



Industria y Comercio

S U P E R I N T E N D E N C I A

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

06-118138

54. TÍTULO Tratamiento de infecciones micóticas

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE Newtec Pharma PLC.

DOMICILIO Lancashire, Reino Unido

74. APODERADO D.ña María Rodríguez D'Alenun

22. BOGOTÁ, D. C., Nov 22/06.

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD
PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

23-NOV-06

1) SOLICITUD DE:			
☒ Patente de invención		☐ Patente de Modelo de Utilidad	
☒ Capitulo I		☐ Capitulo II	
2) SOLICITANTE (71)	Nombre: NEUTEC PHARMA PLC Dirección: Clinical Sciences Building Central Manchester Healthcare Trust, Oxford Road, Manchester, Lancashire M13 9WL, Gran Bretaña Nacionalidad o domicilio: Manchester, Lancashire, Gran Bretaña Lugar de constitución: Gran Bretaña		IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ OTRO ☐ Cual _____ NÚMERO _____
	Teléfono: _____ Fax: _____ E. Mail: _____		
3) REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN Dirección. Carrera 11 N° 86-53 Piso 6 Bogotá D.C Teléfono 6181088 Fax. 6350824 E Mail info@clarkemodet.com.co		IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT: ☐ C.E. ☐ OTRO ☐ NÚMERO: 41.654 882 TP: 20824 CSJ
4) INVENTOR (ES) (72)	Nombre: 1. BURNIE, James, Peter; 2. MATTHEWS, Ruth, Christine Dirección: 1. 1 Greystoke Drive, Alderley Edge, Cheshire SK9 7 PY, Gran Bretaña; 2. 1 Greystoke Drive, Alderley Edge, Cheshire SL9 7 PY Gran Bretaña Nacionalidad o Domicilio: Gran Bretaña		
5) PCT (86) Solicitud Internacional No. PCT/GB2005/001478 Fecha Abril 18 de 2005 Publicación Internacional No WO2005/102386 A1 Fecha: Nov. 3, 2005			
6) Título (54) TRATAMIENTO DE INFECCIONES MICÓTICAS			
7) Clasificación Internacional: A61K 39/395, 31/496, 31/506, A61P 31/10// (A61K 39/395, 31:496) (A61K 39/395, 31:506)			
8) PRIORIDAD	33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
SI ☒ NO ☐	Gran Bretaña	Abril 23, 2004	0409077.5
9) Comprobante de pago N°. 06-75,814 Fecha: Octubre 2, 2006			
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario Ver reverso de esta pagina			

P849

3
2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 75.814
FECHA : OCTUBRE 2 DE 2006

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad. 06-118138- -00000-0000
Fec 2006-11-22 18:03:21 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tm 11 PATENTEIYII
Eve. 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios 67

***** CONSIGNACION *****

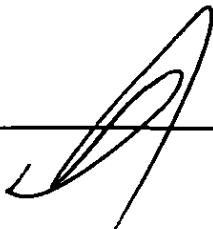
DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMB	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	53370513	02/10/2006	11.649.000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
		TOTAL :	\$ 463,000.00

SCH. CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____



RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

10)

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona Jurídica
- ☐ Poderes, si fuera el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud Internacional (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12 y 6 x 6 cm
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☐ Otros

11) FIGURA CARACTERÍSTICA:

12) Solicitud concesión de la patente,

NOMBRE: DILIA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

FIRMA:

C.C. 41.654 882 de Bogota TP 20824 CSJ

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta pagina

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
3 November 2005 (03.11.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/102386 A1

- (51) International Patent Classification⁷: A61K 39/395, 31/496, 31/506, A61P 31/10 // (A61K 39/395, 31 496) (A61K 39/395, 31 506)
- (21) International Application Number: PCT/GB2005/001478
- (22) International Filing Date: 18 April 2005 (18 04 2005)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 0409077 5 23 April 2004 (23 04 2004) GB
- (71) Applicant (for all designated States except US): NEUTECH PHARMA PLC [GB/GB], Clinical Sciences Building, Central Manchester Healthcare Trust, Oxford Road, Manchester, Lancashire M13 9WL (GB)
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): BURNIE, James, Peter [GB/GB], 1 Greystoke Drive, Alderley Edge, Cheshire SK9 7PY (GB) MATTHEWS, Ruth, Christine [GB/GB], 1 Greystoke Drive, Alderley Edge, Cheshire SK9 7PY (GB)
- (74) Agent: HALLY, Anna-Louise, Lloyd Wise, McNeight & Lawrence, Commonwealth House, 1-19 New Oxford Street, London WC1A 1LW (GB)
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)
- Published:
- with international search report
 - before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette

WO 2005/102386 A1

(54) Title: TREATMENT OF FUNGAL INFECTIONS

(57) Abstract: A composition comprising an antibody or an antigen binding fragment thereof specific for at least one epitope of hsp90 from an organism of the *Aspergillus* genus, and at least one antifungal agent selected from the group consisting of itraconazole and voriconazole

Treatment of Fungal Infections

The present invention relates to novel compositions and preparations comprising effective antifungal agents together with an antibody which can be incorporated into the compositions and preparations

Fungal infections are a major cause of patient mortality in the intensive care unit and more generally in immunocompromised and debilitated patients (Gold, J.W.M., 1984, Am. J. Med. 76: 458-463; Klein, R.S. *et al*, 1984, N. Engl. J. Med. 311: 354-357; Burnie, J.P., 1997, Current Anaesthesia & Critical Care 8: 180-183). The presence and persistence of fungal infections can be attributed to the selective pressure of broad-spectrum antifungals, frequently prolonged stay of patients in facilities such as an intensive care unit, problems in diagnosing the infections, and the lack of efficacy of the fungal agents used in therapy. While strict hygienic control may result in some prevention of fungal infections in a hospital or other environment, outbreaks of infections remain a serious problem and need to be addressed.

Although the majority of clinical manifestations of mycoses are caused predominantly by *Aspergillus fumigatus*, other *Aspergillus* species such as *A. flavus*, *A. terreus*, and *A. niger* are also associated with severe infections in the immunocompromised host (Espinel-Ingroff, A., 2003, J. Clin. Microbiol. 41: 403-409)

Detection and diagnosis of the fungal pathogen responsible for an infection is critical for subsequent therapy because antifungal agents may be more effective against certain strains. GB2240979 and EP0406029 (herein incorporated by reference in their entirety) disclosed a fungal stress protein and antibody thereto which could be used in a sensitive and highly specific test for detection of fungal pathogens.

Traditionally, fungal infections caused by *Aspergillus* and *Candida* species have been treated by the antifungal agent amphotericin B, regarded as the "gold standard" of

systemic antifungal therapy (Burnie, J.P., 1997, supra). Unfortunately, amphotericin B is itself highly toxic and its use is tempered by side effects including chills, fever, myalgia or thrombophlebitis. Other antifungal agents include the oral azole drugs (miconazole, ketoconazole, itraconazole, fluconazole, voriconazole) and 5-fluorocytosine. However, many fungal species are becoming resistant to antifungal agents such as fluconazole, and these species often occur in patients where this drug has been administered prophylactically. In response to the increasing prevalence of antifungal resistant strains and despite the recent advances made in therapeutic drugs such as fluconazole, itraconazole and systemic liposomal-based variants of amphotericin B (Burnie, J.P., 1997, supra), the need for effective agents for treatment of fungal infections remains acute.

The above-identified need was addressed in WO 01/76627, which discloses a composition for the treatment of human or animal fungal infections. The composition comprises an antibody specific for a conserved epitope of the fungal stress protein, hsp90, the antibody being combined with the known polyene antifungal agents, particularly amphotericin B. Specifically, the antibody (hereinafter referred to as Mycograb (RTM)) recognises the epitope being displayed by the peptide having the sequence of SEQ ID NO: 1, which is conserved throughout many fungal species. Surprisingly, it was shown that the efficacy of amphotericin B against a wide variety of pathologically important fungal strains (e.g. *Candida* species) was significantly enhanced in the presence of the antibody, thereby allowing for either lower treatment dosages or more effective treatment at the same dose, which allowed for reduction of unwanted side-effects. Furthermore, the composition disclosed in WO 01/76627 allows for effective treatment of fungal infections which were inherently resistant to the fungal agent used in the composition.

Importantly, fluconazole (an oral azole antifungal agent) in combination with Mycograb (RTM) antibody was shown to have little synergy against *Candida* strains.

All of the azole antifungal agents operate *via* a common mode of action, by preventing the synthesis of ergosterol, the major sterol component of fungal plasma membranes, through inhibition of the fungal cytochrome P450-dependent enzyme lanosterol 14- α -demethylase. The resulting depletion of ergosterol and the concomitant accumulation of 14- α -methylated precursors interferes with the bulk function of ergosterol in fungal membranes and alters both the fluidity of the membrane and the activity of several membrane-bound enzymes. The net effect is an inhibition of fungal growth and replication (Maertens, J.A., 2004, Clin. Microbiol. Infect. 10 (Suppl. 1):1-10).

Since fluconazole in combination with Mycograb (RTM) antibody exhibited little synergy against *Candida* strains, and the mode of action of oral azole antifungal agents is common, it was logical that other oral azole antifungal agents such as miconazole, ketoconazole, itraconazole, and voriconazole would also display no synergy in combination with Mycograb (RTM) antibody.

The present inventors have now found that despite the prior finding that azole antifungal agents displayed little or no synergy with the Mycograb (RTM) antibody disclosed in WO 01/76627 in the treatment of infections due to *Aspergillus* or *Candida* strains, there is a therapeutic synergy between the oral azole antifungal agents itraconazole, and voriconazole, in combination with Mycograb (RTM) antibody. Experiments (below) have shown that this synergy is so far limited to itraconazole and voriconazole, although it is possible that other oral azole antifungal agents which have not yet been tested, or are in development may also show some synergy with Mycograb (RTM) antibody.

