

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES**

2020
Bogotá, D.C.,

Abogado
ALVARO CORREA ORDOÑEZ

ASUNTO	Radicación	08 095 703
	Trámite	011
	Evento	378
	Actuación	519
	Oficio	
	Folios	10

1 2526

Patente de Invención

☒

Patente de Modelo de Utilidad

☐

Vía Nacional

☐

Vía PCT (Fase Nacional)

☒

Capítulo I

☒

Capítulo II

☐

No. Solicitud Internacional

PCT/US2007/063685

Fecha de Presentación Internacional

09/Marzo/2007

Como resultado del Examen de Fondo realizado, con fundamento en el Artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se comunica:

1. Documentos estudiados

Descripción:	Folios 64 a 220	10/Septiembre/2008
Reivindicaciones:	Folios 221 a 233	10/Septiembre/2008
	Folios 384 a 396	03/Mayo/2010
Dibujos:	Folios 235 a 263	10/Septiembre/2008
Secuencias:	Folios 264 a 333	10/Septiembre/2008
Prioridad:	US 60/781,346	10/Marzo/2006
	US 60/891,248	23/Febrero/2007

2. Análisis de la Prioridad

Se acepta la reivindicación de prioridad porque esta solicitud fue presentada dentro del plazo establecido (Art. 9 D 486) y su contenido técnico corresponde con el de la prioridad reivindicada.

3. Objeto de la invención

Título de la solicitud: "Anticuerpos Anti-5T4 y Usos de los Mismos".

El problema planteado en esta solicitud consiste en la necesidad de suministrar nuevos anticuerpos anti-5T4, conjugados anti-5T4/fármaco, métodos para producir los anticuerpos descritos y conjugados de anticuerpo/fármaco.

Expediente 08 095 703 1er Art 45

Para resolver este problema técnico la solicitud en estudio proporciona anticuerpos que se unen de manera específica al antígeno 5T4 humano, en donde el anticuerpo (a) comprende un dominio de unión a antígeno de los anticuerpos A1, A2, o A3 murinos; (b) compete para la unión de 5T4 con los anticuerpos A1, A2, o A3 murinos; (c) se une a un epítipo de 5T4 unido por los anticuerpos A1, A2, o A3; o (d) comprende un fármaco de unión a 5T4 de un anticuerpo de (a) – (c).

El objeto de la presente Solicitud se relaciona con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP): C07K 16/00, A61K 39/395 y C07K 14/47.

4. No es una invención (Art 15 D 486 literal (b))

El objeto de las reivindicaciones 1, 3 – 10 y 40 – 47 no se considera una invención, de acuerdo con el Art citado.

5. Reivindicaciones relativas a un uso o a un segundo uso (Art 14 y 21 D 486)

No obstante, las reivindicaciones 36 - 39 se encuentran encabezadas como composición, esta se encuentra definida por su uso, por lo tanto no es patentable de acuerdo con el Art 14.

6. De la Solicitud de Patente

Título

El título de la solicitud hace referencia a "usos", se sugiere modificar el título eliminando la referencia a los mismos, puesto que, estos no son patentables.

Reivindicaciones (Art 30 D 486, Art 22 PCT)

La reivindicación 11 se refiere a un anticuerpo humanizado o quimérico, sin definir sus secuencias, esta forma de definirlo no es adecuada porque no permite caracterizar al anticuerpo. Se sugiere definir al anticuerpo por su estructura completa con las secuencias que lo conforman en la cadena ligera y cadena pesada, o las secuencias variables de las cadenas ligera y pesada incluyendo las secuencias de los 6 CDR's que conforman ambas cadenas.

Las reivindicaciones 16, 17 y 18 – 25 se refieren a fragmentos de los anticuerpos nombrando diferentes secuencias para la región variable de cadena pesada y cadena ligera que no son estructuras activas, probadas, ni definidas; también se encuentra la expresión al menos 2 CDRs, la cual no es aceptable puesto que es conocido en el campo técnico que pequeñas variaciones en las secuencias del anticuerpo influyen en su unión con el antígeno, especialmente si estas se realizan en los CDRs. Adicionalmente, se da lugar a una serie de combinaciones entre las secuencias variables de cadena ligera y cadena pesada que no encuentran soporte en la descripción. No es posible definir un anticuerpo por fragmentos del mismo por lo cual se sugiere caracterizarlo a partir de su estructura completa, mencionando las secuencias que lo conforman en la cadena ligera y cadena pesada, o las secuencias variables de las cadenas ligera y pesada incluyendo las secuencias de los 6 CDR's que conforman ambas cadenas, restringiendo la solicitud a los anticuerpos que presentan alguna modificación, tales como los humanizados o quiméricos, puesto que anticuerpos murinos o fragmentos de los mismos no se consideran una invención.

