



TRIANA, URIBE & MICHELSEN

MINISTERIO DE COMERCIO INDUSTRIA Y TURISMO
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E.

S.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-299760-00005-0000

Fecha: 2015-07-27 15:31:03 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 16 20

REFERENCIA : SOLICITUD DE REGISTRO DE LA PATENTE
"ANTICUERPOS"

EXPEDIENTE No. : 13-299760

CODIGO : 01-01-08

JUAN CARLOS URIBE RESTREPO mayor de edad, domiciliado en la ciudad de Bogotá D.C, República de Colombia, abogado titulado e identificado como aparece al pie de mi firma, en mi calidad de apoderado de la sociedad **OXFORD BIOTHERAPEUTICS LTD.**, una compañía del Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte, con domicilio en la ciudad de Abingdon, Oxon, por medio del presente escrito doy respuesta al oficio No. 2612, notificado por fijación en lista de fecha 17 de marzo de 2015, y conforme con la prórroga presentada el 5 de junio de 2015, me permito manifestar y anexar lo siguiente:

1. MANIFIESTO

1.1. Acción oficial emitida sobre un capítulo reivindicatorio errado

En primer lugar, el solicitante desea hacer énfasis en el hecho que la acción oficial No. 2612 ha sido emitida con base en el estudio de un capítulo reivindicatorio errado, toda vez que la segunda página del oficio señala *"En el presente caso se estudiarán las reivindicaciones 1 a 30 del capítulo reivindicatorio (Radicado N°. 13-299760-00000-0000)."*

Como el examinador podrá corroborar, en los folios 14 a 19 se presenta una modificación de las reivindicaciones que fue presentada durante la fase internacional y realizada en virtud del artículo 19 del PCT, la traducción de ese capítulo puede ser encontrada en los folio 28 a 35 de la solicitud presentada. Según consta en dichos folios, **el número de reivindicaciones de dicho capítulo son 31.** Siendo así, al momento de la radicación el solicitante pagó la tasa por las 31 reivindicaciones de dicho capítulo, que reemplaza en su totalidad las reivindicaciones originales, que comprendían 30 reivindicaciones, que fue el que estudió el examinador.

Por tanto, solicitamos que se analice esta respuesta y de no ser satisfactoria para su entidad, en ejercicio del principio de igualdad y en cumplimiento del debido proceso al que el solicitante tiene derecho, se solicita dar a mi poderdante una nueva oportunidad para responder a los cuestionamientos de ése Despacho, pues tiene el derecho que se estudie el capítulo reivindicatorio correcto.

1.2. Modificaciones a las reivindicaciones

Se adjunta al presente memorial un nuevo capítulo reivindicatorio que consta de quince (15) reivindicaciones, que están sujetas a las disposiciones del artículo 34 de la Decisión 486, en las cuales se realizó lo siguiente:



- Se eliminaron las reivindicaciones 2 a 7, 9 a 14 y 26 a 30.
- En la antigua reivindicación 8, nueva reivindicación 2 se eliminó la referencia a la *región variable*, indicado ahora que la secuencia de la cadena pesada es SEQ ID N°2 y la secuencia de la cadena ligera es SEQ ID N°4.
- Se incluyó la nueva reivindicación 3 que define un anticuerpo donde la secuencia de cadena pesada es SEQ ID N°46 y la secuencia de la cadena ligera es SEQ ID N°49.
- En la nueva reivindicación 4, antigua reivindicación 15 se incluyó la característica que el anticuerpo monoclonal o su porción de unión al antígeno compite por la unión a BST1 y se canceló el fragmento que reclamaba secuencias similares, con un 80% unión a BST1.
- Las restantes reivindicaciones permanecen igual y los únicos cambios introducidos son la reenumeración y la corrección de las dependencias, según las reivindicaciones que quedaron.

De acuerdo con las modificaciones anteriormente enumeradas, me permito indicar que éstas se ajustan a las disposiciones del artículo 34 de la Decisión 486 toda vez que no implican una ampliación a la materia inicialmente definida en toda la solicitud. Por el contrario, cabe resaltar que estas modificaciones pretenden superar las objeciones planteadas por el examinador en su concepto técnico y en ningún momento el solicitante desea incluir materia adicional que no se haya presentado con la solicitud original.