According to the present invention there is provided a composition comprising an antibody or an antigen binding fragment thereof specific for at least one epitope of hsp90 from an organism of the *Aspergillus* genus, and at least one antifungal agent selected from the group consisting of: itraconazole and voriconazole.

Further provided is a combined preparation, e.g. a pharmaceutical pack, comprising an antibody or an antigen binding fragment thereof specific for at least one epitope of hsp90 from an organism of the *Aspergillus* genus, and at least one antifungal agent selected from the group consisting of: itraconazole and voriconazole, for simultaneous, separate or sequential use in the treatment of fungal infections.

Further provided is a method of manufacture of a medicament for the treatment of fungal infections of the human or animal body characterised in the use of an antibody or an antigen binding fragment thereof specific for at least one epitope of hsp90 from an organism of the *Aspergillus* genus, and at least one antifungal agent selected from the group consisting of: itraconazole and voriconazole.

Further provided is the use of a composition comprising an antibody or an antigen binding fragment thereof specific for at least one epitope of hsp90 from an organism of the *Aspergillus* genus, and an antifungal agent comprising at least one antifungal agent selected from the group consisting of: itraconazole and voriconazole, in a method of manufacture of a medicament for the treatment of fungal infections.

Preliminary results also indicate that posaconazole is capable of achieving similar synergistic results and so the present invention also extends to compositions, combined preparations, methods of manufacture and uses of posaconazole and an antibody or an antigen binding fragment thereof specific for at least one epitope of hsp90 from an organism of the *Aspergillus* genus.

The antibody or antigen binding fragment thereof may be specific for the epitope displayed by a peptide comprising the sequence of SEQ ID NO: 1.

The antibody or antigen binding fragment thereof may be specific for the epitope displayed by a peptide comprising the sequence of SEQ ID NO: 2.

Antibodies, their manufacture and uses are well known and disclosed in, for example, Harlow, E. and Lane, D., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999.

The antibodies may be generated using standard methods known in the art. Examples of antibodies include (but are not limited to) polyclonal, monoclonal, chimeric, single chain, Fab fragments, fragments produced by a Fab expression library, and antigen binding fragments of antibodies.

Antibodies may be produced in a range of hosts, for example goats, rabbits, rats, mice, humans, and others. They may be immunized by injection with fungal stress proteins, or any fragment or oligopeptide thereof which has immunogenic properties. Depending on the host species, various adjuvants may be used to increase an immunological response. Such adjuvants include, but are not limited to, Freund's, mineral gels such as aluminium hydroxide, and surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanin, and dinitrophenol. Among adjuvants used in humans, BCG (*Bacille Calmette-Guerin*) and *Corynebacterium parvum* are particularly useful.

Monoclonal antibodies to fungal stress proteins, or any fragment or oligopeptide thereof may be prepared using any technique which provides for the production of

antibody molecules by continuous cell lines in culture. These include, but are not limited to, the hybridoma technique, the human B-cell hybridoma technique, and the EBV-hybridoma technique (Koehler *et al.*, 1975, *Nature*, 256: 495-497; Kosbor *et al.*, 1983, *Immunol. Today* 4: 72; Cote *et al.*, 1983, *PNAS USA*, 80: 2026-2030; Cole *et al.*, 1985, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss Inc., New York, pp. 77-96).

In addition, techniques developed for the production of "chimeric antibodies", the splicing of mouse antibody genes to human antibody genes to obtain a molecule with appropriate antigen specificity and biological activity can be used (Morrison *et al.*, 1984, *PNAS USA*, 81: 6851-6855; Neuberger *et al.*, 1984, *Nature*, 312: 604-608; Takeda *et al.*, 1985, *Nature*, 314: 452-454). Alternatively, techniques described for the production of single chain antibodies may be adapted, using methods known in the art, to produce fungal stress protein-specific single chain antibodies. Antibodies with related specificity, but of distinct idiotypic composition, may be generated by chain shuffling from random combinatorial immunoglobulin libraries (Burton, D.R., 1991, *PNAS USA*, 88: 11120-11123).

Antibodies may also be produced by inducing *in vivo* production in the lymphocyte population or by screening recombinant immunoglobulin libraries or panels of highly specific binding reagents (Orlandi *et al.*, 1989, *PNAS USA*, 86: 3833-3837; Winter, G. *et al.*, 1991, *Nature*, 349: 293-299).

Antigen binding fragments may also be generated, for example the F(ab')₂ fragments which can be produced by pepsin digestion of the antibody molecule and the Fab fragments which can be generated by reducing the disulfide bridges of the F(ab')₂ fragments. Alternatively, Fab expression libraries may be constructed to allow rapid

and easy identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity (Huse *et al.*, 1989, Science, 256: 1275-1281).

Various immunoassays may be used for screening to identify antibodies having the desired specificity. Numerous protocols for competitive binding or immunoradiometric assays using either polyclonal or monoclonal antibodies with established specificities are well known in the art. Such immunoassays typically involve the measurement of complex formation between the fungal stress protein or any fragment or oligopeptide thereof, and its specific antibody. A two-site, monoclonal-based immunoassay utilizing monoclonal antibodies specific to two non-interfering fungal stress protein epitopes may be used, but a competitive binding assay may also be employed (Maddox *et al.*, 1983, J. Exp. Med., 158: 1211-1216).

For example, the antibody used in the composition or combined preparation may comprise the sequence of SEQ ID NO: 3.

The composition or the combined preparation may be used in the treatment of fungal infections. The fungal infection may be due to an organism of the *Aspergillus* genus.

The fungal infection may be resistant to said antifungal agent *per se*.

The composition or the combined preparation may be used in a method of treatment of fungal infections of the human or animal body.

The composition or preparation may additionally comprise a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient. Similarly, any method of manufacture of the present invention or use in same may also comprise the use of a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient. Examples of pharmaceutically acceptable

carriers, diluents and excipients are well known in the art, for example see: Remington's Pharmaceutical Sciences and US Pharmacopoeia, (1984, Mack Publishing Company, Easton, PA, USA).

Further provided is a method of treatment of fungal infections of the human or animal body comprising administering a therapeutically effective quantity of an antibody or an antigen binding fragment thereof specific for at least one epitope of hsp90 from an organism of the *Aspergillus* genus, and at least one antifungal agent selected from the group consisting of: itraconazole and voriconazole, to a patient in need of same.

The composition or combined preparation may be administered orally.

Further provided is a kit comprising an antibody or an antigen binding fragment thereof specific for at least one epitope of hsp90 from an organism of the *Aspergillus* genus, and at least one antifungal agent selected from the group consisting of: itraconazole and voriconazole.

The kit may be for use in the treatment of fungal infections.

The antibody or antigen binding fragment thereof according to the present invention may be labelled with a detectable label or may be conjugated with an effector molecule, for example a drug e.g. an anti-fungal agent such as itraconazole or voriconazole, or a toxin, such as ricin, or an enzyme, using conventional procedures, and the invention extends to such labelled antibodies or antibody conjugates.

If desired, mixtures of antibodies may be used for diagnosis or treatment, for example mixtures of two or more antibodies recognising different epitopes of a fungal stress protein according to the invention, and/or mixtures of antibodies of a different class,

e.g. mixtures of IgG and IgM antibodies recognising the same or different epitope(s) of the invention.

The contents of each of the references discussed herein, including the references cited therein, are herein incorporated by reference in their entirety.

The present invention will be further apparent from the following description, which shows, by way of example only, specific embodiments of the composition and experimentation therewith.

EXPERIMENTAL

Experiments described below investigated the antifungal effect of Mycograb (RTM) antibody used in combination with the antifungals agents amphotericin B, caspofungin, voriconazole and itraconazole. Mycograb (RTM) antibody recognises the epitopes displayed by the peptides having the sequence of SEQ ID NOs: 1 and 2. Results show that a surprisingly strong synergistic effect is demonstrated for voriconazole and itraconazole in combination with Mycograb (RTM) antibody against a variety of clinically important *Aspergillus* species. This synergistic effect has significant implications for clinical treatment of fungal infections.

Materials and Methods

Antifungal agents

Stock solutions of amphotericin B (AMB, Sigma), caspofungin (Caspo), voriconazole (VOR) and itraconazole (ITZ) were prepared according to the National Committee for Clinical Laboratory Standards (M38-A) in RPMI 1640 with glutamine broth medium, buffered to pH 7.0 with 0.165mmol/liter morpholinopropanesulphonic acid (MOPS). AMB stock solutions were prepared as a 100 x series in 100% dimethyl sulfoxide (DMSO) and diluted in medium to a concentration range of 0.03125 to 16 µg/ml. Caspofungin, voriconazole and itraconazole were tested at a concentration range of 0.03125 to 1024 µg/ml, and Mycograb (RTM) (NeuTec Pharma plc) at a concentration range of 0.25 to 1024 µg/ml.

Test isolates

Clinical isolates of *Aspergillus fumigatus* (2), *A. flavus* (1), *A. terreus* (1) and *A. niger* (1) were obtained from the Department on Microbiology, Manchester Royal Infirmary, Manchester, UK.

Antibody

The DNA sequence of the Mycograb (RTM) antibody which is specific for a fungal hsp90 stress protein epitope having the sequence of SEQ ID NO: 1 (as disclosed in GB2240979 and EP0406029) was genetically modified by codon optimisation for expression in *Escherichia coli* (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, USA) and inserted into an *E. coli* expression vector. The amino acid sequence of the Mycograb (RTM) of the present invention comprises the sequence of SEQ ID NO: 3 (includes the heavy, light and spacer domains).

Mycograb (RTM) antibody was expressed in an *Escherichia coli* host and purified by affinity chromatography using an imidazole exchange column using standard molecular biology protocols (see, for example, Harlow & Lane, *supra*; Sambrook, J. *et al.*, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Sambrook, J. & Russell, D., 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor). Mycograb (RTM) antibody was isolated up to 95 % purity.

Formulations of Mycograb (RTM) antibody were prepared as follows: a vial containing 10 mg of pure Mycograb (RTM) antibody, 150 mg of pharmaceutical grade (Ph Eur) Urea and 174 mg L-Arginine (Ph Eur) were reconstituted in 5 ml water.