No es claro a que se refiere el solicitante con un anticuerpo quimérico humanizado en las reivindicaciones 12 – 16 y 18, debido a que estas reivindicaciones son dependientes de la reivindicación 11 o de alguna reivindicación dependiente de ésta, se piensa que puede ser un error de transcripción y que el solicitante se refiere a un anticuerpo quimérico o humanizado. Se sugiere realizar las correcciones y aclaraciones necesarias.

Las reivindicaciones 12 – 15 no son concisas porque se refieren a las regiones constantes definiéndolas por ser humanas, porque se derivan de una cadena constante de cadena ligera kappa humana, porque se derivan de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana, definiéndolas de forma general e impidiendo definir el alcance de la invención. Se reitera la sugerencia de definir al anticuerpo por su estructura completa.

Los porcentajes de identidad nombrados en las reivindicaciones 17, 24, 25, 46 y 47 no son aceptables porque no permiten definir una secuencia exacta, ni caracterizar un anticuerpo, además es conocido en el campo técnico que pequeñas variaciones en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo pueden afectar su unión con el antígeno. Se sugiere eliminar los porcentajes de identidad del pliego reivindicatorio.

Las reivindicaciones 26 – 30, 34 y 36 definen los componentes de un conjugado que se puede encontrar en una composición, como un anticuerpo de la reivindicación 1, el cual no se encuentra apropiadamente caracterizado; un fármaco, sin definir a cual fármaco se refiere el solicitante, o definiéndolo por su funcionalidad, efecto terapéutico o mecanismo de acción; y un ligador, que tampoco se encuentra definido. Esta forma de reivindicar no es adecuada porque no define al un anticuerpo, al fármaco ni al ligador como tal, adicionalmente solo se encuentra soporte cuando el fármaco es caliqueamicina y el ligador es 4-(4'-acetilfenoxi)butanólico. Se sugiere restringir la solicitud a una razonable generalización de lo que se encuentra debidamente soportado en el capítulo descriptivo incluyendo en la reivindicación independiente el anticuerpo definido por su estructura completa, el fármaco y el ligador.

No es claro a que se refiere el solicitante con la palabra análogo de la reivindicación 32, se sugiere realizar las aclaraciones necesarias.

Las reivindicaciones 36 – 39 indican el uso que puede darse al producto reivindicado, y además hace alusión a métodos de tratamiento, los cuales no son patentable y no corresponde a una característica técnica que defina a la invención. Adicionalmente, no se encuentra soporte de la obtención o prueba de alguna composición dentro del capítulo descriptivo, por lo cual se sugiere eliminar estas reivindicaciones.

En las reivindicaciones 46 y 47 se reclaman ácidos nucleicos murinos y humanizados, los ácidos nucleicos de secuencias 1, 3, 5, 7, 9 y 11 son murinos y por lo tanto se encuentran exceptuados de patentabilidad según el Art. 15, literal (b), se solicita restringir estas reivindicaciones a los polinucleótidos que han sido modificados tales como los humanizados.

Además de restringir las reivindicaciones 46 y 47 únicamente a materia que es objeto de patentabilidad, se sugiere eliminar las definiciones por resultado a alcanzar, ya que estas reivindicaciones se refieren a un ácido nucleico que hibridiza de manera específica al complemento de cualquiera de (a) – (d) bajo condiciones de hibridación severa, esto no define al ácido nucleico, puesto que la reivindicación incluiría no sólo

Expediente 08 095 703 1er Art 45

la solución propuesta por el solicitante, sino todas las alternativas presentes o futuras que lleguen a ese resultado. Se sugiere restringir estas reivindicaciones a las características esenciales del ácido nucleico que corresponde a su secuencia exacta de nucleótidos.

Descripción (Art 28 D 486)

Durante la lectura del capítulo descriptivo se encuentra varias veces el signo de interrogación (Por ejemplo, Pág. 69, línea 15, Fl. 132; Pág. 156, línea 10 – Pág. 157, línea 5, Fls. 219 y 220), no es claro su significado, por lo cual, se sugiere realizar las aclaraciones necesarias.