Teniendo en cuenta lo anterior, me permito proceder a dar respuesta a cada una de las objeciones planteadas por el examinador en el oficio en mención relacionado con el cumplimiento de los requisitos de patentabilidad.

1.3. Reivindicaciones de uso y excepciones a la patentabilidad

En primer lugar, el examinador establece que las reivindicaciones 26 a 30 no son patentables puesto que se refieren a usos y método de tratamiento. En respuesta a esta objeción el solicitante ha eliminado las reivindicaciones en cuestión.

1.4. Claridad de la solicitud

- En relación con la claridad de la reivindicación 1, puesto que las reivindicaciones 2 y 3 fueron eliminadas, el examinador sostiene que dicha reivindicación hace referencia a que el anticuerpo se une especialmente con BST1, lo cual es considerado un resultado a alcanzar y no define el anticuerpo por sus características esenciales, puesto que la reivindicación incluiría no sólo la solución propuesta por la solicitante, sino todas las alternativas presentes o futuras que lleguen a ése resultado.

Se le recuerda a la solicitante que un anticuerpo debe ser caracterizado a partir de su estructura completa y no puede ser definido en términos de su mecanismo de interacción, ya que esto no permite su diferenciación con el estado de la técnica. Es necesario mencionar las secuencias que lo conforman en la cadena ligera y cadena pesada, con su respectivo SEQ ID NO, las secuencias variables de la cadena ligera y pesada o las secuencias de los 6 CDR's que conforman ambas cadenas.

Respetuosamente el solicitante difiere de la posición del examinador, puesto que el anticuerpo de la reivindicación 1 está caracterizado por las secuencias de los 6 CDRs que conforman la cadena liviana y la cadena pesada. Realmente es absurdo que se interprete erradamente una precisión efectuada en el preámbulo de la reivindicación como un



resultado a alcanzar. El solicitante no está caracterizando el anticuerpo por el antígeno al que se une, como mal interpreta el examinador. El solicitante está definiendo que el objeto para el que se requiere protección es un anticuerpo que se une especialmente con BST1, pues indicar el antígeno objetivo sitúa al lector en el campo técnico correspondiente, y define dicho anticuerpo por las secuencias de los CDRs. Finalmente, la información sobre el antígeno objetivo es considerada una característica funcional, pues lo que se define es cuál será la función del antígeno cuyas secuencias se establecen en la parte caracterizante.

Adicionalmente, se recuerda a ese Despacho que las características funcionales, como el antígeno al cual se unirá el anticuerpo reivindicado son aceptables e incluso deseables, según la “GUÍA PARA EXAMEN DE SOLICITUDES DE PATENTE DE INVENCION Y MODELO DE UTILIDAD”¹ de la Superintendencia de Industria y Comercio, que establece en su inciso 2.6.5.4: *“Las características técnicas funcionales son los elementos que conforman las invenciones, descritos en términos de su uso o su función. No definen la invención, pero explican la relación que hay entre sus diversas características estructurales. Por ejemplo: aparato que tiene, además un “elemento para medir la presión. “Las reivindicaciones **deben** incluir características estructurales y funcionales **cuando para la persona del oficio normalmente versada en la materia no sea obvio el funcionamiento de los elementos característicos y la relación entre estos...**”*

Considerando lo dispuesto en el inciso citado, es evidente que las características funcionales no sólo son permitidas dentro del contexto de las reivindicaciones, sino que son requeridas y **se deben incluir cuando para la persona del oficio normalmente versada en la materia no sea obvio el funcionamiento de los elementos característicos y la relación entre estos**. En el caso que nos ocupa, no resulta obvia para la persona versada en la materia que el anticuerpo con las secuencias precisadas en la parte caracterizante se una especialmente con BST1 y que por tanto, **debe ser incluida en las reivindicaciones**. Tan es así, que la no inclusión de esta información dificultaría a la persona versada en la materia la realización de la búsqueda de anterioridades, pues le tocaría buscar en el universo de todos los anticuerpos, en lugar de restringirse a aquellos que se unen especialmente con BST1.

