan la inmunogenicidad del anticuerpo, porque los CDRs que son las regiones determinantes de la unión al antígeno no están involucrados en la mutación. Respetuosamente le recordamos a ese despacho que es diferente el concepto de "afinidad" de un anticuerpo por el antígeno, el cual es la suma de todas las fuerzas atractivas y repulsivas entre un sitio de unión de ese anticuerpo y el correspondiente epítope mientras que el término "inmunogenicidad" que es entendido como la propiedad que permite a una sustancia inducir una respuesta inmune detectable. Siendo así, es absolutamente posible que dos anticuerpos que tienen CDRs similares conserven la misma afinidad por el epítope pero que cambios en ellos o en los FRs reduzcan la inmunogenicidad del anticuerpo.

Retomando lo establecido en la página 2 de la descripción de la presente solicitud, el anticuerpo 14F7 murino tiene ciertas desventajas para el tratamiento de humanos como el corto tiempo de vida media en sangre, la pérdida de propiedades inmunológicas y la inducción de respuestas inmunes adversas o efectos colaterales luego de aplicaciones seguidas, es decir, el problema a resolver no era cambiar de CDRs para mejorar la afinidad entre el anticuerpo y el antígeno, como erróneamente considera esa Superintendencia. El problema a solucionar era reducir la inmunogenicidad del anticuerpo murino 14F7, lo que significa reducir o evitar la inducción de respuestas inmunes adversas o efectos colaterales luego de aplicaciones seguidas del anticuerpo murino 14F7, lo que elimina sustancialmente la utilidad terapéutica lograda con dicho anticuerpo.

Específicamente, en la página 3 de la presente solicitud se indica que existía la necesidad de obtener versiones de los anticuerpos terapéuticos que sean menos inmunogénicas en humanos, que se obtengan de forma económica y que resulten adecuados para la fabricación de formulaciones terapéuticas y otros usos.

Como se puede corroborar en la columna 4 líneas 13 a 15, *“la presentes solicitud se refiere a un anticuerpo modificado derivado del anticuerpo 14F7, el cual reconoce el antígeno original con igual afinidad y resulta menos inmunogénico cuando es administrado a paciente. Otro hallazgo de la presente invención ha sido la obtención de fragmentos derivados de dicho anticuerpo que comprende regiones variables de cadena ligera diferentes de la original, pero retienen sus propiedades en lo que concierne a especificidad, afinidad, y reconocimiento, y pueden ser expresados por un hospedero bacteriano tanto en forma de moléculas solubles como presentadas en la superficie de fagos filamentosos.”*

Ahora bien, habiendo establecido el problema a solucionar resulta sorprendente que los inventores de la presente solicitud encontraran que la cadena pesada del anticuerpo 14F7 es esencial para las propiedades de reconocimiento específico del antígeno, pero como se muestra en los ejemplos 5-7 pequeños cambios en los fragmentos retienen el reconocimiento original, incluso cuando ellos contienen diferentes cadenas ligeras no relacionadas.

Siendo así, no hay enseñanza ni motivación alguna para que una persona versada en la materia pudiera establecer que precisamente la modificación de los aminoácidos de los CDR y los FRs del anticuerpo 14F7 que se divulgan en la presente invención sería posible obtener un anticuerpo menos inmunogénico como es el anticuerpo quimérico, mencionado en la presente solicitud como 14F7Q, sin que se afectar la afinidad del anticuerpo por su epítope.

Considerando lo establecido por ese Despacho sobre el hecho que la invención se limita a 9 mutaciones de la cadena pesada y a 4 mutaciones de la cadena liviana, la pregunta a responder es porque razón una persona versada en la materia consideraría que es obvio que el anticuerpo 14F7 reportado en D1 debería ser mutado de manera puntual en esos 13 residuos de la secuencia total del anticuerpo para lograr que dicho anticuerpo tuviera una inmunogenicidad reducida.

Dado que es obligación de esa Superintendencia brindar pruebas que permite establecer cuál sería la serie de conocimientos existentes en el estado de la técnica que llevarían de manera obvia a derivar la invención, es necesario que el examinador indique por qué y cómo una persona versada en la materia, antes de la fecha de prioridad de la solicitud en estudio, habría podido tomar las enseñanzas de D1 y entre la totalidad de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo 14F7 habría establecido que no otra sino la combinación de las 13 mutaciones divulgadas en la presente solicitud permitirían obtener un anticuerpo con menor inmunogenicidad que 14F7.

Con todo respeto podemos asegurar que una persona enfrentada al mismo problema podría haber planteado, que una opción para superar las desventajas antes mencionadas era humanizar un anticuerpo murino y sabría cuáles son los CDRs de dicho 14F7 pero no podría haber establecido con dicha información que con unas pocas modificaciones 13 en la totalidad de la secuencia, se podría logra reducir la inmunogenicidad de 14F7.

Es más, dicha persona habría sabido que era altamente posible que cualquier modificación, incluso en sitios diferentes de los CDRs podría afectar la unión sitio-específica requerida para que el anticuerpo de la invención reconozcan y enlacen al gangliósido N- glicolil GM3, esto debido al hecho que aún cuando los CDRs son las regiones que se unen al epítipo del antígeno, en muchas ocasiones se requiere que el anticuerpo se pliegue de una determinada manera y que la estructura cuaternaria de la proteína sea una específica para lograr que los CDRs puedan entrar en contacto con el epítipo y se logre una buena afinidad entre el anticuerpo y el antígeno.

Siendo así, no había manera que una persona versada en la materia hubiese llegado de manera obvia o que le resultara evidentemente derivado del estado de la técnica que la manera de reducir la inmunogenicidad del anticuerpo murino 14F7 era mutando en la cadena pesada el aminoácido Q de la posición 5 por V, el aminoácido N de la posición 9 por A, el aminoácido L de la posición 11 por V, el aminoácido A de la posición 12 por V, el aminoácido M de la posición 18 por V, el aminoácido k de la posición 19 por R, el

aminoácido M de la posición 20 por V, el aminoácido R de la posición 40 por A y el aminoácido D de la posición 42 por G, y mutar en la secuencia de la cadena ligera el aminoácido R de la posición 39 por K, el aminoácido T de la posición 40 por P, el aminoácido H de la posición 41 por G y el aminoácido E de la posición 42 por Q.

Resumiendo lo expuesto y finalizando con los argumentos basados en el contenido del Manual Andino de Patentes, documento no vinculante para esa Oficina pero que constituye una clara guía para la correcta evaluación del nivel inventivo de las solicitudes de patentes a la luz de la Decisión 486, es claro que la invención cumple con el requisito de nivel inventivo pues no todas las respuestas requeridas para el análisis del nivel inventivo son afirmativas.

- ¿Estaba un técnico con conocimientos medios en la materia en condiciones de plantearse el problema? **SI**. Es posible que cualquier persona versada en la materia hubiera pensado en humanizar un anticuerpo murino, como el anticuerpo 14F7.
- ¿De resolverlo en la forma en que se reivindica? **No**. Aún cuando se conocían diferentes anticuerpos humanizados y se habían establecido las secuencias del anticuerpo 14F7, una persona versada en la materia no podido prever cuáles de los sitios de la secuencia del anticuerpo murino podían ser eliminados o remplazados y menos, establecer que justo los 13 reemplazos efectuados por el solicitante serían las secuencias ideales para reducir las desventajas del AcM 14F7, en especial reducir la inmunogenicidad, sin que se afecte negativamente la unión específica anticuerpo-antígeno, es decir su afinidad.
- ¿De prever el resultado? **No**. Pues únicamente el trabajo de los inventores ha llevado a establecer las secuencias específica necesarias para humaniza el anticuerpo 14F7 sin que afinidad por el gangliósido N- glicolil GM3 y se redujera o se eliminara la inmunogenicidad y sin producir efectos secundarios en el paciente.

Dentro de este contexto es importante que ese Despacho puedes considera ahora, luego de conocer la solución aportada por el solicitante que realizar esas 13 mutaciones es sencillo. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que en el momento anterior a la presentación de esta solicitud no se sabía si la solución podría haber estado en insertar un fragmento adicional en los FRs, en eliminar una porción de dichos FRs o en cambiar



por otros aminoácidos o hacer las mutaciones en otras posiciones. Por consiguiente, no era evidente ni saltaba a la vista de la persona versada en la materia que entre todas las posibles mutaciones existentes que se podrían introducir en la secuencia de 14F7, precisamente eran la que el solicitante propone las que solucionarían el problema de inmunogenicidad.