No es claro porque en la tabla 1 (Pág. 126 y 127, Fls. 189 y 190) diferentes secuencias corresponden a la región variable de cadena pesada del anticuerpo A1 y en la tabla 2 (Pág. 128, Fl. 191) se encuentran dos secuencias diferentes para la región variable de cadena pesada para cada uno de los anticuerpos A1, A2 y A3. Se solicita realizar las aclaraciones necesarias.

En la tabla 3 la ultima columna corresponde a "Kg (1", no es claro cual es su significado. Se sugiere realizar las aclaraciones necesarias.

En el pliego descriptivo se nombra al anticuerpo A43 (Pág. 130, línea 11, Fl. 193), sin embargo no se encuentra referencia al mismo en otra parte del capítulo descriptivo, por lo cual, éste puede corresponder a un error de digitación. Se sugiere realizar las aclaraciones o correcciones necesarias.

Se solicita incluir el significado de CMA-676 en el capítulo descriptivo, puesto que éste se define como un conjugado anti-CD33/caliqueamicina (Pág. 141, línea 17, Fl. 204) sin definir a cual anticuerpo anti-CD33 se refiere el solicitante.

Existe una inconsistencia en la información del capítulo descriptivo, porque en la Pág. 145 (líneas 19 – 22, Fl. 208) se encuentra que las secuencias SEQ ID Nos. 52 y 54 corresponden a regiones variables de cadena pesada A1 humanizadas, y en la tabla 10 (Pág. 147, Fl. 210) estas secuencias aparecen como secuencias de la región variable de cadena ligera.

Se requiere al Solicitante hacer las aclaraciones necesarias.

7. Determinación del Estado de la Técnica

El estado de la técnica se determinó con base en la fecha de presentación de la solicitud de prioridad: 10/Marzo/2006 y se encontraron los siguientes documentos que anticipan el objeto de esta solicitud:

Ítem	Documento	Título	Fecha de Publicación
D1	MYERS, K. ET AL, Cancer Gene Therapy, Vol. 9, Págs. 884 - 896	Targeting Immune Effector Molecules to Human Tumor Cells Through Genetic Delivery of 5T4-Specific scFv Fusion Proteins	2002
D2	WO 03/039098	5T4 Ligand	08/Mayo/2003

D1 divulga (Pág. 884, Fl. 405) un anticuerpo quimérico que se une a la glicoproteína 5T4 y la utilidad de los anticuerpos monoclonales dirigidos a antígenos asociados a tumores solos o unidos a sustancias terapéuticas como caliqueamicina.

D2<http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?CC=WO&NR=03038098A2&K C=A2&FT=D&ND=&date=20030508&DB=&locale=en> EP divulga (Pág. 3, líneas 21 – 28; Pág. 5, líneas 8 - 17) un anticuerpo que se liga a 5T4, el cual se une a agentes citotóxicos como la caliqueamicina

8. Examen de Patentabilidad (Art 14 D486)

Nivel Inventivo (Art18 D486)

La reivindicación 11 consiste en un anticuerpo de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque es un anticuerpo anti-5T4 humanizado o quimérico.

Comparación de las características técnicas **esenciales**, con las del Estado de la Técnica:

Características esenciales	D1	D2
Anticuerpo anti-5T4	Anticuerpo anti-5T4	Anticuerpo anti-5T4
Humanizado o quimérico de los anticuerpos murinos A1, A2 o A3	Quimérico	Puede ser quimérico o humanizado

Los documentos D1 y D2 se consideran el estado de la técnica cercano a la invención definida en la reivindicación 1 porque divulgan anticuerpos anti-5T4. El documento D1 revela un anticuerpo quimérico que se unen a 5T4 (Pág. 884, Fl. 405). El documento D2 enseña un anticuerpo que se liga a 5T4 que puede ser quimérico o humanizado (Pág. 3, líneas 21 – 28; Pág. 15, línea 26 – Pág. 16, línea 21).

El documento D1 también divulga que el anticuerpo contiene una región constante de IgG1 (Pág. 884, Fl. 405) y el polinucleótido que lo codifica (Pág. 886, Fl. 406).

El documento D2 además enseña los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo anti-5T4 (Pág. 20, líneas 6 – 25)

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 11 y el anticuerpo del documento D1 es que el anticuerpo es derivado de los anticuerpos murinos A1, A2 o A3 y que el anticuerpo también puede ser humanizado.

El efecto que logran los anticuerpos quiméricos o humanizados derivados de los anticuerpos A1, A2 o A3 es su unión a 5T4.

Por lo tanto, el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: "cómo obtener un anticuerpo anti-5T4 alternativo al anticuerpo quimérico del documento D1".