Cross-reactivity of Mycograb (RTM) antibody with Aspergillus sp hsp90

Immunoblotting has previously been used to dissect the antibody response to *Aspergillus fumigatus* in patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis, aspergilloma, and invasive aspergillosis. This identified multiple antigens of molecular weight varying from 18-92 kDa. One antigen at 88kDa was identified as an hsp90 homolog based on its cross-reaction with Mycograb (RTM) antibody (Burnie, J P, and R. C Matthews. 1991. J Clin. Microbiol. 29:2099-106). Epitope mapping has revealed

that Mycograb (RTM) antibody is reactive toward the epitope displayed by the peptide having the sequence of SEQ ID NO: 2, which is conserved in both *A. fumigatus* and *A. niger*

Antifungal susceptibility testing

The minimal inhibitory concentrations (MICs) of amphotericin B, caspofungin, voriconazole and itraconazole, and Mycograb (RTM) antibody were determined by broth microdilution according to the National Committee for Clinical Laboratory Standards document M38-A. In brief, AMB (0.03125 to 16 µg/ml), caspofungin, voriconazole and itraconazole (0.03125 to 1024 µg/ml) and Mycograb (RTM) (0.25 to 1024 µg/ml) concentrations were tested alone and in combination by MIC endpoints and checkerboard titrations. An inoculum suspension was prepared in buffered RPMI with glutamine medium by probing colonies from a 7 day old Sabouraud plate. The suspension was adjusted to 0.09-0.11 (80% to 82% transmittance) for *Aspergillus* species, 0.15-0.17 (68% to 70% transmittance). The inoculum was diluted a further 1:2 when added to the antifungal agents in the assay (final inoculum (0.4×10^4 to 0.5×10^4)). For AMB and Mycograb (RTM), either alone or in combination, the endpoint was determined as the concentration to produce no growth (MIC-0). Microtitre plates were incubated at 37°C without agitation for 48 hours for *Aspergillus* species. For caspofungin, voriconazole and itraconazole, either alone or in combination with Mycograb (RTM) antibody, the MIC endpoint was determined as the concentration resulting in a prominent decrease in turbidity ($\geq 50\%$ growth inhibition, MIC-2) compared to the growth control (Keele *et al.* 2001; Espinel-Ingroff 2003). The final inhibitory concentration (FIC) was calculated for each drug by dividing the MIC in the presence of the second drug by the MIC in its absence. For each combination, two fractions were produced which were summated to produce the fractional final inhibitory concentration. Synergy was defined by value of ≤ 0.5 , indifference was

defined by a value of >0.5 to <4.0 , and antagonism was defined by a value of ≥ 4.0 (Matthews *et al.*, 2003).

Results

Mycograb (RTM) antibody, in addition to recognising the epitope displayed by the peptide having the sequence of SEQ ID NO: 1, also recognises the conserved *Aspergillus* species epitope displayed by the peptide having the sequence of SEQ ID NO: 2.

In vitro experiments examining the effect of combining an Mycograb (RTM) antibody and antifungal agents are presented in Tables 1-4.

TABLE 1. Checkerboard assay of amphotericin B and Mycograb (RTM) antibody against *Aspergillus* species

Strain	Agent	MIC-0 (µg/ml) of each agent		FIC (µg/ml)	FICI	Outcome
		Alone	Combination			
<i>A. fumigatus</i>	AMB	2	1	0.5	0.5	Indifferent
	Mycograb	512	4	0.01		
<i>A. fumigatus</i> CI2	AMB	2	1	0.5	0.531	Indifferent
	Mycograb	512	16	0.031		
<i>A. niger</i>	AMB	2	1	0.5	0.5	Indifferent
	Mycograb	512	4	0.01		
<i>A. flavus</i>	AMB	4	4	1	2	Indifferent
	Mycograb	512	512	1		
<i>A. terreus</i>	AMB	4	4	1	2	Indifferent
	Mycograb	512	512	1		

TABLE 2. Checkerboard assay of caspofungin and Mycograb (RTM) antibody against *Aspergillus* species

Strain	Agent	MIC-2 (µg/ml) of each agent		FIC (µg/ml)	FICI	Outcome
		Alone	Combination			
<i>A. fumigatus</i>	Caspo	0.125	0.0625	0.5	0.562	Indifferent
	Mycograb	1024	32	0.062		
<i>A. fumigatus</i> CI2	Caspo	0.125	0.0625	0.5	0.562	Indifferent
	Mycograb	1024	16	0.062		
<i>A. niger</i>	Caspo	1	0.125	0.125	0.125	Synergy
	Mycograb	256	0.0625	0.0001		
<i>A. flavus</i>	Caspo	1	0.5	0.5	0.500	Indifferent
	Mycograb	512	0.0625	0.0001		
<i>A. terreus</i>	Caspo	0.3125	0.078	0.25	0.312	Synergy
	Mycograb	1024	32	0.031		

TABLE 3. Checkerboard assay of itraconazole and Mycograb (RTM) antibody against *Aspergillus* species

Strain	Agent	MIC-2 (µg/ml) of each agent		FIC (µg/ml)	FICI	Outcome
		Alone	Combination			
<i>A. fumigatus</i>	ITZ	0.5	0.0312	0.0625	0.0781	Synergy
	Mycograb	1024	16	0.016		
<i>A. fumigatus</i> CI2	ITZ	0.5	0.125	0.25	0.2578	Synergy
	Mycograb	1024	8	0.008		
<i>A. niger</i>	ITZ	0.125	0.0156	0.125	0.375	Synergy
	Mycograb	16	4	0.25		
<i>A. flavus</i>	ITZ	0.125	0.0312	0.25	0.25	Synergy
	Mycograb	512	0.25	0.0005		
<i>A. terreus</i>	ITZ	0.125	0.0312	0.25	0.281	Synergy
	Mycograb	1024	32	0.031		

TABLE 4. Checkerboard assay of voriconazole and Mycograb (RTM) antibody against *Aspergillus* species

Strain	Agent	MIC-2 (µg/ml) of each agent		FIC (µg/ml)	FICI	Outcome
		Alone	Combination			
<i>A. fumigatus</i>	VOR	0.0625	0.0312	0.5	0.5	Synergy
	Mycograb	1024	0.25	0.0002		
<i>A. fumigatus</i> CI2	VOR	0.25	0.125	0.5	0.5	Synergy
	Mycograb	1024	0.25	0.0002		
<i>A. niger</i>	VOR	0.125	0.125	1	2	Indifferent
	Mycograb	16	16	1		
<i>A. flavus</i>	VOR	0.25	0.0625	0.25	0.25	Synergy
	Mycograb	512	0.25	0.0005		
<i>A. terreus</i>	VOR	0.25	0.125	0.5	0.5	Synergy
	Mycograb	1024	0.25	0.0002		

Summary

The results shown in Tables 1-4 reveal that while Mycograb (RTM) antibody on its own was able to inhibit growth of certain *Aspergillus* species, a surprisingly high level of antifungal activity against all the species examined was observed when the antibody was used in combination with itraconazole, and a surprisingly high level of antifungal activity against all the species examined except for *A. niger* was observed when the antibody was used in combination with voriconazole. This surprising effect between the antibody and itraconazole/voriconazole is not observed with other oral azole antifungal agents such as fluconazole, or with amphotericin B or caspofungin when combined with the antibody.

Conclusions

The data presented here clearly demonstrates that there is a surprising synergism between Mycograb (RTM) antibody and the antifungal agents itraconazole and voriconazole, which effects enhanced antifungal activity against a wide variety of pathologically important *Aspergillus* strains. These results allow for the use of compositions comprising either itraconazole and voriconazole, together with Mycograb (RTM) antibody for the treatment of human or animal fungal infections. The present invention allows for either lower treatment dosages or more effective treatment at the same dosages, thereby reducing unwanted side-effects.

There are several important clinical implications of the present invention. Firstly, the production of a synergistic combination of itraconazole/voriconazole and Mycograb (RTM) antibody in the treatment of *Aspergillus* infections should become the treatment of choice. This would lead to a reduction in mortality and morbidity for these infections. Secondly, itraconazole/voriconazole are associated with undesirable side effects in subjects receiving the drug. For example, voriconazole is very commonly associated with fever, headache, abdominal pain, nausea, vomiting, diarrhoea,

peripheral oedema, skin rash, and visual disturbances. The synergy provided by the present invention means that a lower dose of either itraconazole/voriconazole could be used while maintaining efficacy and concomitantly reducing toxicity and adverse side effects. Thirdly, the toxicity sparing effect of Mycograb (RTM) antibody would allow the clinical efficacy of higher doses of itraconazole/voriconazole to be explored and further contribute to an improved clinical outcome.

Claims

1. A composition comprising an antibody or an antigen binding fragment thereof specific for at least one epitope of hsp90 from an organism of the *Aspergillus* genus, and at least one antifungal agent selected from the group consisting of: itraconazole and voriconazole.
2. A combined preparation comprising an antibody or an antigen binding fragment thereof specific for at least one epitope of hsp90 from an organism of the *Aspergillus* genus, and at least one antifungal agent selected from the group consisting of: itraconazole and voriconazole, for simultaneous, separate or sequential use in the treatment of fungal infections.
3. The composition according to claim 1 or the combined preparation according to claim 2, wherein said antibody or an antigen binding fragment thereof is specific for the epitope displayed by the peptide having the sequence of SEQ ID NO: 1.
4. The composition according to claim 1 or claim 3, or the combined preparation according to claim 2 or claim 3, wherein said antibody or an antigen binding fragment thereof is specific for the epitope displayed by the peptide having the sequence of SEQ ID NO: 2.
5. The composition or the combined preparation according to claim 3 or claim 4, wherein said antibody comprises the sequence of SEQ ID NO: 3.