Dado que dos de las tres preguntas establecidas en el análisis problema-solución son negativas, es claro que la presente invención tiene nivel inventivo.

En conclusión, el análisis de nivel inventivo realizado por el señor examinador es claramente el resultado de un análisis del tipo "hindsight". De hecho, este tipo de análisis no es permitido para desvirtuar el concepto de altura inventiva.

En este tipo de análisis, el examinador no enfoca su análisis en el momento en el que el solicitante plantea un problema con el fin de solucionar fallas técnicas existentes en los productos convencionales de un campo técnico específico, sino que se enfoca en la solución dada al problema planteado y en la búsqueda de documentos con conceptos análogos en otros campos de la tecnología. A este respecto dirijo la atención del examinador al *"Manual para Examen de Solicitudes de Patentes de Invención en las Oficinas de Propiedad Industrial de los Países de la Comunidad Andina"*, publicado en la página Web de la Comunidad Andina, donde se establece en la página 74 en cuanto al nivel inventivo *"...que la búsqueda de anterioridades se efectúa a posteriori, tomando como punto de partida la misma invención, ...el examinador debe realizar el esfuerzo intelectual de colocarse en la situación que ha tenido que afrontar el técnico con conocimientos medios en la materia en un momento en que la invención no era conocida, es decir antes de la invención"*. (el subrayado es mío)

En el presente caso, para el examinador puede resultar "obvio" que el objeto de la presente solicitud se derive de la materia objeto de los documentos citados, sin dar mayor importancia al trabajo desplegado y a la capacidad inventiva del solicitante para lograr llegar a la solución del problema planteado. Es decir, que el examinador no hace su análisis partiendo del problema mismo que existía en la técnica en el momento en que el solicitante dirige todos sus esfuerzos para encontrar una solución, sino que enfoca su estudio en el momento en que el problema ya fue resuelto.

1.3 Concesión de la solicitud en otros países.

Sea esta la oportunidad para llamar la atención del solicitante sobre el hecho que otros examinadores que han revisado la solicitud han reconocido el nivel



Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

8

inventivo de la misma. Sabemos que de acuerdo con el Convenio de París los países son independiente de conceder o no una solicitud. No obstante, el requisito de nivel inventivo, que es la causal por la cual se niega la presente solicitud y es el mismo en todos los países de dicho Convenio, ha sido ya reconocido por examinadores de Australia, Lituania, Latvia, y Rusia. Anexamos copia de dichas concesiones. Igualmente, informamos que la solicitud fue concedida en Perú, Albania, Macedonia, Georgia, Mongolia, Nueva Zelanda, Sudáfrica y Singapur.

Teniendo en cuenta lo dicho anteriormente, solicito a usted lo siguiente:

- a) Que de conformidad con lo previsto por los artículos 3 (inciso 3); 35 (inciso 2) y 59 (inciso 2) del Código Contencioso Administrativo se consideren y se resuelvan TODOS los argumentos y TODAS las cuestiones planteadas así como las que aparezcan con motivo de este recurso.
- b) Que se revoque la resolución No. 50298 del 22 de septiembre de 2010 expedida por el Superintendente de Industria y Comercio, y se proceda a conceder el privilegio de patente de invención a la solicitud de mi mandante

Señor Superintendente,

DILIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

CC. 41.654.882 de Bogotá

TP 20824

Cód. 008



4

PRESENTACION PERSONAL

El anterior escrito fue presentado ante el
NOTARIO DON DEL CIRCULO DE SOCOTA, D.C.
personalmente por Blanca Rodriguez
Blanca Rodriguez
quien exhibió la c.c. 41654882 B.12
y Tarjeta Profesional No. 22 OCT 2010

Fecha

[Handwritten signature]
Guillermo Cristancho
NOTARIO
COLOMBIA
Guillermo Cristancho
NOTARIO DEL CIRCULO DE SOCOTA D.C.



ЕВРАЗИЙСКАЯ ПАТЕНТНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
ЕВРАЗИЙСКОЕ ПАТЕНТНОЕ ВЕДОМСТВО

ЕВРАЗИЙСКИЙ ПАТЕНТ

№ 008353

Название изобретения:

«РЕКОМБИНАНТНЫЕ АНТИТЕЛА И ФРАГМЕНТЫ, УЗНАЮЩИЕ N-ГЛИКОЛИЛ GM3 ГАНГЛИОЗИД И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ДИАГНОСТИКЕ И ЛЕЧЕНИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОДЕЙ»

Патентовладелец (льцы):

СЕНТРО ДЕ ИМУНОЛОГИЯ МОЛЕКУЛАР (СУ)

Изобретатель (и):

Роке Наварро Лоудес Татьяна, Матео Де Акоста Дени, Рива Кристина Мария, Родригес Гонсалес Мабель, Рокас Дорантес Гертрудис, Талавера Перес Арьель, Морено Фриас Эрнесто (СУ)

Заявка №:

200501653

Приоритет изобретения:

23 апреля 2003 г.

Дата подачи заявки:

22 апреля 2004 г.

Дата выдачи патента:

27 апреля 2007 г.

Настоящим удостоверяется, что евразийский патент выдан на изобретение, изложенное в прилагаемом описании и формуле изобретения.

При уплате установленных годовых пошлин патент действует на территории государств-участников Евразийской патентной конвенции – Азербайджанской Республики, Кыргызской Республики, Республики Армения, Республики Беларусь, Республики Казахстан, Республики Молдова, Республики Таджикистан, Российской Федерации, Туркменистана.

ГРИГОРЬЕВ Александр Николаевич
Президент Евразийского патентного ведомства

Специфичность связывания подтверждена посредством ELISA в соответствии с описанным способом с применением в качестве покрывающего слоя и допосле к N-гликоли GM3 и N-ацетила GM1 панели связанных галлиозидов, включающую в себя различные N-ацетилированные галлиозиды и один N-гликолипроваинный галлиозид. На фиг. 7 показано распознавание различных антигенов 5 клонными, продуцирующими охарактеризованные фрагменты антитела. Обнаружили связывание только с антигеном-мишенью N-гликоли GM3.

Продукцию клонами растворимых фрагментов антител (вне контекста фагов) индуцировали в присутствии изонипил-тиогалактопиранозид и концентрации 1 мМ/л. Собирали супернатант и получали периплазматические фракции в соответствии с установленными процедурами (de Haard, H. J. Biol. Chem. 274, 18218-18230, 1999). Распознающую активность N-гликоли GM3 определяли в супернатантах культур и в периплазматических фракциях при помощи ELISA на планшетах, покрытых иллекуноминутым антигеном, сходным с описанным антигеном, но с последующей модификацией. Фрагменты связывающих антител определяли с применением моноклонального антитела 1E10 (направленного против периплазматического, слитого с фрагментами антител в генетическую конструкцию) в концентрации 10 мкг/мл и конъюгата иммуноглобулинов против мышиных иммуноглобулинов (Sigma, USA). Фрагменты антител из периплазматических фракций очищали с применением одной аффинной хроматографии с новыми методами, применяя в качестве матрицы HIS-Select HC Nickel Affinity Gel (Sigma, USA) в соответствии с инструкциями производителя. На фиг. 8 показана активность очищенных растворимых фрагментов, определенная посредством ELISA.

Краткое описание фигур

Фиг. 1: показана аминокислотная последовательность вариабельных областей VH (a) и VK (b) Mab 14F7 и соответствующая человеческая последовательность с наибольшей степенью гомологии CDR подчеркнуты, а гипервариабельные области и потенциальные T-эпитопы заштрихованы. Также приведена полученная в результате гуманизации последовательность вариабельных областей с произведенными мутациями.

Фиг. 2: распознавание антитела 14F7Q мерили посредством конкурентного ELISA. Ось X отображены концентрации антител. Ось Y: поглощение, измеренное при 492 нм. В качестве отрицательного контроля применяли моноклональное антитело IgG25.

Фиг. 3: эффект моноклонального антитела 14F7 на рост мышиных опухолей (меланомная опухоль в клеточная линия B16).

Фиг. 4: А) иммуногистохимическое исследование эффекта моноклонального антитела 14F7 на формирование кровеносных сосудов, стрелки указывают сосуды с иммунным окрашиванием; В) ингибирование ангиогенеза, индуцированное моноклональным антителом 14F7.