Sin embargo, la unión específica a la glicoproteína 5T4 de un anticuerpo quimérico ya se divulgaba en el documento D1 (Pág. 884, Fl. 405; Pág. 892, Fl. 407) y no se observa ningún efecto técnico inesperado, ni la solución a algún problema técnico por parte del anticuerpo de la solicitud. Adicionalmente, el documento D2 enseña que el anticuerpo anti-5T4 puede ser humanizado (Pág. 3, línea 24)

En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia, obtendría un anticuerpo anti-5T4 quimérico alternativo al anticuerpo quimérico del documento D1 o un anticuerpo humanizado como se enseña en el documento D2 sin lograr ningún efecto técnico inesperado para llegar así al objeto de la reivindicación 11 de Expediente 08 095 703 1er Art 45

la solicitud. Por lo cual se considera obvia.

Puesto que las reivindicaciones dependientes 12 – 25 no mencionan características inventivas adicionales tampoco se pueden considerar inventivas.

Conclusión:
La reivindicación 11 – 25 cumple el requisito de novedad (Art. 16), pero no cumplen con el requisito de nivel inventivo (Art. 18).

La reivindicación 26 consiste en: un conjugado de anticuerpo/fármaco para distribución de fármaco, caracterizado porque comprende:
(a) Un anticuerpo de acuerdo a la reivindicación 1; y
(b) Un fármaco, que esta unido directa o indirectamente al anticuerpo.

Comparación de las características técnicas **esenciales**, con las del Estado de la Técnica:

Características esenciales	D1	D2
Conjugado caracterizado porque comprende:	Conjugado que comprende:	Conjugado que comprende:
Un anticuerpo anti-5T4 A1, A2 o A3	Anticuerpo quimérico anti-5T4	Anticuerpo anti-5T4
Un fármaco unido directa o indirectamente	Agente terapéutico	Agente citotóxico

Los documentos D1 y D2 constituyen el estado de la técnica cercano a la invención porque dan a conocer conjugados de anticuerpos anti-5T4 y un fármaco. El documento D1 divulga un anticuerpo anti-5T4 unido a un agente terapéutico (Pág. 884, Fl. 405). El documento D2 da a conocer un anticuerpo anti-5T4 unido a un agente citotóxico (Pág. 2, líneas 18 y 19; Pág. 37, reivindicaciones 2, 3 y 8).

El documento D1 también enseña a la caliqueamicina como agente citotóxico para formar el conjugado (Pág. 884, Fl. 405).

Además, el documento D2 revela que agentes terapéuticos adecuados pueden ser aquellos que tienen efecto sobre la estructura o función de la célula, por ejemplo los que tienen efecto sobre la proliferación celular, o un agente citotóxico, que el agente citotóxico preferido es caliqueamicina y que se pueden unir también agentes para la detección de células tumorales como agentes radiomarcados (Pág. 5, líneas 9 – 28; Pág. 24, línea 24 – Pág. 27, línea 13); que se pueden utilizar ligadores (Pág. 5, línea 30 – Pág. 6, línea 6); y las composiciones de los conjugados (Pág. 28, línea 30 – Pág. 31, línea 15).

El conjugado de esta solicitud se diferencia de los conjugados del documento D1 y D2 en el anticuerpo A1, A2 o A3.

El hecho de utilizar el anticuerpo A1, A2 o A3 el conjugado de los documentos D1 o D2 es la disminución de la viabilidad de células de carcinoma humanas (Pág. 140, líneas 2 – 5, Fl. 203).

Por tanto, el problema técnico objetivo consiste en “cómo obtener un conjugado de un anticuerpo anti-5T4 y un fármaco para disminuir la viabilidad de células de carcinoma humanas”.

El documento D1 ya enseñaba que los anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a células tumorales humanas que expresan 5T4 son usados

para direccionar agentes terapéuticos (Pág. 884, Fl. 405), y el documento D2 da a conocer que cuando un ligando de 5T4 se une al antígeno 5T4 de la superficie de células tumorales, el complejo es internalizado, y que por lo tanto este mecanismo permite la entrega de fármacos al interior de la célula (Pág. 2, líneas 12 – 16).

La reivindicación es obvia, porque la persona del oficio normalmente versada en la materia enfrentada al problema de obtendría un conjugado de un anticuerpo anti-5T4 y un fármaco como un agente citotóxico según las enseñanzas de los documentos D1 y D2, logrando de esta forma el conjugado de esta solicitud.