- Las reivindicaciones 1-2,4-5,7-12 hacen referencia a anticuerpos estructuralmente distintos, los cuales no tienen sustento por medio de pruebas técnicas.

El solicitante ha eliminado las antiguas reivindicaciones 2 a 7 y 9 a 14, por lo que la invención se ha restringido a los anticuerpos de las reivindicaciones 1 y 8 que son definidos por las secuencias de sus CDRs o por las secuencias de sus cadenas pesada y liviana.

Las nuevas reivindicaciones 2 y 3 son absolutamente claras pues ellas se relacionan con el anticuerpo BST1_A2, sus secuencias difieren en que en la reivindicación 12, el marco de lectura de la región del anticuerpo de la reivindicación 7 ha sido humanizado. Sumado a lo anterior y contrario a la afirmación del examinador, el solicitante desea hacer énfasis en que la solicitud tal como fue radicada incluye pruebas técnicas que soportan la actividad del anticuerpo BST1_A2. El ejemplo 3 describe la unión de BST1_A2 a células A549 y H226 como se determinó por citometría de flujo. El ejemplo 4 describe la caracterización

¹ Guía para Examen de Solicitudes de Patentes de Invención y Modelo de utilidad. Superintendencia de Industria y Comercio. 2012. Sección 2.6.5.4 Páginas 75 a 78. Relativo a las “Características Esenciales” (disponible electrónicamente en http://api.sic.gov.co/Documentos/Guia_Examen_Patentes.pdf).



estructural de BST1_A2. El ejemplo 5 describe la internalización de BST1_A2 en células A549 y H226 como se determinó mediante un ensayo MabZap. El ejemplo 6 describe la humanización de BST1_A2. El ejemplo 7 describe la actividad ADCC de BST1_A2 sobre células A549 y U937. Finalmente, el ejemplo 8 describe la habilidad de BST1_A2 para unirse a linfoblastos de pacientes con AML. Por lo tanto, las reivindicaciones están completamente soportadas mediante evidencia técnica.

- La reivindicación 15 no es clara puesto que hace referencia a un anticuerpo monoclonal aislado de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, lo que puede generar falsa dependencias, además menciona cambios de ADN y aminoácidos, estos cambios no son claros y no permite distinguir el objeto a reclamar del estado de la técnica. Por otra parte dicho anticuerpo está caracterizado por la unión de éste con un epítipo en BST1, y menciona que dicho anticuerpo tiene cambios de ADN y aminoácido que mantienen por lo menos el 80% de la unión a BST1 de las secuencias originales, lo cual es considerado un resultado a alcanzar y no define el anticuerpo por sus características esenciales, puesto que la reivindicación incluiría no sólo la solución propuesta por la solicitante, sino todas las alternativas presentes o futuras que lleguen a ese resultado, además este porcentaje no permite distinguir la invención del estado de la técnica. Se sugiere caracterizar el anticuerpo estructuralmente mencionando las secuencias de los 3 CDRs de la cadena pesada y los 3 CDRs de la cadena ligera, así mismo las secuencias de cadena pesada y ligera.

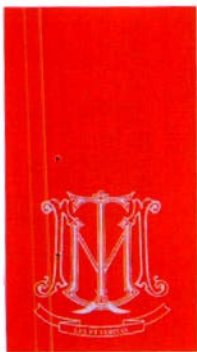
El solicitante ha eliminado la dependencia de la antigua reivindicación 15, ahora reivindicación 4, depende únicamente de las reivindicaciones 1 a 3 que se refieren al mismo anticuerpo. Adicionalmente, se canceló cualquier referencia al porcentaje de unión a BST1.

- La reivindicación 8 no es clara puesto que menciona la SEC ID NO: 2 como una región variable de la cadena pesada, se evidencia que dicha secuencia es la cadena pesada del anticuerpo, de igual manera la SEC ID NO: 4 como una región variable de la cadena ligera y se evidencia que dicha secuencia es la cadena ligera. Se sugiere realizar las aclaraciones pertinentes.