Фиг. 5: диаграмма вектора pHG-1m.

Фиг. 6: белковая последовательность областей VL моноклонального антитела 14F7 и отображение одноцепочечные фрагменты Fv. Точки указывают гомологию с последовательностями VL 14F7.

Фиг. 7: специфичность распознавания фагами, несущими фрагменты антител. Наблюдали ингибирование связывания Ab 14F7 с галлиозидом экспонированными на фагах фрагментами. Планшеты покрывали N-гликоли GM3, фаги инкубировали с лирунными частицами в различных концентрациях 14F7.

Фиг. 8: распознавание N-гликоли GM3 очищенными растворимыми фрагментами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекombinantное антитело, полученное из мышиного моноклонального антитела 14F7, продуцируемое гибридомой с нивентарным номером ECACC 98101901, характеризующее последовательностями гипервариабельных областей (CDR) тяжелой и легкой цепей, приведенных ниже

ТЯЖЕЛАЯ ЦЕПЬ

CDR1: SYWIII
CDR2: YIDPATAYTESNQKFKD
CDR3: ESPRLKRGIIYYAMDY

ЛЕГКАЯ ЦЕПЬ

CDR1: RASQISNNLIH
CDR2: YASQIS
CDR3: QQSNRWPLT

2. Антитело по п.1, отличающееся тем, что является химерным вариантом антитела 14F7, содержащим CDR и каркасные области (FR) тяжелой и легкой цепей указанного антитела 14F7, константную область тяжелой цепи человеческого IgG1, константную область легкой цепи с указанными ниже последовательностями каркасных областей (FR) тяжелой и легкой цепей

ТЯЖЕЛАЯ ЦЕПЬ

FR1: QVQLQQSGNELAKPGASMKMSCRASGYSFT
FR2: WLKQRPDQGLEWIG
FR3: KAILTADRSSNTAFMYLNSLTSEDSAVYYCAR

FR4: WGQGTTVTVSS
 ЛЕГКАЯ ЦЕПЬ
 FR1: DLVLTQSPATLSVTPGDSVSFSC
 FR2: WYQQRTHIESPRLLIK
 FR3: GIPSRFSGSGSGTDFTLSISVETEDFGMYFC
 FR4: FGAGTKLELKRA

3. Антитело по п.1 и 2, отличающееся тем, что является гуманизированным вариантом моноклонального антитела 14F7, содержащим точечные мутации в каркасных областях (FR) тяжелой и легкой цепей для снижения иммуногенности.

4. Антитело по п.3, отличающееся тем, что является гуманизированным вариантом моноклонального антитела 14F7, каркасные области тяжелой и легкой цепей которого содержат любые из указанных ниже мутаций:

ТЯЖЕЛАЯ ЦЕПЬ:

Позиция 5 Q вместо V
 Позиция 9 N вместо A
 Позиция 11 L вместо V
 Позиция 12 A вместо V
 Позиция 18 M вместо V
 Позиция 19 K вместо R
 Позиция 20 M вместо V
 Позиция 40 R вместо A
 Позиция 42 D вместо G

ЛЕГКАЯ ЦЕПЬ:

Позиция 39 R вместо K
 Позиция 40 T вместо P
 Позиция 41 H вместо G
 Позиция 42 E вместо Q

5. Одноцепочечный фрагмент Fv, полученный из мышиного моноклонального антитела 14F7, протипурусного гибридомой с инвентарным номером ECACC 98101901, отличающийся тем, что содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи мышиного моноклонального антитела 14F7 и вариабельную область легкой цепи мышиного антитела.

6. Одноцепочечный фрагмент Fv по п.5, отличающийся тем, что вариабельная область легкой цепи представляет собой само антитело 14F7.

7. Одноцепочечный фрагмент Fv по п.6, отличающийся тем, что последовательности гипервариабельных областей (CDR) тяжелой и легкой цепей представляют собой последовательности, указанные ниже:

ТЯЖЕЛАЯ ЦЕПЬ

CDR1: SYWH
 CDR2: YIDPATAYTESNQKFKD
 CDR3: ESPRLRRGIYYAMDY

ЛЕГКАЯ ЦЕПЬ

CDR1: RASQISNNLN
 CDR2: YASQIS
 CDR3: QQSNRWPLT

8. Одноцепочечный фрагмент Fv по п.7, отличающийся тем, что содержит гипервариабельные области (CDR) и каркасные области (FR) тяжелой и легкой цепей указанного антитела 14F7, последовательности каркасных областей (FR) тяжелой и легкой цепей которого представляют собой указанные ниже:

ТЯЖЕЛАЯ ЦЕПЬ

FR1: QVQLQQSGNELAKPGASMKMSCRASGYST
 FR2: WLKQRPDQGLEWIG
 FR3: KAILTADRSSNTAFMYLNSLTSEDSAVYYCAR
 FR4: WGQGTTVTVSS

ЛЕГКАЯ ЦЕПЬ

FR1: DLVLTQSPATLSVTPGDSVSFSC
 FR2: WYQQRTHIESPRLLIK
 FR3: GIPSRFSGSGSGTDFTLSISVETEDFGMYFC
 FR4: FGAGTKLELKRA

9. Одноцепочечный фрагмент Fv по п.8, который содержит точечные мутации каркасных областей (FR) тяжелой и легкой цепей для снижения иммуногенности.

10. Одноцепочечный фрагмент Fv по п.9, каркасные области тяжелой и легкой цепей которого содержат любые из указанных ниже мутаций:

ТЯЖЕЛАЯ ЦЕПЬ:

Позиция 5 Q вместо V
 Позиция 9 N вместо A
 Позиция 11 L вместо V
 Позиция 12 A вместо R
 Позиция 18 M вместо V
 Позиция 19 K вместо R
 Позиция 20 M вместо V
 Позиция 40 R вместо A
 Позиция 42 D вместо G

ЛЕГКАЯ ЦЕПЬ:

Позиция 39 R вместо K
 Позиция 40 T вместо P
 Позиция 41 H вместо G
 Позиция 42 E вместо Q

11. Одноцепочечный фрагмент Fv по п.5, полученный из мышиного моноклонального антитела 14F7, продуцируемого гибридомой с инвентарным номером ЕСАСС 98101901, отличающийся тем, что содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи моноклонального антитела 14F7 и вариабельную область легкой цепи, последовательности которых представлены собой указанные ниже:

Fr1

D I V M F Q S P A S L A V S L G Q R A T I S C

CDR1

R A S Q S V S S S S Y S Y M H

Fr2

W Y Q Q K P G O P P K L L I K

CDR2

Y A S N L E S

Fr3

G V P A R F S G S G S G T D F T L N I H P V E E D A A T Y Y C

CDR3

Q H S R D V P L T F

Fr4

G A G T K L E I K

12. Одноцепочечный фрагмент Fv по п.5, полученный из мышиного моноклонального антитела 14F7, продуцируемого гибридомой с инвентарным номером ЕСАСС 98101901, отличающийся тем, что содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи мышиного моноклонального антитела 14F7 и вариабельную область легкой цепи, последовательности которых представлены собой указанные ниже:

Fr1

D I Q M T Q T P S S L S A S L G D R V T I S C

CDR1

R A S Q D I S N Y L N

Fr2

W Y Q Q K P D G T V K L L I V

CDR2

Y T S R L H S

Fr3

G V P S R F S G S G S G T D Y S L T I S N L E Q E D I A T Y F C

CDR3

Q Q G N T L P P T F

Fr4

G A G T K L E L K

13. Одноцепочечный фрагмент Fv, полученный из мышиного моноклонального антитела 14F7, продуцируемого гибридомой с инвентарным номером ECACC 98101901, отличающийся тем, что содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи мышиного моноклонального антитела 14F7 и вариабельную область легкой цепи антитела человека.