Puesto que las reivindicaciones dependientes 27 – 39 no mencionan características inventivas adicionales tampoco se pueden considerar inventivas.

Conclusión:
Las reivindicaciones 26 – 39 cumplen el requisito de novedad (Art. 16), pero no cumplen con el requisito de nivel inventivo (Art. 18).

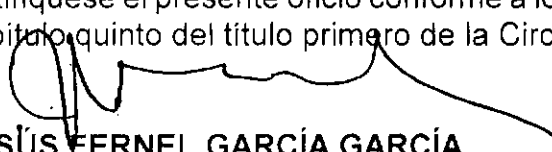
9. Conclusión

Los requisitos de Patentabilidad de la presente Solicitud están afectados así:

Ítem	Documento	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D1	MYERS, K. ET AL, Cancer Gene Therapy, Vol. 9, Págs. 884 - 896	11 - 39	Nivel Inventivo
D2	WO 03/039098	11 - 39	Nivel Inventivo

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de sesenta (60) días contados a partir de la fecha de notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento, o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

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


JESÚS FERNEL GARCÍA GARCÍA
Director de Nuevas Creaciones (C)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha

18 JUL 2012
Elaborado por: Jeny Paola Villate Becerra *P. Villate*
Revisado por: Consuelo Leguizamón *CL*

Targeting immune effector molecules to human tumor cells through genetic delivery of 5T4-specific scFv fusion proteins

Kevin A Myers,¹ Matthew G Ryan,¹ Peter L Stern,² David M Shaw,² M Jim Embleton,³ Susan M Kingsman,¹ and Miles W Carroll¹

¹Oxford BioMedica (UK) Ltd., Medavair Centre, Oxford Science Park, Oxford, UK; ²Immunology Department; and ³Medical Oncology, Paterson Institute For Cancer Research, Christie Hospital, Manchester, UK.

Although several clinical trials have shown beneficial effects by targeting tumor-associated antigens (TAAs) with monoclonal antibodies, a number of issues, including poor penetration of the tumor mass and human antimouse antibody responses, remain. The use of recombinant single-chain Fv (scFv) fragments has the potential to address these and other issues while allowing the addition of T-cell effector functions. To develop therapeutic strategies that recruit both humoral and cellular arms of the immune response, we have constructed chimeric proteins linking either the human IgG1 Fc domain or the extracellular domain of murine B7.1 to a scFv specific for the oncofetal glycoprotein, 5T4. This TAA is expressed by a wide variety of carcinomas and is associated with metastasis and poorer clinical outcome. We have engineered retroviral constructs that produce fusion proteins able to interact simultaneously with both 5T4-positive cells and with the receptor/ligands of the immune effector moieties. Genetic delivery through a murine leukemia virus vector to 5T4-positive tumor cells results in the secreted scFv fusion protein binding to the cell surface. Furthermore, the scFv-HlgG1 fusion protein is able to direct lysis of 5T4-expressing human tumor cell lines through antibody-dependent cell cytotoxicity, indicating its potential as a gene therapy for human cancers.

Cancer Gene Therapy (2002) 9, 884–896 doi:10.1038/sj.cgt.7700513

Keywords: 5T4 oncofetal antigen; tumor-associated antigens; immunotherapy; scFv fusion proteins; Murine Leukemia Virus; genetic delivery

The development of antibodies as therapeutic agents for the treatment of cancer has recently led to some encouraging results in the clinic.^{1–3} Monoclonal antibodies (mAbs) targeted to tumor-associated antigens (TAAs) have been used alone or linked to a therapeutic moiety such as a radiolabel⁴ or a cytotoxic drug, e.g., calicheamicin.⁵ When used on their own, the cytotoxic effects of the mAb may be direct, e.g., by inhibiting growth signaling,⁶ or indirect, such as the induction of apoptosis.^{7–10} Also the recruitment of an immune response by the mAb can lead to cell killing through antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC) and complement fixation as has been seen with the anti-her2/neu antibody, hereceptin,¹¹ and the anti-CD20 antibody, rituximab.¹²

There are, however, a number of problems associated with using whole murine antibodies in humans. These include poor targeting specificity,¹³ inefficient penetration of the tumor,¹⁴ human antimouse antibody (HAMA) reactions and general systemic toxicity at the high doses required to deliver sufficient antibody to the site of the tumor.¹⁵ Antibody

engineering now allows these issues to be addressed with the production of smaller recombinant molecules such as single-chain Fv (scFv) antibodies, which are the smallest fragment to contain the original antigen binding site. They consist of the variable heavy (V_H) and variable light (V_L) chain, joined by a flexible linker, and have been shown to penetrate tumors more effectively than whole antibodies or Fab fragments.¹⁴