6. The composition according to any one of claims 1 or 3 to 5, or the combined preparation according to any one of claims 2 to 5 for use in the treatment of fungal infections.
7. The composition or combined preparation according to claim 6, wherein said fungal infection is due to an organism of the *Aspergillus* genus.
8. The composition or combined preparation according to claim 5 or claim 6, wherein the fungal infection is resistant to said antifungal agent *per se*.
9. The composition according to any one of claims 1 or 3 to 8, or the combined preparation according to any one of claims 2 to 8 for use in a method of treatment of fungal infections of the human or animal body.
10. A method of manufacture of a medicament for the treatment of fungal infections of the human or animal body characterised in the use of an antibody or an antigen binding fragment thereof specific for at least one epitope of hsp90 from an organism of the *Aspergillus* genus, and at least one antifungal agent selected from the group consisting of: itraconazole and voriconazole.
11. The use of a composition comprising an antibody or an antigen binding fragment thereof specific for at least one epitope of hsp90 from an organism of the *Aspergillus* genus, and an antifungal agent comprising at least one antifungal agent selected from the group consisting of: itraconazole and voriconazole, in a method of manufacture of a medicament for the treatment of fungal infections.
12. The use of the composition according to claim 11, wherein said fungal infection is resistant to said antifungal agent *per se*.

13. A method of treatment of fungal infections of the human or animal body comprising administering a therapeutically effective quantity of the composition according to any one of claims 1 or 3 to 8, or a combined preparation according to any one of claims 2 to 8 to a patient in need of same.
14. The method according to claim 13, wherein said composition or combined preparation is administered orally.
15. A kit comprising an antibody or an antigen binding fragment thereof specific for at least one epitope of hsp90 from an organism of the *Aspergillus* genus, and at least one antifungal agent selected from the group consisting of: itraconazole and voriconazole.
16. The kit according to claim 15 for use in the treatment of fungal infections
17. The composition according to any of claims 1 or 3 to 8 or the combined preparation according to any of claims 2 to 8, wherein said antibody or antigen binding fragment is labelled with a detectable label.
18. The composition according to any of claims 1 or 3 to 8 or the combined preparation according to any of claims 2 to 8, wherein said antibody or antigen binding fragment is conjugated with an effector molecule.
19. The invention as substantially hereinbefore described with reference to the examples.

MP101019-GB str25
SEQUENCE LISTING

<110> NeuTec Pharma PLC

<120> Treatment of fungal infections

<130> GDM/JR-MP101019-WO

<160> 3

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> Candida sp.

<400> 1

Asn Lys Ile Leu Lys Val Ile Arg Lys Asn Ile Val
1 5 10

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> Aspergillus sp.

<400> 2

Lys Ile Met Lys Val Ile
1 5

<210> 3

<211> 248

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 3

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

Pro Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No
PCT/GB2005/001478

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K39/395 A61K31/496 A61K31/506 A61P31/10
/(A61K39/395, 31:496), (A61K39/395, 31:506)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base used, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, BIOSIS, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
A	WO 01/76627 A (NEUTEC PHARMA PLC; BURNIE, JAMES, PETER) 18 October 2001 (2001-10-18) cited in the application abstract page 28, paragraph 2	1-19

☐ Further documents are listed in the continuation of box C

☒ Patent family members are listed in annex

* Special categories of cited documents

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

A document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 September 2005

Date of mailing of the international search report

07/10/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P. B. 5516 Patentkanal 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Vandenbogaerde, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/GB2005/001478

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0176627	A	18-10-2001	
		AU 4089001 A	23-10-2001
		BR 0109846 A	03-06-2003
		CA 2401836 A1	18-10-2001
		CN 1420786 A	28-05-2003
		EP 1267925 A1	02-01-2003
		JP 2003530357 T	14-10-2003
		NO 20024815 A	02-12-2002
		NZ 520899 A	24-03-2005
		PL 358394 A1	09-08-2004
		US 2003180285 A1	25-09-2003

28

TRATAMIENTO DE INFECCIONES MICÓTICAS

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con composiciones y preparaciones novedosas que comprenden agentes antimicóticos eficaces junto con un anticuerpo el cual se puede incorporar en las composiciones y preparaciones.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las infecciones micóticas son la causa principal de mortalidad en pacientes en la unidad de cuidados intensivos y de manera más general en pacientes inmunocomprometidos y debilitados Gold, J.W.M., 1984, Am. J. Med. 76: 458-463; Klein, R.S. et al., 1984, N. Engl. J. Med. 311: 354-357; Burnie, J.P., 1997, Current Anaesthesia & Critical Care 8: 180-183). La presencia y persistencia de infecciones micóticas se puede atribuir a la presión selectiva de antimicóticos de amplio espectro, la estancia de pacientes con frecuencia prolongada en instalaciones tales como por ejemplo, una unidad de cuidados intensivos, problemas para diagnosticar las infecciones, y la falta de eficacia de los agentes micóticos utilizados en terapia. Mientras que un estricto control higiénico puede dar por resultado en alguna prevención de infecciones micóticas en

un hospital u otro entorno, los brotes de infecciones siguen siendo un problema serio que necesita ser enfrentado.

Aunque la mayoría de las manifestaciones clínicas de las micosis se provocan predominantemente por *Aspergillus fumigatus*, otras especies de *Aspergillus* tales como por ejemplo, *A. flavus*, *A. terreus* y *A. niger* también se asocian con infecciones graves en el hospedero inmunocomprometido (Espinell-Ingroff, A., 2003, J. Clin. Microbiol. 41: 403-409).

La detección y diagnóstico del patógeno micótico responsable de una infección es decisiva para una terapia posterior debido a que los agentes antimicóticos pueden ser más eficaces contra ciertas cepas. GB2240979 y EP0406029 (incorporadas en la presente como referencia en su totalidad) exponen una proteína de resistencia a hongos y un anticuerpo de la misma que se podría utilizar en una prueba sensible y bastante específica para la detección de patógenos micóticos.

Tradicionalmente, las infecciones micóticas provocadas por las especies *Aspergillus* y *Candida* se han tratado mediante el agente antimicótico anfotericina B, considerada como el "estándar de oro" de la terapia antimicótica sistémica (Burnie J.P., 1997, supra). Desafortunadamente, la anfotericina B por sí misma es

bastante tóxica y su utilización se modera por los efectos secundarios entre los que se incluyen escalofríos, fiebre, mialgia o tromboflebitis. Otros agentes antimicóticos incluyen los fármacos orales azol(miconazol, ketoconazol, itraconazol, fluconazol, voriconazol) y 5-fluorocitosina. Sin embargo, muchas especies de hongos se tornan resistentes a los agentes antimicóticos tales como por ejemplo, fluconazol, y estas especies con frecuencia se presentan en pacientes en donde se haya administrado profilácticamente este fármaco. En respuesta a la prevalencia cada vez mayor de cepas resistentes a antimicóticos y a pesar de los avances recientes hechos en fármacos terapéuticos tales como por ejemplo, fluconazol, itraconazol y las variantes sistémicas con base liposomal de la anfotericina B (Burnie, J.P., 1997, supra), sigue habiendo una fuerte necesidad por agentes eficaces para el tratamiento de infecciones micóticas.

La necesidad identificada anteriormente se aborda en la WO 01/76627, que expone una composición para el tratamiento de infecciones micóticas en humanos o animales. La composición comprende un anticuerpo específico para un epítope conservado de la proteína con resistencia a hongos, hsp90, el anticuerpo se combinará con los agentes antimicóticos de polieno conocidos, en particular anfotericina B. Específicamente, el anticuerpo (en lo

sucesivo denominado como Mycograb (RTM)) reconoce el epítoto que se exhibirá por el péptido que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 1, que se conserva a lo largo de muchas especies micóticas. De manera sorprendente, se ha
5 mostrado que la eficacia de la anfotericina B contra una amplia variedad de cepas micóticas patológicamente importantes (por ejemplo, la especie *Candida*) se mejoró significativamente en presencia del anticuerpo, permitiendo con esto ya sea menores dosis de tratamiento o un
10 tratamiento más eficaz con la misma dosis, lo cual permitió una reducción de los efectos secundarios no deseados. Además, la composición expuesta en la WO 01/76627 permite un tratamiento eficaz de las infecciones micóticas que fueron resistentes inherentemente con el agente micótico
15 utilizado en la composición.

De manera importante, fluconazol (un agente antimicótico de azol oral) en combinación con el anticuerpo Mycograb (RTM) mostró tener poca sinergia contra las cepas de *Candida*.

20 Todos los agentes antimicótico de azol funcionan vía un modo acción común, al prevenir la síntesis de ergosterol, el principal componente esteroide de las membranas plasmáticas micóticas, a través de la inhibición de la enzima dependiente del citocromo micótico P450, 14-
25 α -demetilasa. La reducción resultante de ergosterol y la

acumulación concomitante de los precursores 14- α -metilados interfiere con la función global de ergosterol en las membranas micóticas y altera tanto la fluidez de la membrana como la actividad de diversas enzimas unidas a la
5 membrana. El efecto neto es una inhibición del crecimiento y replicación de hongos (Maertens, J.A., 2004, Clin. Microbiol. Infect. 10 (Suppl. 1): 1-10).

Debido a que el fluconazol en combinación con el anticuerpo Mycograb (RTM) exhiben poca sinergia contra las
10 cepas de *Candida*, y el modo de acción de los agentes antimicóticos de azol orales es común, fue lógico que otros agentes antimicóticos de azol orales tales como por ejemplo, miconazol, ketoconazol, itraconazol y voriconazol también pudieran no exhibir sinergia en combinación con el
15 anticuerpo Mycograb (RTM).

Los inventores de la presente actualmente han encontrado que a pesar del hallazgo anterior de que los agentes antimicóticos de azol exhibieron poca o ninguna sinergia con el anticuerpo Mycograb (RTM) expuesto en la
20 WO 01/76627 en el tratamiento de infecciones debidas a las cepas de *Aspergillus* o *Candida*, existe una sinergia terapéutica entre los agentes antimicóticos de azol orales itraconazol y voriconazol, en combinación con el anticuerpo Mycograb (RTM). Los experimentos (posteriormente) han
25 mostrado que esta sinergia hasta ahora limitada a

15

itraconazol y voriconazol, aunque es posible que otros agentes antimicóticos de azol orales que todavía no se hayan probado, o estén en desarrollo también puedan mostrar alguna sinergia con el anticuerpo Mycograb (RTM).