14. Одноцепочечный фрагмент Fv по п.13, отличающийся тем, что содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи мышиного моноклонального антитела 14F7 и вариабельную область легкой цепи, последовательность которого представляет собой указанное ниже:

Fr1

D I Q M T Q T P S S L S A S V G D R V T I T C

CDR1

R A S Q S I S S F L N

Fr2

W Y Q Q K P G K A P K L L I Y

CDR2

A A S N L Q S

Fr3

G V P S R F S G R G S G T D F T L T I S S L O P E D F A A Y Y C

CDR3

Q Q G Y T T P L T F

Fr4

G Q G T K L E L K

15. Одноцепочечный фрагмент Fv по п.13, отличающийся тем, что содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи мышиного моноклонального антитела 14F7 и вариабельную область легкой цепи, последовательность которого представляет собой указанное ниже:

Fr1

Q S V V T Q P P S A S G G P G Q S L T I S C

CDR1

T G T S S O V G G Y N H V S

Fr2

W Y Q Q H P G K A P K L M I Y

CDR2

D V S K R P S

Fr3

G V P H R F S G S K S G N T A S L T V S G L Q A E O E A V Y Y C

CDR3

S S Y A G S N N L V F

Fr4

G G G T K V T V L

16. Одноцепочечный фрагмент Fv по п.13, отличающийся тем, что содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи мышиного моноклонального антитела 14F7 и вариабельную область легкой цепи, последовательность которой представлена собой указанное ниже:

Fr1

S S E L T Q D P A V S V A L G Q T V R I T C

CDR1

Q G D S L R S Y Y A S

Fr2

W Y Q Q K P G Q A P V L V I Y

CDR2

G K N N R P S

Fr3

G I P D R F S G S S S G N T A S L T I T G A Q A E D E A D Y Y C

CDR3

N S R D S S G N H V V F

Fr4

G G G T K L T V L

17. Клеточная линия, отличающаяся тем, что экспрессирует рекомбинантное антитело по любому из пп.1-4.

18. Клеточная линия, отличающаяся тем, что экспрессирует одноцепочечный фрагмент Fv по любому из пп.5-16.

19. Фармацевтическая композиция для лечения злокачественных опухолей, отличающаяся тем, что содержит рекомбинантное антитело по любому из пп.1-4.

20. Фармацевтическая композиция для лечения злокачественных опухолей, отличающаяся тем, что содержит одноцепочечный фрагмент Fv по любому из пп.5-16 и соответствующий наночастицы.

21. Применение фармацевтической композиции по п.19 для лечения злокачественных опухолей.

лочной железы, и меланом, и их метастазов и рецидивов.

22. Применение фармацевтической композиции по п.20 для лечения злокачественных опухолей молочной железы, и меланом, и их метастазов и рецидивов.

23. Реагент для определения локализации и идентификации *in vivo* злокачественных опухолей, отличающийся тем, что содержит рекомбинантное антитело по любому из пп.1-4 и соответствующий маркер.

24. Реагент по п.23, отличающийся тем, что может использоваться для определения локализации и идентификации *in vivo* злокачественных опухолей молочной железы, и меланом, и их метастазов и рецидивов.

25. Реагент для определения локализации и идентификации *in vivo* злокачественных опухолей, отличающийся тем, что содержит одноцепочечный фрагмент Fv по любому из пп.5-14 и соответствующий маркер.

26. Реагент по п.25, отличающийся тем, что может использоваться для определения локализации и идентификации *in vivo* злокачественных опухолей молочной железы, и меланом, и их метастазов и рецидивов.

А)

	10	20	30	40	50	60
VH 14C7	OYQLOQSGNELAKPGASMKMSCRASGYSYKINHLKORPDGLENIGY10PATAYTESNOKF					
VH человека	.T..V...A.VR....VRV...K...T.10SY...TR.A.GH...V.W.H.NSGG.NYAPR.					
VH 14C7ht	...Q...A.VV....VRV.....R.A.G....V.....					

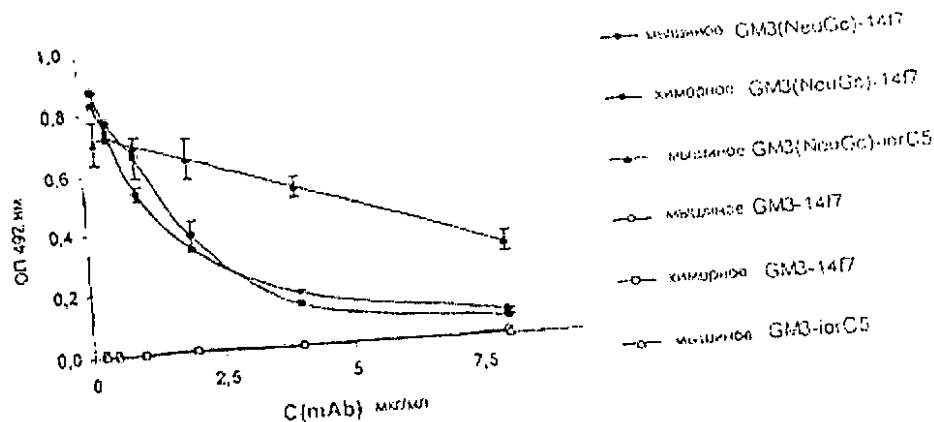
	70	80	90	100	110
VH 14C7	KDKAILYADRSSHTATFYLLSLTSEDSAVYYCARESP---RLANGIYYTMDYKCGSTVSS				
VH человека	CGAVTH.R.A.FS...Y.D.R...R.D....F...KSD.FWGDYYNFD.S.TL.V.....				
VH 14C7ht					

Б)

	10	20	30	40	50	60
VK 14C7	DLVLTOSPATLSVTFGDSVSFGSRKATETAMTBYWCOETHESPRDITATHEVUSKQKKA					
VK человека	.IQM.2...SS...ASV.BR.TIT...2T...SY.D...ZZKPGKA.H...YA...BLH...V.....					
VK 14C7ht						

	70	80	90	100
VK 14C7	...DFTLSITISVETEDFGMYFCQSHRWPLTFGAGTKLELKRA			
VK человека	...B...FT.S.LZPZB.AT.Y.ZZ.Y.S.T...Z...R.ZI...			
VK 14C7ht				

Фиг. 1



Фиг. 2

8. A single chain Fv fragment according to claim 4, wherein the sequence of the light chain is shown below:
FR1: Q S V V T Q P P S A S G G P G Q S L T I S C
CDR1: T G T S S D V G G Y N H V S
5 FR2: W Y Q Q H P G K A P K L M I Y
CDR2: D V S K R P S
FR3: G V P H R F S G S K S G N T A S L T V S G L Q A E D E A V Y Y C
CDR3: S S Y A G S N N L V F
FR4: G G G T K V T V L.
10
9. A single chain Fv fragment according to claim 4, wherein the sequence of the light chain is shown below:
FR1: S S E L T Q D P A V S V A L G Q T V R I T C
CDR1: Q G D S L R S Y Y A S
15 FR2: W Y Q Q K P G Q A P V L V I Y
CDR2: G K N N R P S
FR3: G I P D R F S G S S S G N T A S L T I T G A Q A E D E A D Y Y C
CDR3: N S R D S S G N H V V F
FR4: G G G T K L T V L.
20
10. A cell line expressing a chimeric antibody of any one of claims 1 to 3.
11. A cell line which is capable of expressing a single chain Fv fragment of any one of claims 4 to 9.
- 25 12. A pharmaceutical composition for the treatment of malignant tumors, wherein said composition includes a chimeric antibody of any one of claims 1 to 3.
13. A pharmaceutical composition for the treatment of malignant tumors, wherein said composition includes a single chain Fv fragment of any one of claims 4 to 9, and an appropriate excipient.
30
14. Use of a pharmaceutical composition of claim 12 or claim 13 for the treatment of malignant breast tumors and melanomas and their metastases and recurrences.
35
15. A reagent for the *in vivo* localization and identification of malignant tumors, wherein said reagent includes a recombinant antibody of any one of claims 1 to 3, or a single chain Fv fragment of any one of claims 4 to 9, and an appropriate marker.
- 40 16. A chimeric antibody according to claim 1, substantially as herein described with reference to any one or more of the examples and/or figures.

W:\documents\2004232391\2004232391\2004232391\2004232391.doc

2004232391 01 Oct 2008

27

17. A single chain Fv fragment according to claim 4, substantially as herein described with reference to any one or more of the examples and/or figures.