Some disadvantages of using scFv include decreased stability, short half-life, and, in some cases, decreased affinity to the antigen.^{16,17} One approach to improving the function and circulating half-life is to link immune stimulatory molecules to the anti-TAA scFv. For example, to activate antibody-mediated killing against the target tumor, the constant heavy chain of human immunoglobulins can be added, which will also increase molecular size (and therefore stability) while minimizing immunogenicity. Human IgG1 has a broad specificity for the different Fc receptors present on macrophages, monocytes, and natural killer (NK) cells and thus represents an excellent choice for this approach.¹⁸

To induce a cytotoxic T-cell response, the costimulatory molecules of the B7 glycoprotein family can be used. These important costimulatory molecules are present on antigen-presenting cells and are ligands of the receptors CD28 and CTLA-4 found on lymphocytes.¹⁹ In both cases, delivering

Correspondence: Dr Miles W Carroll

Oxford BioMedica (UK) Ltd., Medavair Centre, Oxford Science Park, 100, COXWATER, UK. E-mail: mcarroll@oxfordbiomedica.co.uk

886

consisting of the scFv linked either to the B7.1 extracellular (EC) domain (to induce a cellular immune response) or the heavy constant region of human IgG1, which has been shown to be effective at directing ADCC. We have shown, *in vivo*, that these potential therapeutics can be delivered from murine leukemia virus (MLV)-based viral vectors to transduce mammalian cells that then secrete the fusion protein products. The B7.1 scFv immune conjugate was able to simultaneously bind the target antigen, 5T4, and the B7 ligand, CTLA-4. Transduction of cells expressing 5T4 with the scFv-Hy1 viral vector construct led to secretion of the fusion protein, which then bound back to the target antigen at the cell surface. This immune conjugate also bound the high-affinity Fc receptor, CD64, and, in addition, was able to direct lysis of human tumor cell lines expressing native 5T4, through ADCC.

Methods

Construction of 5T4 scFv fusion proteins

Three constructs were made: Leader-5T4 scFv (LscFv), Leader-5T4 scFv with a Myc-His tag (LscFv-MH), Leader-5T4 scFv fused N-terminal to human IgG1 (HlgG1) constant heavy chain (LscFv-Hy1), and B7.1-fused N-terminal to the 5T4 scFv-MH (B7-scFv-MH). To make LscFv, the sequence encoding a translation initiation sequence and the human immunoglobulin kappa light chain signal peptide was synthesized as two complementary single-stranded oligonucleotides. When annealed, the double-stranded oligo contains an internal *Xho*I site at the 5' end with a *Xba*I-compatible 5' overhang and a *Pst*I-compatible 3' overhang, (ctagaetgagCCACC ATG GGA TGG AGC TGTATC ATC CTC TTC TTG GTA GCA ACA GCT ACA GGT GTC CAC TCC GAG GTC CAG ctgca and g CTG GAC CTC GGA GTG GAC ACC TGT AGC TGT TGC TAC CAA GAA GAG GAT GAT ACA GCT CCA TCC

CAT GGTGGctgag). This was cloned into pBluescript II (Becton Dickinson, Cowley, Oxford, Oxfordshire, UK), previously restricted with *Xba*I and *Pst*I, to create pBSII/Leader.

The 5T4 scFv was amplified by PCR from pHEN1 using a 5' oligonucleotide that incorporates a *Pst*I site at the 5' (GTC CAG CTG CAG CAG TCT GG) in conjunction with one of three 3' oligonucleotides—one of which incorporates a *Hind*III site at the end of the product (CG TTT GAT TTC AAG CTT GGT GC) for fusion with the Hy1, one which incorporates a stop codon and a *Xho*I site (CTC CTC GAG TTA CCG TTT GAT TTC CAG GGT GC), and one which contains a coding sequence for the c-myc epitope and polyhistidine (6×His) tag preceding a stop codon adjacent to a terminal *Xho*I site (5'-CTC CTC GAG TCA ATG GTG ATG GTG ATG ATG GTC GAC GGC GCT ATT CAG ATC CTC TTC TGA GAT GAG-3'). The PCR products were then restricted with the appropriate enzymes and inserted into pBSII/Leader, creating LscFv, LscFv-MH, and LscFv without a stop codon.