En procura de superar esta objeción el solicitante ha eliminado la mención a “región variable”, indicando ahora que el anticuerpo comprende una cadena pesada de la SEC ID NO: 2 y una cadena ligera de la SEC ID NO: 4.

- La reivindicación 16 no es clara puesto que hace referencia a un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, lo que puede generar falsas dependencias, además menciona la unión de una fracción unida covalentemente, lo cual es considerado un resultado a alcanzar y no define el anticuerpo por sus características esenciales, puesto que la reivindicación incluiría no sólo la solución propuesta por la solicitante, sino todas las alternativas presentes o futuras que lleguen a ese resultado. Se sugiere caracterizar el anticuerpo estructuralmente mencionando las secuencias de los 3 CDRs de la cadena pesada y los 3 CDRs de la cadena ligera, así mismo las secuencias de cadena pesada y ligera.

La antigua reivindicación 16, ahora reivindicación 6, está limitada a un único anticuerpo, que comprende los seis CDRs definidos en la reivindicación 1 o cuya secuencia de cadena pesada es la SEC ID NO: 2 y la cadena ligera es la SEC ID NO: 4 y su objetivo es precisar



que dicho anticuerpo comprende **además** un motivo covalentemente unido. Siendo así, no hay lugar a afirmar que exista una falsa dependencia o que se refiere a un resultado a alcanzar.

- La reivindicación 17 no tiene sustento por medio de pruebas técnicas, puesto que hace referencia a la unión de un anticuerpo con un fármaco, éste inmuconjugado no se encuentra sustentado, no hay evidencia de métodos para la producción ni la elaboración de dicho inmuconjugado.

Nuevamente se está mal interpretando el contenido de la norma Andina y como resultado, se está exigiendo que el solicitante presente pruebas y ejemplos que no son requisitos obligatorios según la Decisión 486, puesto que el artículo 30 de dicha Decisión es claro en establecer que *“Las reivindicaciones definirán la materia que se desea proteger mediante la patente. Deben ser claras y concisas y **estar enteramente sustentadas por la descripción**”*. Sumado a lo anterior, el literal e) del artículo 28 de la misma norma señala que la descripción debe contener *“una descripción de la mejor manera conocida por el solicitante para ejecutar o llevar a la práctica la invención, utilizando ejemplos y referencias a los dibujos, de ser éstos pertinentes; y...”* dicho artículo no indica que se deba evaluar o presentar ejemplos de cada una de las alternativas que se reivindican y menos aún, establece parámetros sobre cómo deben ser dichas pruebas. Siendo así, la reivindicación 17 es clara pues tiene sustento en la descripción.

Adicionalmente, la solicitud divulga los anticuerpos específicos de la presente invención y señala en las páginas 8 y 71 a 73, donde de forma explícita se mencionan las moléculas asociadas al anticuerpo de la presente invención. Siendo así, a partir de la fecha de presentación de la presente invención, cualquier persona versada en la materia estaría en la capacidad de aplicar un método para producir inmuconjugados con un rango de toxinas, tal como las que se describen en esta solicitud y en la reivindicación 18, basándose en el anticuerpo aquí divulgado, los conocimientos generales y el listado de fármacos y moléculas asociadas de las páginas 71 a 73 de la solicitud. Por lo tanto, la reivindicación 17 está completamente soportada en la descripción de la solicitud.

- La reivindicación 18 no es concisa puesto que hace referencia a la selección del fármaco en el grupo que consiste en un maitansinoide, una dolastatina, auristatina, un tricoteceno, una calicheamicina CC1065 y derivados de los mismos, además se evidencia que dichas uniones entre el anticuerpo y los diferentes fármacos no tienen sustento por medio de pruebas técnicas.