5

W:\sp\mex\claw\200806-200810\157167 - Claims Cover Copy.doc

Latvijas patents uz izgudrojumu
1995.g. 30.marta Latvijas Republikas likums

Īsziņas

②①	Pieteikuma numurs:	P-05-152	⑦③	Īpašnieks(i):	CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR; Calle 216 Esq. 15, Atabey, Playa, 12100 Ciudad de La Habana, CU
②②	Pieteikuma datums:	22.11.2005	⑦②	Izgudrotājs(i):	Loudes Tatiana ROQUE NAVARRO (CU), Cristina María MATEO DE ACOSTA DEL RIO (CU), Mabel RODRIGUEZ GONZALEZ (CU), Gertrudis ROJAS DORANTES (CU), Ariel TALAVERA PEREZ (CU), Ernesto MORENO FRIAS (CU)
④①	Pieteikuma publikācijas datums:	20.04.2006	⑦④	Pilnvarotais vai pārstāvis:	Armins PĒTERSONS, Aģentūra "PĒTERSONA PATENTS", p/k 61, Rīga LV-1010, LV
④⑤	Patenta publikācijas datums:	20.09.2006			
③③	Prioritāte:	2003-0092 23.04.2003 CU			
⑧⑥	PCT pieteikums:	PCT/CU2004/000006, 22.04.2004			
⑧⑦	PCT publikācija:	WO2004/094477, 04.11.2004			

⑤④ Virsraksts: REKOMBINANTAS ANTIVIELAS UN FRAGMENTI, KAS PAZĪST N-GLIKOLIL-GM3
GANGLIOZĪDU, UN TO IZMANTOŠANA AUDZĒJU DIAGNOSTIKĀ UN ĀRSTĒŠANĀ⑤⑦ Kopsavilkums: Izgudrojums attiecas uz monoklonālu antivielu, kas pazīst antigēnus, kuri satur vienīgi N-
glikolil-GM3-ganglioziādu un nekādu citu N-glikolil- vai N-acētiltipa ganglioziādu vai sulfatētus glikolipidus. Izgudrojums
konkrēti apraksta peptīdu secības, kas kodē no antivielas 14F7 atvasinātu rekombinantu monoklonālu antivielu, kas
pazīst N-glikolil-GM3-ganglioziādu vai no tā atvasinātus fragmentus, kurus var izmantot krūts vēža un melanomas
diagnostikā un terapijā.

IZGUDROJUMA FORMULA

1. Rekombinanta antivielā, kas atvasināta no hibrīdomas ar depozitārja numuru ECACC 98101901 producētas peles monoklonālās antivielas 14F7, kas raksturīga ar šādām smagās un vieglās virknes hipervariablo apgabalu (CDR) secībām:

SMAGĀ VIRKNE:
 CDR1: SYWIH
 CDR2: YIDPATAYTESNQKFKD
 CDR3: ESPRLRRGIYYAMDY
 VIEGLĀ VIRKNE:
 CDR1: RASQISISNNLH
 CDR2: YASQISIS
 CDR3: QQSNRWPLT
2. Antivielā saskaņā ar 1. punktu, raksturīga ar to, ka tā ir antivielas 14F7 himē-risks variants, kas satur minētās antivielas 14F7 smagās un vieglās virknes CDR un ietvarapgabalus (FR) un cilvēka IgG1 smagās virknes konstanto apga-balū un cilvēka Ck vieglās virknes konstanto apgabalu ar šādām smagās un vieglās virknes ietvarapgabalu (FR) secībām:

SMAGĀ VIRKNE:
 FR1: QVQLQQSGNELAKPGASMKMSCRASGYSFT
 FR2: WLKQRPDQGLEWIG
 FR3: KAILTADRSSNTAFMYLNSLTSEDSAVYYCAR
 FR4: WGQGTITVTVSS
 VIEGLĀ VIRKNE:
 FR1: DLVLTQSPATLSVTPGDSVSFSC
 FR2: WYQQRTHESPRLLIK
 FR3: GIPSRFSGSGSGTDFTLTIISVETEDFGMYFC
 FR4: FGAGTKLELKRA
3. Antivielā saskaņā ar 1. vai 2. punktu, raksturīga ar to, ka tā ir monoklonālās anti-vielas 14F7 humanizēts variants, kas satur punktveida mutācijas smagās un vieg-lās virknes ietvarapgabalos (FR), lai samazinātu tās imunogenitāti.
4. Antivielā saskaņā ar 3. punktu, raksturīga ar to, ka tā ir monoklonālās anti-vielas 14F7 humanizēts variants, kuras smagās un vieglās virknes ietvarapga-bali satur jebkuru no šādām mutācijām:

SMAGĀ VIRKNE:
 pozīcija 5: V vietā Q
 pozīcija 9: A vietā N

- pozīcija 11: V vietā L
 pozīcija 12: V vietā A
 pozīcija 18: V vietā M
 pozīcija 19: R vietā K
 5 pozīcija 20: V vietā M
 pozīcija 40: A vietā R
 pozīcija 42: G vietā D
 VIEGLĀ VIRKNE:
 pozīcija 39: K vietā R
 10 pozīcija 40: P vietā T
 pozīcija 41: G vietā H
 pozīcija 42: Q vietā E
5. Vienpavediena Fv fragments, kas atvasināts no hibrīdomas ar depozitārija
 15 numuru ECACC 98101901 producētas peles monoklonālās antivielas 14F7,
 raksturīgs ar to, ka tas satur peles monoklonālās antivielas 14F7 smagās
 virknes variablo apgabalu un peles antivielas vieglās virknes variablo
 apgabalu.
- 20 6. Vienpavediena Fv fragments saskaņā ar 5. punktu, raksturīgs ar to, ka
 vieglās virknes variablais apgabals ir pati antiViela 14F7.
7. Vienpavediena Fv fragments saskaņā ar 6. punktu, raksturīgs ar to, ka
 smagās un vieglās virknes hipervariablo apgabalu (CDR) secības ir šādas:
 25 SMAGĀ VIRKNE:
 CDR1: SYWIH
 CDR2: YIDPATAYTESNOKFKD
 CDR3: ESPRLRRGIYYAMDY
 VIEGLĀ VIRKNE:
 30 CDR1: RASQSI>NNLH
 CDR2: YASQSI
 CDR3: QQSNRWPLT
8. Vienpavediena Fv fragments saskaņā ar 7. punktu, raksturīgs ar to, ka tas
 35 satur minētās antivielas 14F7 smagās un vieglās virknes CDR un ietvarapga-
 balus (FR), kuru smagās un vieglās virknes ietvarapgabalu (FR) secības ir
 šādas:
 SMAGĀ VIRKNE:
 FR1: QVQLQQSGNELAKPGASMKMSCRASGYSFT
 40 FR2: WLKQRPDQGLEWIG
 FR3: KAILTADRSSNTAFMYLNSLTSEDSAVYYCAR

FR4: WGQGTTVTVSS
 VIEGLĀ VIRKNE
 FR1: DLVLTQSPATLSVTPGDSVSFSC
 FR2: WYQQRTHESPRLLIK
 5 FR3: GIPSRFSGSGSGTDFTLSIISVETEDFGMYFC
 FR4: FGAGTKLELKRA

9. Vienpavediena Fv fragments saskaņā ar 8. punktu, kas satur smagās un
 10 vieglās virknes ietvarapgabalu (FR) punktveida mutācijas, lai samazinātu tā
 imunogenitāti.

10. Vienpavediena Fv fragments saskaņā ar 9. punktu, kura smagās un vieglās
 virknes ietvarapgabali satur jebkuru no šādām mutācijām:

SMAGĀ VIRKNE:

15 pozīcija 5: V vietā Q
 pozīcija 9: A vietā N
 pozīcija 11: V vietā L
 pozīcija 12: V vietā A
 pozīcija 18: V vietā M
 20 pozīcija 19: R vietā K
 pozīcija 20: V vietā M
 pozīcija 40: A vietā R
 pozīcija 42: G vietā D

VIEGLĀ VIRKNE:

25 pozīcija 39: K vietā R
 pozīcija 40: P vietā T
 pozīcija 41: G vietā H
 pozīcija 42: Q vietā E

30 11. Vienpavediena Fv fragments, kas atvasināts no hibrīdomas ar depozitārija
 numuru ECACC 98101901 producētas peles monoklonālās antivielas 14F7,
 saskaņā ar 5. punktu, raksturīgs ar to, ka tas satur monoklonālās antivielas
 14F7 smagās virknes variablā apgabala secību un vieglās virknes variablo
 apgabalu, kura secība ir šāda:

35

Fr1

D I V M F Q S P A S L A V S L G Q R A T I S C

CDR 1

R A S Q S V S S S S Y S Y M H

2A

Fr2

WYQQKPGQPPKLLIK

CDR 2

YASNLES

5 Fr3

GVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYC

CDR 3

QHSRDVPLTF

Fr4

GAGTKLEIK

10

12. Vienpavediena Fv fragments, kas atvasināts no hibridomas ar depozitārija numuru ECACC 98101901 producētas peles monoklonālās antiviēlas 14F7, saskaņā ar 5. punktu, raksturīgs ar to, ka tas satur monoklonālās antiviēlas 14F7 smagās virknes variablā apgabala secību un vieglās virknes variablu apgabalu, kura secība ir šāda:

15

Fr1

DIQMTQTPSSLSASLGDRVITISC

20 CDR 1

RASQDISNYLN

Fr2

WYQQKPDGTVKLLIV

CDR 2

YTSRLHS

25

Fr3

GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFC

CDR 3

QQGNTLPPTF

30 Fr4

GAGTKLELK

22

13. Vienpavediena Fv fragments, kas atvasināts no hibrīdomas ar depozitārija numuru ECACC 98101901 producētas peles monoklonālās antivielas 14F7, raksturīgs ar to, ka tas satur peles monoklonālās antivielas 14F7 smagās virknes variablā apgabala secību un cilvēka antivielas vieglās virknes variablu apgabalu.