The HlgG1 constant region was amplified by PCR from the cloned gene (a kind gift from M Bruggemann), using oligonucleotides that incorporate a *Hind*III site at the 5' end and a *Xho*I site at the 3' end (gcgc AAG CTT gaa atc aaa egg GCC TCC ACC AAG GGC CCA and gcgc ctgag TCA TTT ACC CGG AGA CAG GG). This was then restricted with those enzymes and inserted into pBSII containing LscFv without a stop codon, creating LscFv-Hy1. The entire fusion construct can then be excised as a single cassette with *Xho*I (see Fig 2).

Construction of the fusion protein B7-scFv involved the sequential fusion of three components: the murine B7.1 EC domain, a bridging flexible (Gly₄Ser)₃ polylinker, and the scFv, both tagged and untagged. The flexible polylinker was generated by annealing two complementary oligonucleotides (5'-GGG GGT GGT GGG AGC GGT GGT GGC GGC AGT GGC GGC GGC GGA a-3' and 5'-CT AGT TCC

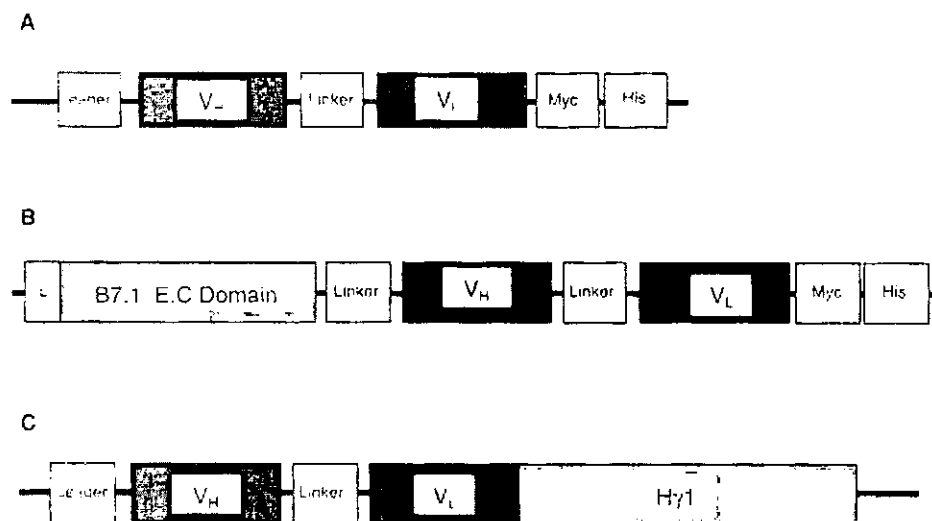


Figure 2 Fusion protein constructs. **A:** The 5T4scFv consisting of a secretory leader sequence N-terminal to the V_H and V_L domains joined by a (Gly₄Ser)₃ linker and including a C-terminal Myc-His tag. The same construct without the tag was also made. **B:** The B7-5T4scFv construct including a C-terminal Myc-His tag. The same construct without the tag was also made. **C:** The 5T4scFv directly fused to the constant heavy region of human IgG1.

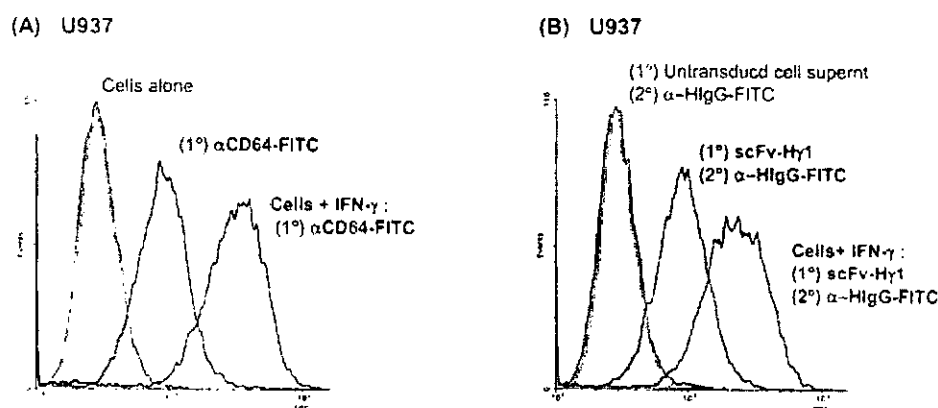


Figure 8 FACS comparison between the binding of anti-CD64 and scFv-Hy1 to U937 cells. The monoblast cell line, U937, treated or untreated with IFN- γ was incubated with either anti-CD64-FITC (A) or scFv-Hy1 (B). The scFv-Hy1 was then detected using anti-HlgG-FITC. The shift in fluorescence was compared to cells alone (no fluorescent antibody added at all).