5

SUMARIO DE LA INVENCION

De acuerdo con la presente invención se proporciona una composición que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión con antígenos del mismo específico para al menos un epítipo de hsp90 proveniente de un organismo del género *Aspergillus*, y al menos un agente antimicótico seleccionado del grupo que consiste de: itraconazol y voriconazol.

Además se proporciona una preparación combinada, por ejemplo, un paquete farmacéutico, que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión con antígenos del mismo específico para al menos un epítipo de hsp90 proveniente de un organismo del género *Aspergillus*, y al menos un agente de antimicótico seleccionado del grupo que consiste de: itraconazol y voriconazol, para uso simultáneo, por separado o secuencial en el tratamiento de infecciones micóticas.

Además se proporciona un método para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de infecciones micóticas del cuerpo humano o animal

caracterizado por el uso de un anticuerpo o un fragmento de unión con antígenos del mismo específico para al menos un epítope de hsp90 proveniente de un organismo del género *Aspergillus*, y al menos un agente antimicótico seleccionado del grupo que consiste de: itraconazol y voriconazol.

Además se proporciona el uso de una composición que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión con antígenos del mismo específico para al menos un epítope de hsp90 proveniente de un organismo del género *Aspergillus*, y un agente antimicótico que comprende al menos un agente antimicótico seleccionado del grupo que consiste de: itraconazol y voriconazol, en un método para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de infecciones micóticas.

Los resultados preliminares también indican que posaconazol es capaz de alcanzar resultados sinérgicos similares y así la presente invención también se extiende a las composiciones, preparaciones combinadas, métodos de fabricación y usos de posaconazol y un anticuerpo o un fragmento de unión con antígenos del mismo específico para al menos un epítope de hsp90 proveniente de un organismo del género *Aspergillus*.

El anticuerpo o el fragmento de unión con antígenos del mismo puede ser específico para el epítope exhibido por un péptido que comprende la secuencia de SEQ

ID NO: 1.

El anticuerpo o el fragmento de unión con antígenos del mismo puede ser específico para el epítipo expuesto por un péptido que comprende la secuencia de la

5 SEQ ID NO: 2.

Los anticuerpos, su elaboración y usos son bien conocidos y se exponen en, por ejemplo, Harlow, E. and Lane, D., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 10 1999.

Los anticuerpos se pueden generar utilizando métodos estándar conocidos en la técnica. Los ejemplos de anticuerpos incluyen (aunque no se limitan a) fragmentos policlonales, monoclonales, quiméricos, de una sola cadena, Fab, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión Fab, y los fragmentos de unión con antígenos de los anticuerpos.

Los anticuerpos se pueden producir en una variedad de hospederos, por ejemplo, cabras, conejos, 20 ratas, ratones, seres humanos, y otros. Los mismos se pueden inmunizar mediante la inyección con proteínas con resistencia a hongos, o cualquier fragmento u oligopéptido del mismo que tenga propiedades inmunogénicas. Dependiendo de la especie hospedera, se pueden utilizar diversos 25 adyuvantes para aumentar una respuesta inmunológica. Estos

adyuvantes incluyen de manera enunciativa: geles, minerales de Freund, tales como por ejemplo, hidróxido de aluminio, y sustancias tensoactivas tales como por ejemplo, lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianina de lapa en U, y dinitrofenol. Entre los adyuvantes utilizados en seres humanos, son particularmente útiles BCG (Bacille Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*.

Los anticuerpos monoclonales para proteínas con resistencia a hongos, o cualquier fragmento u oligopéptido del mismo se pueden preparar utilizando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpos mediante líneas celulares continuas en cultivo. Estos incluyen, de manera enunciativa, la técnica de hibridomas, la técnica de hibridomas de linfocitos B humanos, y la técnica de hibridomas EBV (Koehler et al., 1975, Nature, 256: 495-497; Kosbor et al., 1983, Immunol. Today 4: 72; Cote et al., 1983, PNAS USA, 80: 2026-2030; Cole et al., 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss Inc., New York, pp. 77-96).

Además, se pueden utilizar técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos", el empalme de genes de anticuerpos de ratón con genes de anticuerpos humanos para obtener una molécula con una especificidad antigénica y actividad biológica adecuadas (Morrison et

al., 1984, PNAS USA, 81: 6851-6855; Neuberger et al., 1984, Nature, 312: 604-608; Takeda et al., 1985, Nature, 314: 452-454). Alternativamente, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de una sola cadena se pueden
5 adaptar, utilizando métodos conocidos en la técnica, para producir anticuerpos de una sola cadena específicos para proteínas con resistencia a hongos. Los anticuerpos con especificidad relacionada, aunque de distinta composición idiotípica, se pueden generar mediante la mezcla de cadenas
10 provenientes de las bibliotecas de inmunoglobulina combinatoria aleatorias (Burton, D.R., 1991, PNAS USA, 88: 11120-11123).

Los anticuerpos también se pueden producir al inducir la producción *in vivo* en la población de linfocitos
15 o mediante la selección de bibliotecas de inmunoglobulina recombinante o paneles de reactivos de unión bastante específicos (Orlandi et al., 1989, PNAS USA, 86: 3833-3837; Winter, G., et al., 1991, Nature, 349: 293-299).

También se pueden generar fragmentos de unión con
20 antígenos, por ejemplo los fragmentos F(ab')₂ que se pueden producir mediante la digestión de pepsina de la molécula de anticuerpo y los fragmentos Fab que se pueden generar al reducir los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. Alternativamente, las bibliotecas de expresión Fab se
25 pueden construir para permitir una identificación rápida y

fácil de los fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada (Huse et al., 1989, Science, 256: 1275-1281).

Se pueden utilizar diversos inmuno-análisis para
5 selección e identificar anticuerpos que tengan la
especificidad deseada. Muchos protocolos para la unión
competitiva o análisis inmuno-radiométricos que utilizan
anticuerpos ya sea policlonales o monoclonales con
especificidades establecidas son bien conocidos en la
10 técnica. Estos inmuno-análisis típicamente implican la
medición de la formación de complejos entre la proteína con
resistencia a hongos o cualquier fragmento u oligopéptido,
del mismo, y su anticuerpo específico. Se puede utilizar
un inmuno-análisis con base monoclonal, de dos sitios,
15 utilizando anticuerpos monoclonales específicos para dos
epítopes de proteína con resistencia a hongos sin
interferencia, aunque también se puede emplear un análisis
de unión competitiva (Maddox et al., 1983, J., Exp. Med.,
158: 1211-1216).

20 Por ejemplo, el anticuerpo utilizado en la
composición o preparación combinada puede comprender la
secuencia de SEQ ID NO: 3.

La composición o la preparación combinada se
puede utilizar en el tratamiento de infecciones micóticas.
25 La infección micótica puede ser debida a un organismo del

género *Aspergillus*.

La infección micótica puede ser resistente al agente antimicótico *per se*.

La composición o la preparación combinada se
5 puede utilizar en un método para el tratamiento de infecciones micóticas del cuerpo humano o animal.

La composición o preparación adicionalmente puede comprender un portador diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. De manera similar, cualquier
10 método de fabricación de la presente invención o uso de la misma forma también comprende el uso de un portador diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de portadores diluyentes y excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la
15 técnica, por ejemplo véase: Remington's Pharmaceutical Sciences and US Pharmacopoeia, (1984, Mack Publishing Company, Easton, PA, USA).

Además se proporciona un método para el tratamiento de infecciones micóticas del cuerpo humano o
20 animal que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o un fragmento de unión con antígenos del mismo específico para al menos un epítope de hsp90 proveniente de un organismo del género *Aspergillus*, y al menos un agente antimicótico seleccionado
25 del grupo que consiste de: itraconazol y voriconazol, a un

paciente que necesita del mismo.

La composición o preparación combinada se puede administrar oralmente.

Además se proporciona un equipo que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión con antígenos del mismo específico para al menos un epítipo de hsp90 proveniente de un organismo de *Aspergillus*, y al menos un agente antimicótico seleccionado del grupo que consiste de: itraconazol y voriconazol.

El equipo se puede utilizar en el tratamiento de infecciones micóticas.

El anticuerpo o fragmento de unión con antígenos del mismo de acuerdo con la presente invención se puede marcar con una marca detectable o se puede conjugar con una molécula efectora, por ejemplo un fármaco, por ejemplo, un agente anti-micótico tal como por ejemplo, itraconazol o voriconazol, o una toxina, tal como por ejemplo, ricina, o una enzima, utilizando procedimientos convencionales, y la invención se extiende a estos anticuerpos marcados o conjugados de anticuerpos.

Si se desea, se pueden utilizar mezclas de anticuerpos para el diagnóstico o tratamiento, por ejemplo, mezclas de dos o más anticuerpos que reconozcan diferentes epítopes de una proteína con resistencia a hongos de acuerdo con la invención, y/o mezclas de anticuerpos de una

clase diferente, por ejemplo, mezclas de anticuerpos IgG e IgM que reconozcan los mismos o diferentes epítopes de la invención.

El contenido de cada una de las referencias expuestas en la presente, incluyendo las referencias citadas en la presente, se incorporan en la presente como referencia en su totalidad.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención será más evidente a partir de la siguiente descripción, que muestra, a manera de ejemplo únicamente, las modalidades específicas de la composición y experimentación con la misma.