5

14. Vienpavediena Fv fragments saskaņā ar 13. punktu, raksturīgs ar to, ka tas satur peles monoklonālās antivielas 14F7 smagās virknes variablā apgabala secību un vieglās virknes variablu apgabalu, kura secība ir šāda:

10

Fr1

D I Q M T Q T P S S L S A S V G D R V T I T C

CDR 1

R A S Q S I S S F L N

15 Fr2

W Y Q Q K P G K A P K L L I Y

CDR 2

A A S N L Q S

Fr3

G V P S R F S G R G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A A Y Y C

20

CDR 3

Q Q G Y T T P L T F

Fr4

G Q G T K L E L K

25

15. Vienpavediena Fv fragments saskaņā ar 13. punktu, raksturīgs ar to, ka tas satur peles monoklonālās antivielas 14F7 smagās virknes variablā apgabala secību un vieglās virknes variablu apgabalu, kura secība ir šāda:

30 Fr1

Q S V V T Q P P S A S G G P G Q S L T I S C

CDR 1

T G T S S D V G G Y N H V S

Fr2
WYQQHPGKAPKLMIY

CDR 2
DVSKRPS

5 Fr3
GVPHRFSGSKSGNTASLTVSGLQAEDAEAVYYC

CDR 3
SSYAGSNNLVF

Fr4
GGGTKVTVL
10

16. Vienpavediena Fv fragments saskaņā ar 13. punktu, raksturīgs ar to, ka tas satur peles monoklonālās antivielas 14F7 smagās virknes variablā apgabala secību un vieglās virknes variablo apgabalu, kura secība ir šāda:
15

Fr1
SSELTQDPAVSV ALGQTVRITC

CDR 1
QGDSLRSYYAS
20

Fr2
WYQQKPGQAPVLVIY

CDR 2
GKNNRPS

25 Fr3
GIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDAEADYYC

CDR 3
NSRDS SGNHVVF

Fr4
GGGTKLTVL
30

17. Šūnu līnija, kas raksturīga ar rekombinantās antivielas saskaņā ar jebkuru punktu no 1. līdz 4. punktam ekspresēšanu.

18. Šūnu līnija, kas raksturīga ar vienpavediena Fv fragmenta saskaņā ar jebkuru punktu no 5. līdz 16. punktam ekspresēšanu.
- 5 19. Farmaceitiska kompozīcija ļaundabīgu audzēju ārstēšanai, raksturīga ar to, ka tā satur rekombinanto antivielu saskaņā ar jebkuru punktu no 1. līdz 4. punktam.
- 10 20. Farmaceitiska kompozīcija ļaundabīgu audzēju ārstēšanai, raksturīga ar to, ka tā satur vienpavediena Fv fragmentu saskaņā ar jebkuru punktu no 5. līdz 16. punktam un piemērotas palīgvielas.
21. Farmaceitiskās kompozīcijas saskaņā ar 19. punktu izmantošana ļaundabīgu krūts audzēju un melanomu un to metastāžu un recidīvu ārstēšanai.
- 15 22. Farmaceitiskās kompozīcijas saskaņā ar 20. punktu izmantošana ļaundabīgu krūts audzēju un melanomu un to metastāžu un recidīvu ārstēšanai.
- 20 23. Reaģents ļaundabīgu audzēju atrašanās vietas noteikšanai un identificēšanai *in vivo*, raksturīgs ar to, ka tas satur rekombinantu antivielu saskaņā ar jebkuru punktu no 1. līdz 4. punktam un piemērotu marķieri.
24. Reaģents saskaņā ar 23. punktu, raksturīgs ar to, ka tas tiek izmantots ļaundabīgu krūts audzēju un melanomu un to metastāžu un recidīvu atrašanās vietas noteikšanai un identificēšanai *in vivo*.
- 25 25. Reaģents ļaundabīgu audzēju atrašanās vietas noteikšanai un identificēšanai *in vivo*, raksturīgs ar to, ka tas satur vienpavediena Fv fragmentu saskaņā ar jebkuru punktu no 5. līdz 16. punktam un piemērotu marķieri.
- 30 26. Reaģents saskaņā ar 23. punktu, raksturīgs ar to, ka tas tiek izmantots ļaundabīgu krūts audzēju un melanomu un to metastāžu un recidīvu atrašanās vietas noteikšanai un identificēšanai *in vivo*.

(19) AUSTRALIAN PATENT OFFICE

(54) Title
Recombinant antibodies and fragments recognising ganglioside N-glycolyl-gm3 and use thereof in the diagnosis and treatment of tumours

(51)⁶ International Patent Classification(s)
C07K 16/30 (2006.01) 20060101AFI2005100
C07K 16/30 83MEP
PCT/CU2004/000006

(21) Application No: 2004232391 (22) Application Date: 2004.04.22

(87) WIPO No: W004/094477

(30) Priority Data

(31) Number	(32) Date	(33) Country
2003-0092	2003.04.23	CU

(43) Publication Date: 2004.11.04

(71) Applicant(s)
Centro De Inmunologia Molecular

(72) Inventor(s)
Telavera Perez, Ariel, Mateo De Acosta Del Rio, Cristina Maria, Roque Navarro, Lourdes Tatiana, Moreno Frias, Ernesto, Rojas Dorantes, Gertrudis, Rodriguez Gonzalez, Mabel

(74) Agent/Attorney
Phillips Ormonde & Fitzpatrick, Level 22 367 Collins Street, Melbourne, VIC. 3000

(56) Related Art
EP 0 972 782
EP 1 013 761

24

2004232391 01 Oct 2008

THE CLAIMS DEFINING THE INVENTION ARE AS FOLLOWS:

1. A chimeric antibody derived from murine monoclonal antibody 14F7 produced by the hybridoma with deposit number ECACC 98101901, wherein the sequences of the hypervariable regions (CDRs) and the framework regions (FRs) of the heavy and light chains of the chimeric antibody are as shown below:
- 5
- HEAVY CHAIN
- CDR1: SYWIH
- CDR2: YIDPATAYTESNQKFKD
- 10 CDR3: ESPRLRRGIYYAMDY
- FR1: QVQLQQSGNELAKPGASMKMSCRASGYSFT
- FR2: WLKQRPDOGLEWIG
- FR3: KAILTAQRSSNTAFMYLNSLTSEDSAVYYCAR
- LIGHT CHAIN
- 15 CDR1: RASQSSISNNLH
- CDR2: YASQSSIS
- CDR3: QQSNRWPLT
- FR1: DLVLTQSPATLSVTPGDSVSFSC
- FR2: WYQQRTHESPRLLIK
- 20 FR3: GIPSRFSGSGSGTDFLSISVETEDFGMYFC
- FR4: FGAGTKLELKRA,
- and wherein the chimeric antibody includes the constant region of IgG1 human heavy chain and the constant region of C κ human light chain.
- 25 2. A chimeric antibody according to claim 1, wherein the antibody is a humanized variant of the 14F7 monoclonal antibody containing point mutations in the framework regions (FRs) of the heavy and light chains to reduce its immunogenicity.
3. A chimeric antibody according to claim 2, wherein the point mutations include any of the following:
- 30
- HEAVY CHAIN:
- Position 5: Q for V
- Position 9: N for A
- Position 11: L for V
- 35 Position 12: A for V
- Position 18: M for V
- Position 19: K for R
- Position 20: M for V
- Position 38: K for R
- 40 Position 40: R for A
- Position 42: D for G

W:\Docu\Computer\CDR\23-2004\232391 - Data\Chem\Copy.doc

2004232391

24

Position 49: I for V

LIGHT CHAIN:

Position 39: R for K

Position 40: T for P

Position 41: H for G

Position 42; E for Q

Position 58: I for V.