Immunohistochemical analysis with the scFv fusion proteins

It has been shown previously that, like the parent mAb, the scFv-MH labels the syncytiotrophoblast layer of human placenta.³³ Figure 4 shows that the B7-scFv-MH likewise binds to human syncytiotrophoblast, indicating that the B7-1-FC domain does not hinder binding to native 5T4 antigen. No staining was seen with anti-myc 9E10 antibody alone.

FACS analysis demonstrates binding of the scFv fusion proteins to the 5T4 target antigen

To determine if the scFv fusion proteins are specific for the human 5T4 antigen, FACS analysis was carried out using a mouse fibroblast cell line transfected with the human 5T4 cDNA (A9-5T4) and the same line transfected with the neomycin resistance gene alone (A9-neo). Figure 5, A and B shows that the B7-scFv-MH binds to A9-5T4 cells but not the A9-neo cells, confirming that the scFv is binding to the target antigen and not to some other molecule on the A9 cells. Figure 5C demonstrates binding of the scFv-MH to A9-5T4 cells. The binding of both B7-scFv-MH and scFv-MH can be inhibited by the 5T4 mAb from which the scFv is derived (data not shown). Similarly, the scFv-Hy1 construct demonstrates at least 1 log shift in fluorescence activity in the 5T4-positive cells compared to the control scFv construct, when detected with rabbit anti-HlgG-FITC (Fig 6A). Again, no shift occurs with A9-neo cells (Fig 6B). Competition FACS analysis demonstrated that the concentrated supernatant from the cells transfected with the scFv construct did indeed contain scFv protein because this supernatant was able to block the binding of the scFv-Hy1 to the 5T4 antigen on the A9-5T4 cells (Fig 6C). The scFv-Hy1 was also shown to bind to the human ovarian carcinoma line (PA1), which expresses native 5T4 at the cell surface (Fig 6D).

In addition, it was demonstrated that the production of the fusion protein from an MLV-based construct within the cell leads to secretion of the protein from the cell and binding to the cell surface, if the transduced cell expressed the 5T4 antigen. Figure 7 shows FACS analysis of a murine colon

cancer cell line, CT26, expressing human 5T4, compared to CT26 only expressing neomycin, after transduction with the MLV-LscFvHy1 construct. Using the anti-HlgG-FITC antibody, HlgG is detected at the surface of the CT26-5T4 cells but not the CT26-neo cells. If the cells are permeabilized, then HlgG is detected in the CT26-neo transductants (data not shown), indicating that the lack of detection of HlgG at the cell surface is not due to a lack of production of the protein within the cell. This also indicates that the scFv-Hy1 protein is binding to the 5T4 on the cell surface of the CT26-5T4 cells rather than being trapped in the membrane or binding nonspecifically to the cells. Thus, genetic delivery of these immunocjugates *in vivo* has the potential to result in binding of active protein to the surface of any tumor cell expressing 5T4 (both

A9-5T4

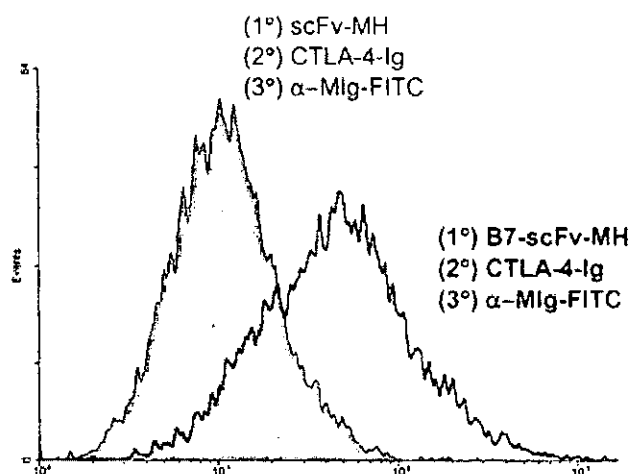


Figure 9 FACS analysis of B7-scFv binding to both 5T4 and CTLA-4. To demonstrate simultaneous binding of the B7 extracellular domain to a ligand, CTLA-4, while the scFv is bound to its target antigen, A9-5T4 cells were incubated with either scFv-MH (as a negative control) or B7-scFv-MH, followed by CTLA-4 in the form of a fusion protein with mouse Ig at the C-terminus. This was then detected using FITC-conjugated anti-mouse Ig.