EXPERIMENTOS

Los experimentos descritos enseguida investigaron el efecto antimicótico del anticuerpo Mycograb (RTM) utilizado en combinación con los agentes antimicóticos anfotericina B, caspofungina, voriconazol e itraconazol. El anticuerpo Mycograb (RTM) reconoce los epítopes exhibidos por los péptidos que tienen la secuencia de las SEQ ID NOs: 1 y 2. Los resultados muestran que se demuestra un efecto sinérgico sorprendentemente importante para voriconazol e itraconazol en combinación con el anticuerpo Mycograb (RTM) contra una variedad de especies de *Aspergillus* clínicamente

importantes. Este efecto sinérgico tiene implicaciones significativas para el tratamiento clínico de infecciones micóticas.

5 **Materiales y Métodos**

Agentes antimicóticos

Se prepararon soluciones concentradas de anfotericina B (AMB, Sigma), caspofungina (Caspofungina), voriconazol (VOR) e itraconazol (ITZ) de acuerdo con el Comité Nacional para los Estándares Clínicos de Laboratorio (M38-A) en RPMI 1640 con medio en caldo de glutamina, amortiguado a pH 7.0 con 0.165 mmol/litro de ácido morfolinopropansulfónico (MOPS). Se prepararon soluciones concentradas de AMB como una serie 100 x en dimetilsulfóxido (DMSO) al 100% y se diluyeron en el medio a una concentración que varía de 0.03125 hasta 16 g/ml. Caspofungina, voriconazol e itraconazol se probaron a una variación de concentración de 0.03125 hasta 1024 g/ml, y Mycograb (RTM) (NeuTec Pharma plc) a una variación de concentración de 0.25 hasta 1024 g/ml.

Aislados de prueba

Los aislados clínicos de *Aspergillus fumigatus* (2), *A. flavus* (1), *A. terreus* (1) y *A. niger* (1) se obtuvieron del Department on Microbiology, Manchester

Royal Infirmary, Manchester, UK.

Anticuerpo

La secuencia del ADN del anticuerpo Mycograb
5 (RTM) que es específico para un epítoto de la proteína con
resistencia al hongo hsp90 que tiene la secuencia de SEQ ID
NO: 1 (como se expone en GB2240979 y EP0406029) se modificó
genéticamente mediante la optimización de codones para la
expresión en *Escherichia coli* (Operon Technologies Inc.,
10 Alameda, CA, USA) y se insertó en un vector de expresión de
E. coli. La secuencia de aminoácidos del Mycograb (RTM) de
la presente invención comprende la secuencia de SEQ ID NO:
3 (incluye los dominios pesados ligeros y separadores).

El anticuerpo Mycograb (RTM) se expresó en un
15 hospedero de *Escherichia coli* y se purificó mediante
cromatografía de afinidad utilizando una columna para
intercambio de imidazoles utilizando protocolos de biología
molecular estándar (véase, por ejemplo, Harlow & Lane,
supra; Sambrook, J. et al., 1989, Molecular Cloning: A
20 Laboratory Manual, 2ª Edición, Cold Spring Harbor
Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Sambrook,
J. & Russell, D., 2001, Molecular Cloning: A Laboratory
Manual, 3ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press,
Cold Spring Harbor). El anticuerpo Mycograb (RTM) se aisló
25 a una pureza de hasta el 95%.

Las formulaciones del anticuerpo Mycograb (RTM) se prepararon como sigue: un vial que contuvo 10 mg del anticuerpo Mycograb (RTM) puro, 150 mg de urea de grado farmacéutico (Ph Eur) y 174 mg de L-arginina (Ph Eur) se reconstituyeron en 5 ml de agua.

Reactividad cruzada del anticuerpo Mycograb (RTM) con Aspergillus sp. hsp90

Se había utilizado inmuno-transferencia para disecar la respuesta de anticuerpos a *Aspergillus fumigatus* en pacientes con aspergilosis broncopulmonar alérgica, aspergiloma, y aspergilosis invasiva. Estos múltiples antígenos identificados de peso molecular varían de 18-92 kDa. Un antígeno a 88 kDa se identificó como un homólogo hsp90 con base en su reacción cruzada con el anticuerpo Mycograb (RTM) (Burnie, J.P., and R.C. Matthews. 1991. J. Clin. Microbiol. 29: 2099-106). El mapeo de epítopes ha revelado que el anticuerpo Mycograb (RTM) es reactivo hacia el epítipo exhibido por el péptido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 2 que se conserva tanto en *A. fumigatus* como en *A. niger*.

Prueba de susceptibilidad antimicótico

Las concentraciones inhibidoras mínimas (MIC, por sus siglas en inglés) de anfotericina B, caspofungina,

voriconazol e itraconazol, y el anticuerpo Mycograb (RTM) se determinaron mediante microdilución en caldo de acuerdo con el Comité Nacional para los Estándares Clínicos de Laboratorio documento M38-A. En resumen, las

5 concentraciones de AMB (0.03125 a 16 µg/ml), caspofungina, voriconazol e itraconazol (0.03125 a 1024 µg/ml) y Mycograb (RTM) (0.25 a 1024 µg/ml) se probaron solas y en combinación mediante valoraciones finales y verificación en tablero de la MIC. Se preparó una suspensión de inóculos

10 en RPMI amortiguado con medio de glutamina al probar colonias provenientes de una placa Sabouraud de 7 días. La suspensión se ajustó a 0.09-0.11 (80% a 82% de transmitancia) para la especie *Aspergillus*, 0.15-0.17 (68% a 70% de transmitancia). El inóculo se diluyó

15 adicionalmente a 1:2 cuando se agregó a los agentes antimicóticos en el análisis (inóculo final $(0.4 \times 10^4$ hasta 0.5×10^4). Para AMB y Mycograb (RTM), ya sea solos o en combinación, el punto final se determinó, la concentración para no producir crecimiento (MIC-0). Se

20 incubaron placas de microvaloración a 37°C sin agitación durante 48 horas para la especie *Aspergillus*. Para caspofungina, voriconazol e itraconazol, ya sea solos o en combinación con el anticuerpo Mycograb (RTM), el punto final MIC se determinó como la concentración resultante en

25 una disminución prominente de turbidez ($\geq 50\%$ de inhibición

de crecimiento, MIC-2) en comparación con el control de crecimiento (Keele et al. 2001; Espinel-Ingroff 2003). La concentración inhibidora final (FIC, por sus siglas en inglés) se calculó para cada fármaco al dividir la MIC en presencia del segundo fármaco entre la MIC en su ausencia. Para cada combinación, se produjeron dos fracciones que se sumaron para producir la concentración inhibidora final fraccional. La sinergia se definió mediante el valor de ≤ 0.5 , la indiferencia se definió mediante un valor de > 0.5 hasta < 4.0 , y el antagonismo se definió mediante un valor de ≥ 4.0 (Matthewset et al., 2003).

Resultados

El anticuerpo Mycograb (RTM), además de reconocer al epítotope exhibido por el péptido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1, también reconoció el epítotope de la especie *Aspergillus* conservado, exhibido por el péptido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 2.

Los experimentos *in vitro* que examinan el efecto de combinar un anticuerpo Mycograb (RTM) y agentes antimicóticos se presentan en las tablas 1-4.

Tabla 1. Análisis para verificación en tablero de anfotericina B y el anticuerpo Mycograb (RTM) contra la especie *Aspergillus*

Capa	Agente	MIC-0 (µg/ml) de cada agente		FIC (µg/ml)	FICI	Resultado
		Solo	Combinación			
5	<i>A. fumigatus</i>	AMB	2	1	0.5	Indiferente
		Mycograb	512	4	0.001	
	<i>A. fumigatus</i>	AMB	2	1	0.5	Indiferente
		Mycograb	512	16	0.031	
	<i>A. niger</i>	AMB	2	1	0.5	Indiferente
		Mycograb	512	4	0.01	
10	<i>A. flavus</i>	AMB	4	4	1	Indiferente
		Mycograb	512	512	1	
	<i>A. terreus</i>	AMB	4	4	1	Indiferente
		Mycograb	512	512	1	

Tabla 2. Análisis para verificación en tablero de caspofungina y el anticuerpo Mycograb (RTM) contra la especie *Aspergillus*

Capa	Agente	MIC-1 (µg/ml) de cada agente		FIC (µg/ml)	FICI	Resultado
		Solo	Combinación			
	<i>A. fumigatus</i>	Caspo	0.125	0.0625	0.5	Indiferente
		Mycograb	1024	32	0.062	
20	<i>A. fumigatus</i>	Caspo	0.125	0.0625	0.5	Indiferente
		Mycograb	1024	16	0.062	
	<i>A. niger</i>	Caspo	1	0.125	0.125	Sinergia
		Mycograb	256	0.0625	0.0001	
	<i>A. flavus</i>	Caspo	1	0.5	0.5	Indiferente
		Mycograb	512	0.0625	0.0001	
25	<i>A. terreus</i>	Caspo	0.33125	0.078	0.25	Sinergia
		Mycograb	1024	32	0.031	

Tabla 3. Análisis para verificación en tablero de itraconazol y el anticuerpo Mycograb (RTM) contra la especie *Aspergillus*

Cepa	Agente	MIC-2 (µg/ml) de cada agente		FIC (µg/ml)	FICI	Resultado
		Solo	Combi- ación			
<i>A. fumigatus</i>	ITZ	0.5	0.0312	0.0625	0.0781	Sinergia
	Mycograb	1024	16	0.016		
<i>A. fumigatus</i> CI2	ITZ	0.5	0.125	0.25	0.2578	Sinergia
	Mycograb	1024	8	0.008		
<i>A. niger</i>	ITZ	0.125	0.0156	0.125	0.375	Sinergia
	Mycograb	16	4	0.25		
<i>A. flavus</i>	ITZ	0.125	0.0312	0.25	0.25	Sinergia
	Mycograb	512	0.25	0.0005		
<i>A. terreus</i>	ITZ	0.125	0.0312	0.25	0.281	Sinergia
	Mycograb	1024	32	0.031		

Tabla 4. Análisis para verificación en tablero de voriconazol y el anticuerpo Mycograb (RTM) contra la especie *Aspergillus*