5

10

4. A single chain Fv fragment derived from murine monoclonal antibody 14F7 produced by the hybridoma with deposit number ECACC 98101901, wherein the fragment contains the sequence of the variable region of the heavy chain of the murine 14F7 monoclonal antibody and a variable region of the light chain of a murine or human antibody, said sequences set forth below:

HEAVY CHAIN

CDR1: SYWVH

CDR2: YIDPATAYTESNQKFKD

CDR3: ESPRLRRGIYYAMDY

FR1: OVQLQOSGNELAKPGASMKMSCRASGYSET

FR2- WL KORPDG! FWIG

20

FR3: KAILTADRSSNTAFMYI NSI ISEDSAVYYCAR

FR4: WGOGTTVTYSS

LIGHT CHAIN

CDR1: BASOŞISNLI H

CDR2: YASOSIS

25

COB3: OOSNEWPLT

ER1: D L V I T O S P A T I S V T P G D S V S E S C

ER2: WYDORTHESPRIUK

ER3: GIPSRFSGSGSGTDETL SII SVETEDGMYEC

FRA: EGAGTKI EI KRA

30

wherein the framework regions (FRs) of the heavy and light chains of the single chain Fv fragment contain point mutations which reduce its immunogenicity, and wherein the point mutations include any of the following:

HEAVY CHAIN

Position 5: Q for V

35

Position 9: N for A

Position 11: I for V

Position 12: A for B

Position 19: 11 for M

Recitation 10: K for P

40

Position 30: M for V

Position 38: K for R

20

LIGHT CHAIN:

10

FR1: DIVMFQSPASLAVSLGQRATISC

15

CDR2: Y A S N L E S

CDR3: Q H S R D V P L T F

20

FR1: D I Q M T Q T P S S L S A S L G D R V T I S C

25

CDR2: Y T S R L H S

CDR3: Q Q G N T L P P T F

30

FR1: D I Q M T Q T P S S L S A S V G D R V T I T C

35

CDR2: A A S N L Q S

CDR3: Q Q G Y T T P L T F

40

2004232391 01 Oct 2008

27

17. A single chain Fv fragment according to claim 4, substantially as herein described with reference to any one or more of the examples and/or figures.

5

W:\Documents\2008\06-2008\W\17171717 - C:\w\1\DeskCopy.doc

30

(19)



(10) **LT 5353 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

- (11) Patent numeris: **5353** (51) Int. Cl. (2006): **C07K 16/18**
- (21) Paraiškos numeris: **2005 101**
- (22) Paraiškos padavimo data: **2005 11 21**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **2006 03 27**
- (45) Patent paskelbimo data: **2006 07 25**
- (62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: **—**
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/CU2004/000006**
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **2004 04 22**
- (85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: **2005 11 21**
- (30) Prioritetas: **2003-0092, 2003 04 23, CU**
- (72) Išradėjas:
Loudes Tatiana ROQUE NAVARRO, CU
Cristina Maria MATEO DE ACOSTA DEL RIO, CU
Mabel RODRIGUEZ GONZALEZ, CU
Gertrudis ROJAS DORANTES, CU
Ariel TALAVERA PEREZ, CU
Ernesto MORENO FRAIS, CU
- (73) Patent savininkas:
CENTRO DE IMMUNOLOGIA MOLECULAR, Calle 216 Esq., 15, Atabey, Playa.,
12100 Ciudad de la Habana, CU
- (74) Patentinis patikėtinis:
Marius JAKULIS - JASON, AAA Baltic Service Company, Jasinskio g. 16B,
Biurų centras Victoria, LT-01112 Vilnius, LT

- (54) Pavadinimas:
Rekombinantiniai antikūnai ir jų fragmentai, atpažįstantys N-glikolil-GM3 gangliozydus, ir jų panaudojimas auglių diagnozei ir gydymui

- (57) Referatas:

Šis išradimas iš esmės susijęs su monokloniniais antikūnais, kurie atpažįsta antigenus, turinčius N-glikolil-GM3 gangliozydus, ir ne kltus N-glikolil arba N-acetil tipo gangliozydus, arba sulfatų glikolipidus. Konkrečiai šis išradimas susijęs su peptidų sekomis, kurios koduoja rekombinantinius monokloninius antikūnus, gautus iš 14F7 antikūno, kurie atpažįsta N-glikolil-GM3, arba jų fragmentus, gautus iš jų, farmacinės kompozicijas, turinčias minėtus rekombinantinius antikūnus arba jų fragmentus ir jų panaudojimą krūties vėžio ir melanomos diagnozei ir gydymui.

LT 5353 B

Išradimo apibrėžtis

1. Rekombinantinis antikūnas, gautas iš pelių 14F7 monokloninio antikūno, pagaminto hibridomos, kurios depozito ECACC Nr. 98101901, b e s i s k i r i a n t i s sunkiosios ir lengvosios grandinių hiper kintamų sričių (CDR) sekomis, parodytomis žemiau.

SUNKIOJI GRANDINĖ

CDR1: SYWIH

CDR2: YIDPATAYTESNQKFKD

CDR3: ESPRLRRGIYYYAMDY

LENGVOJI GRANDINĖ

CDR1: RASQISNNLH

CDR2: YASQIS

CDR3: QQSNRWPLT

2. Antikūnas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad yra 14F7 antikūno chimerinis variantas, turintis minėto 14F7 antikūno sunkiųjų ir lengvųjų grandinių CDR sritis ir struktūrinės sritis (FR), ir žmogaus IgG1 sunkiosios grandinės pastoviąją sritį, ir žmogaus Ck lengvosios grandinės pastoviąją sritį su sekančiomis sunkiosios ir lengvosios grandinių struktūrinių sričių (FR) sekomis:

SUNKIOJI GRANDINĖ

FR1: QVQLQQSGNELAKPGASMKMSCRASGYST

FR2: WLKQRPDQGLEWIG

FR3: KAILTADRSSNTAFMYLNSLTSEDSAVYYCAR

FR4: WGQGTTVTVSS

LENGVOJI GRANDINĖ

FR1: DLVLTQSPATLSVTPGDSVSFSC

FR2: WYQQRTHESPRLLK

FR3: GIPSRFSGSGSGTDFTLSIISVETEDFGMYFC

FR4: FGAGTKLELKRA

3. Antikūnas pagal 1 ir 2 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad yra 14F7 monokloninio antikūno humanizuotas variantas, turintis sunkiosios ir lengvosios grandinių struktūrinėse srityse (FR) taškines mutacijas, mažinančias jo imunogeniškumą.

4. Antikūnas pagal 3 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad yra 14F7 monokloninio antikūno humanizuotas variantas, kurio sunkiosios ir lengvosios grandinių struktūrinės sritys turi bet kurią iš sekančių mutacijų:

SUNKIOJI GRANDINĖ:

5 padėtis: Q pakeista į V

9 padėtis: N pakeista į A

11 padėtis: L pakeista į V

12 padėtis: A pakeista į V

18 padėtis: M pakeista į V

19 padėtis: K pakeista į R

20 padėtis: M pakeista į V

40 padėtis: R pakeista į A

42 padėtis: D pakeista į G

LENGVOJI GRANDINĖ:

39 padėtis: R pakeista į K

40 padėtis: T pakeista į P

41 padėtis: H pakeista į G

42 padėtis: E pakeista į Q

5. Viengrandis Fv fragmentas, gautas iš 14F7 pelių monokloninio antikūno, produkuoto iš hibridomos su depozito numeriu ECACC 98101901, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi pelių 14F7 monokloninio antikūno sunkiosios grandinės kintamos srities seką ir pelių antikūno lengvosios grandinės kintamą sritį.

6. Viengrandis Fv fragmentas pagal 5 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad lengvosios grandinės kintama sritis yra pats 14F7 antikūnas.