Adicional a los argumentos expuestos en relación con la reivindicación 17, los cuales son válidos para ésta reivindicación, el solicitante desea hacer énfasis en que la reivindicación 18 está soportada en el contenido de las páginas 71 a 72 y 103 a 104, donde se indica *“Otros ejemplos preferidos de moléculas asociadas que se pueden conjugar a un anticuerpo de la invención incluyen duocarmicinas, calicheamicinas, maitansinas y auristatinas, y derivados de las mismas. Un ejemplo de un anticuerpo de calicheamicina está comercialmente disponible (Mylotarg®; American Home Products). Los ejemplos preferidos de molécula asociada son CC-1065 y las duocarmicinas...”*

- Según el examinador las reivindicaciones 19 a 21 no son claras puesto que se refieren a un resultado a alcanzar y no define el anticuerpo por sus características esenciales, puesto que la reivindicación incluiría no sólo la solución propuesta por la solicitante,



sino todas las alternativas presentes o futuras que lleguen a ese resultado. Se sugiere caracterizar el anticuerpo estructuralmente mencionando las secuencias de los 3 CDRs de la cadena pesada y los 3 CDRs de la cadena ligera, así mismo las secuencias de cadena pesada y ligera.

En primer lugar, las limitaciones incluidas en las nuevas reivindicaciones 1 a 3, hace que el problema de falsas dependencias sea superado, pues en ellas se define el anticuerpo por sus 6 CDRs o por la secuencia de la cadena pesada y la cadena ligera. Adicionalmente, esta reivindicación se refiere a características funcionales del anticuerpo que tiene los 6 CDRs o las secuencias definidas en las tres primeras reivindicaciones.

Las características indicadas en las reivindicaciones 19 a 21 son características funcionales, que definen las propiedades del anticuerpo reivindicado, es decir, del anticuerpo que los 6 CDRs o las secuencias definidas en las tres primeras reivindicaciones. Como se mencionó anteriormente, las características funcionales deben ser incluidas en las reivindicaciones cuando ellas no sean obvias en el contexto de la invención o pueden ser incluidas cuando el solicitante así lo establezca.

Adicionalmente, si por algún remoto caso, el examinador quisiera insistir en que las reivindicaciones de 19 a 21 se refiere a un resultado a alcanzar, la “GUÍA PARA EXAMEN DE SOLICITUDES DE PATENTE DE INVENCION Y MODELO DE UTILIDAD”² de la Superintendencia de Industria y Comercio establece en su inciso 2.6.5.8 que “...*El resultado a alcanzar no es una característica técnica de la invención. Puede aparecer en la reivindicación, pero siempre acompañando las características técnicas que definen la invención*”. Con base en el lineamiento citado, aun cuando el examinador considerara que la información de las reivindicaciones 19 a 21 son resultados a alcanzar, según el inciso 2.6.5.8, no habría razón para no aceptar estas reivindicaciones, puesto que dichas características están acompañadas de la descripción de las 6 CDRs o las secuencias de las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo de la presente solicitud.

- El examinador cuestiona la claridad de las reivindicaciones 22 y 23 porque en ellas no se especifica la respectiva secuencia de ácidos nucleicos que codifica la cadena pesada o la cadena ligera del anticuerpo, además hace referencia a la cadena pesada del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, lo cual genera falsas dependencias y no se determina el objeto concreto de dicha reivindicación. Se sugiere a la solicitante modificar la redacción de la reivindicación mencionada y proveer las secuencias completas de los polinucleótidos, las cuales además deben ser adjuntadas en un listado aparte con su respectivo SEQ ID NO.

Respetuosamente el solicitante discrepa de la posición del examinador, pues no es necesario especificar la secuencia completa de nucleótidos que codifican la cadena pesada y la cadena liviana del anticuerpo en estas reivindicaciones porque esto daría lugar a restricción indebida del alcance de la protección otorgada al solicitante. Una vez que la persona versada en la materia conozca la secuencia de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera y de los CDRs del anticuerpo que acá se divulga esta en absoluta capacidad de deducir la secuencia de nucleótidos que codifica dicha secuencia de aminoácidos.