Cepa	Agente	MIC-2 (µg/ml) de cada agente		FIC (µg/ml)	FICI	Resultado
		Solo	Combi- nación			
<i>A. fumigatus</i>	VOR	0.0625	0.0312	0.0312	0.5	Sinergia
	Mycograb	1024	0.25	0.25		
<i>A. fumigatus</i> CI2	VOR	0.25	0.125	0.125	0.5	Sinergia
	Mycograb	1024	0.25	0.25		
<i>A. niger</i>	VOR	0.125	0.125	0.125	2	Indiferente
	Mycograb	16	16	16		
<i>A. flavus</i>	VOR	0.25	0.0625	0.0625	0.25	Sinergia
	Mycograb	512	0.25	0.25		
<i>A. terreus</i>	VOR	0.25	0.125	0.125	0.5	Sinergia
	Mycograb	1024	0.25	0.25		

Resumen

Los resultados mostrados en las Tablas 1-4 revelan que mientras que el anticuerpo Mycograb (RTM) por sí mismo fue capaz de inhibir el crecimiento de ciertas especies de *Aspergillus*, se observó un nivel sorprendentemente alto de actividad antimicótica contra todas las especies examinadas cuando se utilizó el anticuerpo en combinación con itraconazol, y un nivel sorprendentemente alto de actividad antimicótica contra todas las especies examinadas excepto para *A. niger* se observó cuando se utilizó el anticuerpo en combinación con voriconazol. Este efecto sorprendente entre el anticuerpo e itraconazol/voriconazol no se observa con otros agentes antimicóticos de azol orales tales como por ejemplo, fluconazol, o con anfotericina B o caspofungina cuando se combina con el anticuerpo.

Conclusiones

Los datos presentado demuestran claramente que existe un sinergismo sorprendente entre el anticuerpo Mycograb (RTM) y los agentes antimicóticos itraconazol y voriconazol, cuyos efectos mejoraron la actividad antimicótica contra una amplia variedad de cepas de *Aspergillus* patológicamente importante. Estos resultados permiten la utilización de composiciones que comprenden ya

sea itraconazol y voriconazol, junto con el anticuerpo Mycograb (RTM) para el tratamiento de infecciones micóticas en humanos o animales. La presente invención permite ya sea disminuir las dosificaciones de tratamiento o un
5 tratamiento más eficaz a las mismas dosificaciones, reduciendo con esto los efectos secundarios no deseados.

Existen diversas implicaciones clínicas importantes de la presente invención. En primer lugar, la producción de una combinación sinérgica de
10 itraconazol/voriconazol y el anticuerpo Mycograb (RTM) en el tratamiento de infecciones por *Aspergillus* debe tornarse el tratamiento de elección. Esto podría conducir a una reducción en la mortalidad y morbilidad para estas infecciones. En segundo lugar, itraconazol/voriconazol se
15 asocian con efectos secundarios no deseados en sujetos que reciben el fármaco. Por ejemplo, voriconazol se asocia de manera muy común con fiebre, dolor de cabeza, dolor abdominal, náuseas, vómito, diarreas, edema periférico, salpullido cutáneo, y trastornos visuales. La sinergia
20 proporcionada por la presente invención significa que se podría utilizar una dosis menor de ya sea itraconazol/voriconazol mientras que se mantenga la eficacia y se reduzca concomitantemente la toxicidad y efectos secundarios adversos. En tercer lugar, el efecto
25 moderado de toxicidad del anticuerpo Mycograb (RTM) podría

permitir que la eficacia clínica de dosis mayores de itraconazol/voriconazol ser explore y contribuya adicionalmente a un resultado clínico mejorado.

NOVEDAD DE LA INVENCION

Habiendo descrito el presente invento, se considera como una novedad y, por lo tanto, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes

5

REIVINDICACIONES:

1. Una composición caracterizada porque comprende un anticuerpo o un fragmento de unión con antígenos del mismo específico para al menos un epítoto de hsp90 proveniente de un organismo del género *Aspergillus*, y al menos un agente antimicótico seleccionado del grupo que consiste de: itraconazol y voriconazol.

2. Una preparación combinada caracterizada porque comprende un anticuerpo o un fragmento de unión con antígenos del mismo específico para al menos un epítoto de hsp90 proveniente de un organismo del género *Aspergillus*, y al menos un agente antimicótico seleccionado del grupo que consiste de: itraconazol y voriconazol, para el uso simultáneo, por separado o secuencial en el tratamiento de infecciones micóticas.

3. La composición según la reivindicación 1 o la preparación combinada según la reivindicación 2, caracterizadas porque el anticuerpo o un fragmento de unión con antígenos del mismo es específico para el epítoto exhibido por el epítoto que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1.

4. La composición según la reivindicación 1 o la reivindicación 3, o la preparación combinada según la reivindicación 2 o la reivindicación 3, caracterizadas porque el anticuerpo o un fragmento de unión con antígenos del mismo es específico para el epítoto exhibido por el péptido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 2.

5. La composición o la preparación combinada según la reivindicación 3 o la reivindicación 4, caracterizada porque el anticuerpo comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3.

6. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 3 a 5, o la preparación combinada según cualquier de las reivindicaciones 2 a 5 para utilizarse en el tratamiento de infecciones micóticas.

7. La composición o la preparación combinada según la reivindicación 6, caracterizadas porque la infección micótica es debida a un organismo del género *Aspergillus*.

8. La composición o preparación combinada según la reivindicación 5 o la reivindicación 6, caracterizadas porque la infección micótica es resistente al agente antimicótico *per se*.

9. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 3 a 8, o la preparación combinada según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8 para

utilizarse en un método de tratamiento de infecciones micóticas del cuerpo humano o animal.

10. Un método para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de infecciones micóticas
5 del cuerpo humano o animal caracterizado por el uso de un anticuerpo o un fragmento de unión con antígenos del mismo específico para al menos un epítoto de hsp90 proveniente de un organismo del género *Aspergillus*, y al menos un agente antimicótico seleccionado del grupo que consiste de:
10 itraconazol y voriconazol.

11. El uso de una composición que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión con antígenos del mismo específico para al menos un epítoto de hsp90 proveniente de un organismo del género *Aspergillus*, y un agente
15 antimicótico que comprende al menos un agente antimicótico seleccionado del grupo que consiste de: itraconazol y voriconazol, en un método para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de infecciones micóticas.

12. El uso de la composición según la
20 reivindicación 11, caracterizado porque la infección micótica es resistente al agente antimicótico *per se*.

13. Un método para el tratamiento de infecciones micóticas del cuerpo humano o animal caracterizado porque comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz
25 de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1

ó 3 a 8, o una preparación combinada según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8 a un paciente que necesita del mismo.

14. El método según la reivindicación 13, caracterizado porque la composición o preparación combinada
5 se administran oralmente.

15. Un equipo caracterizado porque comprende un anticuerpo o un fragmento de unión con antígenos del mismo específico para al menos un epítopo de hsp90 proveniente de un organismo del género *Aspergillus*, y al menos un agente
10 antimicótico seleccionado del grupo que consiste de: itraconazol y voriconazol.

16. El equipo según la reivindicación 15, para utilizarse en el tratamiento de infecciones micóticas.

17. La composición según cualquiera de las
15 reivindicaciones 1 ó 3 a 8 o la preparación combinada según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, caracterizados porque el anticuerpo o fragmento de unión con antígenos se marca con una marca detectable.

18. La composición según cualquiera de las
20 reivindicaciones 1 ó 3 a 8 o la preparación combinada según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, caracterizados porque el anticuerpo o fragmento de unión con antígenos se conjuga con una molécula efectora.

19. La invención como se describió
25 sustancialmente en lo anterior con referencia a los ejemplos.

57

RESUMEN DE LA INVENCION

Se expone una composición que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión con antígenos del mismo específico para al menos un epítope de hsp90 proveniente de
5 un organismo del género *Aspergillus*, y al menos un agente antimicótico seleccionado del grupo que consiste: itraconazol y voriconazol.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> NeuTec Pharma PLC

<120>

<130> GDM/JR-MP101019-WO

<160> 3

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> Candida sp.

<400> 1

Asn	Lys	Ile	Leu	Lys	Val	Ile	Arg	Lys	Asn	Ile	Val
1				5					10		

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> Aspergillus sp.

<400> 2

Lys	Ile	Met	Lys	Val	Ile
1				5	

<210> 3

<211> 248

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 3

His Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 1 5 10 15
 Pro Gly Glu Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Cys Ile Ile
 20 25 30
 Ser Ser Tyr Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Met Gly Lys Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Ile Asn Tyr Ser
 50 55 60
 Pro Ser Phe Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Asn
 65 70 75 80
 Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met
 85 90 95
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Arg Asp Phe Gly Asp Ser Phe Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 115 120 125
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Val Val Met Thr Gln
 130 135 140
 Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Phe Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr
 145 150 155 160
 Cys Arg Ala Ser Ser Gly Ile Ser Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
 165 170 175
 Ala Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu
 180 185 190
 Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu
 195 200 205
 Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
 210 215 220
 Tyr Cys Gln His Leu Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr
 225 230 235 240
 Lys Val Asp Ile Lys Arg Ala Ala
 245

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No
PCT/GB2005/001478

International filing date (day/month/year)
18.04.2005

Priority date (day/month/year)
23 04 2004

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
A61K39/395, A61K31/498, A61K31/506, A61P31/10

Applicant
NEUTEC PHARMA PLC

1 This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No I Basis of the opinion
- ☐ Box No II Priority
- ☒ Box No III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No V Reasoned statement under Rule 43bis 1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability, citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No VI Certain documents cited
- ☐ Box No VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No VIII Certain observations on the international application

2 FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA"). However, this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66 1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of three months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220

3 For further details, see notes to Form PCT/ISA/220

Name and mailing address of the ISA



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel +49 89 2399 - 0 Tx 523656 epmu d
Fax +49 89 2399 - 4485