7. Viengrandis Fv fragmentas pagal 6 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad sunkiosios ir lengvosios grandinių hiper kintamų sričių (CDR) sekos yra tokios, kaip parodytos žemiau:

SUNKIOJI GRANDINĖ:

CDR1: SYWIH

CDR2: YIDPATAYTESNQKFKD

CDR3: ESPRLRRGIYYAMDY

LENGVOJI GRANDINĖ:

CDR1: RASQSI>NNLH

CDR2: YASQSI

CDR3: QQSNRWPLT

8. Viengrandis Fv fragmentas pagal 7 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi minėto 14F7 antikūno sunkiosios ir lengvosios grandinių CDR sritis ir struktūrinės sritis (FR), kur sunkiosios ir lengvosios grandinių struktūrinių sričių (FR) sekos yra sekančios:

SUNKIOJI GRANDINĖ:

FR1: QVQLQQSGNELAKPGASMKMSCRASGYSFT
 FR2: WLKQRPDQGLEWIG
 FR3: KAILTADRSSNTAFMYLNSLTSEDSAVYYCAR
 FR4: WGQGTTVTVSS
 LENGVOJI GRANDINĖ
 FR1: DLVLTQSPATLSVTPGDSVSFSC
 FR2: WYQQRTHESPRLLIK
 FR3: GIPSRFSGSGSGTDFTLSIISVETEDFGMYFC
 FR4: FGAGTKLELKRA

9. Viengrandis Fv fragmentas pagal 8 punktą, kuris sunkiosios ir lengvosios grandinių struktūrinėse srityse (FR) turi taškinės mutacijas, mažinančias jų imunogeniškumą.

10. Viengrandis Fv fragmentas pagal 9 punktą, kurio sunkiosios ir lengvosios grandinių struktūrinės sritys turi bet kurią iš sekančių mutacijų:

SUNKIOJI GRANDINĖ:

5 padėtis: Q pakeista į V
 9 padėtis: N pakeista į A
 11 padėtis: L pakeista į V
 12 padėtis: A pakeista į R
 18 padėtis: M pakeista į V
 19 padėtis: K pakeista į R
 20 padėtis: M pakeista į V
 40 padėtis: R pakeista į A
 42 padėtis: D pakeista į G
 LENGVOJI GRANDINĖ
 39 padėtis: R pakeista į K
 40 padėtis: T pakeista į P
 41 padėtis: H pakeista į G
 42 padėtis: E pakeista į Q

11. Viengrandis Fv fragmentas, gautas iš pelių 14F7 monokloninio antikūno, produkuoto hibridomos, kurios depozito numeris ECACC 98101901 pagal punktą 5, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi 14F7 monokloninio antikūno sunkiosios grandinės kintamos sritys seką ir lengvosios grandinės kintamą sritį, kurios seka yra sekanti:

Fr I

D I V M F Q S P A S L A V S L G Q R A T I S C

CDR 1

R A S Q S V S S S S Y S Y M H

Fr 2

W Y Q Q K P G Q P P K L L I K

CDR 2

Y A S N L E S

Fr 3

G V P A R F S G S G S G T D F T L N I H P V E E E D A A T Y Y C

CDR 3

Q H S R D V P L T F

Fr 4

G A G T K L E I K

12. Viengrandis Fv fragmentas, gautas iš pelių 14F7 monokloninio antikūno, produkuoto hibridomos, kurios depozito numeris ECACC 98101901, pagal 5 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi pelių 14F7 monokloninio antikūno sunkiosios grandinės kintamos srities seką ir lengvosios grandinės kintamą sritį, kurios seka yra sekanti:

Fr 1

D I Q M T Q T P S S L S A S L G D R V T I S C

CDR 1

R A S Q D I S N Y L N

Fr 2

W Y Q Q K P D G T V K L L I V

CDR 2

Y T S R L H S

Fr 3

G V P S R F S G S G S G T D Y S L T I S N L E Q E D I A T Y F C

CDR 3

Q Q G N T L P P T F

Fr 4

G A G T K L E L K

13. Viengrandis Fv fragmentas, gautas iš pelių 14F7 monokloninio antikūno, produkuoto hibridomos, kurios depozito numeris ECACC 98101901, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi pelių 14F7 monokloninio antikūno sunkiosios grandinės kintamos srities seką ir žmogaus antikūno lengvosios grandinės kintamą sritį.

14. Viengrandis Fv fragmentas pagal 13 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi pelių 14F7 monokloninio antikūno sunkiosios grandinės kintamos srities seką ir lengvosios grandinės kintamą sritį, kurios seka yra sekanti:

LT 5353 B

Fr1

D I Q M T Q T P S S L S A S V G D R V T I T C

CDR 1

R A S Q S I S S F L N

Fr 2

W Y Q Q K P G K A P K L L I Y

CDR 2

A A S N L Q S

Fr 3

G V P S R F S G R G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A A Y Y C

CDR 3

Q Q G Y T T P L T F

Fr 4

G Q G T K L E L K

15. Viengrandis Fv fragmentas pagal 13 punktą, besiskiriantis tuo, kad turi pelių 14F7 monokloninio antikūno sunkiosios grandinės kintamos srities seką ir lengvosios grandinės kintamą sritį, kurios seka yra sekanti:

Fr1

Q S V V T Q P P S A S G G P G Q S L T I S C

CDR 1

T G T S S D V G G Y N H V S

Fr 2

W Y Q Q H P G K A P K L M I Y

CDR 2

D V S K R P S

Fr 3

G V P H R F S G S K S G N T A S L T V S G L Q A E D E A V Y Y C

CDR 3

S S Y A G S N N L V F

Fr 4

G G G T K V T V L

16. Viengrandis Fv fragmentas pagal 13 punktą, besiskiriantis tuo, kad turi pelių 14F7 monokloninio antikūno sunkiosios grandinės kintamos srities seką ir lengvosios grandinės kintamą sritį, kurios seka yra sekanti:

Fr1

S S E L T Q D P A V S V A L G T V R I T C

CDR 1

Q G D S L R S Y Y A S

Fr 2

W Y Q Q K P G Q A P V L V I Y

CDR 2

G K N N R P S

Fr 3

G I P D R F S G S S S G N T A S L T I T G A Q A E D E A D Y Y C

CDR 3

N S R D S S G N H V V F

Fr 4

G G G T K L T V L

17. Ląstelių linija *b e s i s k i r i a n t i* tuo, kad ekspresuoja rekombinantinį antikūną pagal bet kurį 1-4 punktą.

18. Ląstelių linija *b e s i s k i r i a n t i* tuo, kad ekspresuoja viengrandį Fv fragmentą pagal bet kurį 5-16 punktą.

19. Farmacinė kompozicija, skirta piktybinių auglių gydymui, *b e s i s k i r i a n t i* tuo, kad apima rekombinantinį antikūną pagal bet kurį 1-4 punktą.

20. Farmacinė kompozicija, skirta piktybinių auglių gydymui, *b e s i s k i r i a n t i* tuo, kad apima viengrandį Fv fragmentą pagal bet kurį 5-16 punktą ir atitinkamą nešiklį.

21. Farmacinės kompozicijos pagal 19 punktą panaudojimas piktybinių krūties auglių ir melanomų, bei jų metastazių ir recidyvų gydymui.

22. Farmacinės kompozicijos pagal 20 punktą panaudojimas piktybinių krūties auglių ir melanomų, bei jų metastazių ir recidyvų gydymui.

23. Reagentas piktybinių auglių lokalizavimui ir identifikavimui „*in vivo*“, *b e s i s k i r i a n t i s* tuo, kad apima rekombinantinį antikūną pagal bet kurį 1-4 punktą ir atitinkamą žymenį.

24. Reagentas pagal 23 punktą, *b e s i s k i r i a n t i s* tuo, kad yra naudojamas krūties piktybinių auglių ir melanomų, bei jų metastazių ir recidyvų lokalizavimui ir identifikavimui „*in vivo*“.

25. Reagentas, skirtas piktybinių auglių lokalizavimui ir identifikavimui „*in vivo*“, *b e s i s k i r i a n t i s* tuo, kad apima viengrandį Fv fragmentą pagal bet kurį 5-16 punktą ir atitinkamą žymenį.

26. Reagentas pagal 25 punktą, *b e s i s k i r i a n t i s* tuo, kad yra naudojamas krūties piktybinių auglių ir melanomų, bei jų metastazių ir recidyvų lokalizavimui ir identifikavimui.