² Guía para Examen de Solicitudes de Patentes de Invención y Modelo de utilidad. Superintendencia de Industria y Comercio. 2012. Sección 2.6.5.8 Página 41. Relativo a las “Reivindicaciones definidas por el resultado a alcanzar” (disponible electrónicamente en http://api.sic.gov.co/Documentos/Guia_Examen_Patentes.pdf)



Hacer que el solicitante, quien es el inventor de la secuencia de aminoácidos restrinja el alcance de la invención a una única secuencia de nucleótidos, es abrir la posibilidad a que cualquier persona conocedora del campo técnico aplique sus conocimientos generales, y haciendo uso del código genético y sus degeneraciones, determine las secuencias de nucleótidos, produzca y comercialice precisamente una secuencia de nucleótidos que codifique la proteína de la invención pero que no es igual a la secuencia expresamente reclamada en el capítulo reivindicatorio, pues dicha secuencia aprovechada por terceros puede ser funcional, a pesar de presentar algunas variaciones en relación con la secuencia que el solicitante precise.

Siendo así, la limitación exigida por ese despacho lo único que hace es facilitar que terceros hagan uso de la invención desarrollada por el solicitante, sin que ello constituya una infracción, pues la protección otorgada sería muy estrecha, lo que impediría que las patentes cumplan con el objetivo de premiar al inventor por su contribución al acervo tecnológico.

No obstante el solicitante ha restringido el alcance de estas reivindicaciones para especificar que la secuencia de cadena pesada es la secuencia SEQ ID NO:6 y la secuencia de cadena liviana es la secuencia SEQ ID NO:8.

- La reivindicación 24 no es clara ya que no se describe ni identifica el proceso para producir células transformadas como una línea celular. Se sugiere al solicitante modificar la redacción de la reivindicación mencionada especificando la línea celular a ser transformada especificando su origen y tipo de célula.

Con todo respeto, el solicitante difiere de la posición del examinador dado que no hay razón para solicitar esta limitación, pues el concepto inventivo es el ácido nucleico que se introduce en la célula huésped, no en la célula huésped per se. Siendo de esta manera, como una persona versada en la materia entiende que cualquier tipo de célula puede ser sujeto de transformación mediante ingeniería genética y ser modificada para que contenga el ácido nucleico que codifica el anticuerpo definido en la reivindicación 1. La persona versada también estaría en capacidad de saber cómo producir tales células usando técnicas bien conocidas en el estado del arte. En vista de lo anterior, la limitación sugerida por ese Despacho resulta innecesaria.

- La reivindicación 26 no es clara puesto que hace referencia a un método para hacer un anticuerpo, el cual no está caracterizado por una secuencia de etapas lógicas para su ejecución. Se sugiere reemplazar el método por sus etapas.

La Reivindicación 26, se relaciona con un método de producción de un anticuerpo mediante el cultivo de la célula huésped de la Reivindicación 25 bajo condiciones en las que el anticuerpo o parte vinculante del antígeno del mismo se expresan. Siendo así, resulta contrario a las reglas de patentes incluir pasos conocidos y usuales en la reivindicación, pues es claro que las reivindicaciones se deben limitar a la materia que es novedosa. Siendo así, cualquier técnico en la materia está en la capacidad de establecer si el anticuerpo está siendo producido o no mediante el cultivo de la célula huésped de la reivindicación 25. Nuevamente se llama la atención del examinador para que admita que el concepto inventivo es la célula que se cultiva y que actúa como base para la producción del anticuerpo. Siendo así, incluir todos los pasos involucrados en el método restringiría indebidamente el alcance de la protección.



La persona versada en la técnica es consciente que una serie de métodos para la expresión de anticuerpos a partir de líneas celulares transfectadas a partir de su conocimiento general común. La esencia de la invención reclamada en esta reivindicación es que la célula sea específicamente la célula definida en la reivindicación 5. Por otra parte, comenzando en la página 49 de la aplicación registrada, la sección titulada “Generación de Transfectomas que producen Anticuerpos Monoclonales” describe detalladamente los métodos de producción de los anticuerpos de la invención mediante la transfectación de células huésped e indica que **tales técnicas se conocen desde la década de 1980**. Por lo tanto, se afirma que Reivindicación 26 sería del todo clara para la persona versada en la técnica.

- La reivindicación 5 no es clara puesto que hace referencia a la SEC ID NO: 115, por tanto se evidencia que dicha secuencia no se encuentra en el listado.