Authorized Officer

Vandenbogaerde, A

Telephone No +49 89 2399-7874



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No
PCT/GB2005/001478

Box No. I Basis of the opinion

- 1 With regard to the language, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item
 - ☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3 and 23 1(b))
- 2 With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of
 - a type of material:
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b format of material
 - ☒ in written format
 - ☒ in computer readable form
 - c time of filing/furnishing
 - ☒ contained in the international application as filed.
 - ☒ filed together with the international application in computer readable form
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
- 3 ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished
- 4 Additional comments

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

- ☐ the entire international application,
- ☒ claims Nos. 1-18 (part), 13-14 (with respect to industrial applicability), 19

because

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 13-14 (with respect to industrial applicability) relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*).

see separate sheet

- ☒ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. 1-18 (part), 19 are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*)

see separate sheet

- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.
- ☐ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos.
- ☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that

the written form

- ☐ has not been furnished
- ☐ does not comply with the standard

the computer readable form

- ☐ has not been furnished
- ☐ does not comply with the standard

- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions
- ☐ See separate sheet for further details

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/GB2005/001478

Box No. V Reasoned statement under Rule 43b/a.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	1-18 (part)
	No: Claims	
inventive step (IS)	Yes: Claims	1-18 (part)
	No: Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-12, 15-18: YES - 13-14: see separate sheet
	No: Claims	

2 Citations and explanations

see separate sheet

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

- III.1 Claims 13-14 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67 1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(i) PCT).
- III.2 Claim 19 does not meet the requirements of Article 6 PCT, because the scope the claim is unclear. Consequently, no opinion will be formulated with respect to novelty, inventive step and industrial applicability of the subject-matter of this claim.
- III.3 Claims 1-18 lack clarity and support of disclosure within the meaning of Article 6 and Article 5 PCT, because the functional definition of compounds given in said claims, namely antibody or antigen binding fragment specific for at least one epitope of hsp90 from an organism of the *Aspergillus* genus, merely refers to the technical effect of the desired compounds and does not provide in any way information as to the structural or technical features of the compounds. Hence, said functional definition puts an undue burden on the skilled person seeking to establish the scope of the claims and willing to carry out the invention over the whole of the broad field claimed.

Due to the objection raised above and for the purpose of this Opinion, claims 1-18 have been read as if the compounds mentioned therein were restricted to specific compounds mentioned in claim 5, namely an antibody specific for at least one epitope of hsp90 from an organism of the *Aspergillus* genus wherein the antibody comprises the sequence of SEQ ID NO: 3.

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

Reference is made to the following document

D1: WO 01/76627 A (NEUTEC PHARMA PLC, BURNIE, JAMES, PETER)
18 October 2001 (2001-10-18)

- D1 discloses (cf. abstract, claims 6-8) a composition comprising (i) an antibody specific for at least one epitope of a fungal stress protein wherein the antibody comprises the sequence of SEQ ID NO: 2 (which corresponds to the antibody of the present application comprising the sequence of SEQ ID NO: 3) and (ii) at least one antifungal agent selected from the group consisting of amphotericin B or LY303366 for the treatment of antifungal infections.

Insofar as the claims relate to a combination of (I) an antibody specific for at least one epitope of hsp90 from an organism of the Aspergillus genus wherein the antibody comprises the sequence of SEQ ID NO: 3 and (II) at least one antifungal agent selected from the group consisting of itraconazole and voriconazole, the following is to be noted on novelty and inventive step:

V.1 Claims 1-9 and claims 15-18 - Composition (for use in medicine): Novelty - Inventive step

V.1.1 The subject-matter of claims 1-9 and 15-18 relates to a composition comprising (i) an antibody specific for at least one epitope of hsp90 from an organism of the Aspergillus genus wherein the antibody comprises the sequence of SEQ ID NO: 3 and (ii) at least one antifungal agent selected from the group consisting of itraconazole and voriconazole, and its use in medicine.

V.1.2 The subject-matter of claims 1-9 and 15-18 is novel according to Article 33(2) PCT and can be considered as involving an inventive step in the sense of Article 33(3) PCT for the following reasons. Document D1, which is considered to represent the most relevant state of the art, discloses (cf. abstract, claims 6-8) a composition comprising (i) an antibody specific for at least one epitope of a fungal stress protein wherein the antibody comprises the sequence of SEQ ID NO: 2 (which corresponds to the antibody of the present application comprising the sequence of SEQ ID NO: 3) and (ii) at least one antifungal agent selected from the group consisting of amphotericin B or LY303366 for the treatment of antifungal infections, from which the subject-matter of claims 1-9 differs in that the same antibody is combined with a different antifungal agent. The problem to be solved by the present invention may therefore be regarded as the provision of a composition comprising the described antibody combined with an alternative fungal agent for the treatment of antifungal infections. The data of the present application show a synergistic antifungal effect for the composition comprising the described antibody combined with itraconazole and voriconazole. This effect

is thus the more surprising in view of the fact that the antibody combined with an antifungal agent of the same class, i.e. fluconazole, did not produce a synergistic effect (cf. 'D1 page 28 paragraph 2).

V.2 Claim 10 - Method of manufacture

- V.2.1 The subject-matter of claim 10 relates to the method of manufacture characterised in the use of (i) an antibody specific for at least one epitope of hsp90 from an organism of the *Aspergillus* genus wherein the antibody comprises the sequence of SEQ ID NO. 3 and (ii) at least one antifungal agent selected from the group consisting of itraconazole and voriconazole for the treatment of fungal infections.
- V.2.2 The subject-matter of claim 10 is novel according to Article 33(2) PCT and can be considered as involving an inventive step in the sense of Article 33(3) PCT for the same reasons as mentioned under point V.1.2.

V.3 Claims 11-14 - Therapeutical application: Novelty - Inventive step

- V.3.1 The subject-matter of claims 11-14 relates to the therapeutical application of a composition comprising (i) an antibody specific for at least one epitope of hsp90 from an organism of the *Aspergillus* genus wherein the antibody comprises the sequence of SEQ ID NO. 3 and (ii) at least one antifungal agent selected from the group consisting of itraconazole and voriconazole for the treatment of fungal infections.
- V.3.2 The subject-matter of claims 11-14 is novel according to Article 33(2) PCT and can be considered as involving an inventive step in the sense of Article 33(3) PCT for the same reasons as mentioned under point V.1.2.

V.4 Industrial applicability

For the assessment of the present claims 11-14 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/GB2005/001478

67

use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION

[☒]

MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [☒]
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [☒]
- ◆ Descripción de la invención [☒]
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [☒]

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []


Firma Responsable

Fecha 22 de Nov 2006

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

23-NOV-06

1) SOLICITUD DE:			
☒ Patente de invención		☐ Patente de Modelo de Utilidad	
☒ Capítulo I		☐ Capítulo II.	
2) SOLICITANTE (71)	Nombre: NEUTEC PHARMA PLC Dirección: Clinical Sciences Building Central Manchester Healthcare Trust, Oxford Road Manchester, Lancashire M13 9WL Gran Bretaña Nacionalidad o domicilio: Manchester, Lancashire, Gran Bretaña Lugar de constitución: Gran Bretaña		IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT: ☐ C.E. ☐ OTRO ☐ Cual _____ NÚMERO _____
	Teléfono: _____ Fax: _____ E. Mail: _____		
3) REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN Dirección: Carrera 11 N° 86-53 Piso 6 Bogotá D C Teléfono: 6181088 Fax: 6350824 E. Mail: info@clarkemodet.com.co		IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT: ☐ C.E. ☐ OTRO ☐ NÚMERO: 41.654.882 TP: 20824 CSJ
4) INVENTOR (ES) (72)	Nombre: 1. BURNIE, James, Peter; 2. MATTHEWS, Ruth, Christine Dirección: 1. 1 Greystoke Drive, Alderley Edge, Cheshire SK9 7 PY, Gran Bretaña; 2. 1 Greystoke Drive, Alderley Edge, Cheshire SL9 7 PY Gran Bretaña Nacionalidad o Domicilio: Gran Bretaña		
5) PCT (86) Solicitud Internacional No PCT/GB2005/001478 Fecha: Abril 18 de 2005 Publicación Internacional No WO2005/102386 A1 Fecha: Nov. 3, 2005			
6) Título (54) TRATAMIENTO DE INFECCIONES MICÓTICAS			
7) Clasificación Internacional: A61K 39/395, 31/496, 31/506, A61P 31/10/(A61K 39/395, 31:496) (A61K 39/395, 31:506)			
8) PRIORIDAD		33) País de Origen	(32) Fecha
SI ☒ NO ☐		Gran Bretaña	Abril 23, 2004
			(31) Número de Solicitud 0409077.5
9) Comprobante de pago N° 06-75,814 Fecha: Octubre 2, 2006			
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario Ver reverso de esta pagina			

NOVEDAD DE LA INVENCION

Habiendo descrito el presente invento, se considera como una novedad y, por lo tanto, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes

REIVINDICACIONES:

1. Una composición caracterizada porque comprende un anticuerpo o un fragmento de unión con antígenos del mismo específico para al menos un epítoto de hsp90 proveniente de un organismo del género *Aspergillus*, y al menos un agente antimicótico seleccionado del grupo que consiste de: itraconazol y voriconazol.

15 2. Una preparación combinada caracterizada porque comprende un anticuerpo o un fragmento de unión con antígenos del mismo específico para al menos un epítoto de hsp90 proveniente de un organismo del género *Aspergillus*, y al menos un agente antimicótico seleccionado del grupo que consiste de: itraconazol y voriconazol, para el uso simultáneo, por separado o secuencial en el tratamiento de infecciones micóticas.

20 3. La composición según la reivindicación 1 o la preparación combinada según la reivindicación 2, caracterizadas porque el anticuerpo o un fragmento de unión con antígenos del mismo es específico para el epítoto exhibido por el epítoto que tiene la secuencia de SEQ ID

25 NO: 1.

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
RODRIGUEZ DILIA MARIA

REFERENCIA	Radicación No.	6 118138
	Solicitud internacional	PCT/GB2005/001478
	Fecha inicio fase nacional	23/11/2006
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	14706

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.
2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 2 DIC. 2006 aalvarado

P-855