La objeción de la Reivindicación 5 en cuanto a la numeración de la secuencia no es relevante, toda vez que este error tipográfico se corrigió en la fase Internacional en las reivindicaciones presentadas en virtud al artículo 19 del PCT.

1.5. Descripción

El Examinador ha declarado, además, que la descripción no divulga la invención de una manera suficiente para permitir a la persona versada en la materia llevar a cabo la invención. El Examinador afirma que la solicitud es suficiente sólo en relación con un anticuerpo que comprende cadenas pesadas y ligeras que tienen los SEQ ID NOs: 52 y 53 y las correspondientes CDRs.

Respetuosamente, el solicitante está confundido por las afirmaciones del Examinador en esta sección del reporte del Examen. La solicitud presentada no sólo describe anticuerpos que tienen secuencias de cadena pesada y ligera correspondientes a SEQ ID NOs: 52 y 53, sino también anticuerpos que tienen secuencias de cadena pesada y ligera correspondientes a SEQ ID NOs: 2 y 4, y 1 y 3. Además, ésta describe la humanización del anticuerpo BST1_A2 en el Ejemplo 6 y las Figuras 5-7 que resulta en un anticuerpo humanizado que comprende las cadenas pesadas y ligeras que tienen SEQ ID NOs: 46 y 49. La solicitud también define los Ejemplos, métodos para la producción, selección, y caracterización de los anticuerpos (Ejemplos 1-4) y además la actividad de los anticuerpos, con referencia particular al anticuerpo BST1_A2 que comprende cadenas pesadas y ligeras que tienen SEQ ID NOs: 2 y 4, respectivamente. Por lo tanto, de forma contraria a la aceveración del Examinador, se afirma que la solicitud es suficiente en relación con todos los anticuerpos especificados en la misma.

En relación con los inmunoconjugados, como se discutió anteriormente, la persona versada en la materia que lea la solicitud estaría plenamente consciente de cómo producir inmunoconjugados utilizando diversas tecnologías de toxina relacionadas conocidas en la técnica. Por otra parte, se dirige la atención del Examinador hacia el Ejemplo 5, el cual provee datos del MabZap que muestran que los que los anticuerpos BST_A1 y BST_A2 son internalizados por las células H226 y A549 resultando en la muerte celular.

Los ensayos de MabZap son representativos del efecto que se esperaría ser obtenido con un conjugado de droga de anticuerpo (ADC). En el último caso, el ADC sería interiorizado, llevando de este modo la droga adentro de la célula. Una droga tóxica tendría la capacidad de matar la célula, es decir, matar a la célula cancerosa específica. Los datos de los ensayos



MabZap son aceptados fácilmente por personas versadas en la materia como representativos de los ensayos ADC (ver el ANEXO I, correspondiente al artículo adjunto de Kohls y Lappi como evidencia de esto).

Por lo tanto, se puede observar, a partir de los Ejemplos en la solicitud de patente, que el anticuerpo monoclonal BST1_A2 del Solicitante, el cual es definido en la Reivindicación 1 mediante la referencia a sus secuencias de CDR, tiene la capacidad no sólo de unirse específicamente a las células cancerosas las cuales expresan BST1 sino además ser interiorizado. El ensayo de MabZap demuestra la capacidad del anticuerpo A2 de transportar una droga/toxina dentro de las células cancerosas. Como se ha indicado anteriormente, esto sería reconocido fácilmente por la persona versada en la técnica ya que demuestra la capacidad del anticuerpo BST1_A2 de actuar como una inmunotoxina que es capaz de matar las células cancerosas.

1.6. Unidad de Invención

La solicitud no cumple con el requisito de unidad de invención porque se refiere a 4 grupos inventivos. Los grupos inventivos están definidos por las siguientes características esenciales:

- 1.6.1 Un anticuerpo comprendiendo: a) una región variable de cadena pesada que comprende: i) una primera vhCDR que comprende la SEC ID No: 10 ii) una segunda vhCDR que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEC ID No: 12 y SEC ID No: 51; y iii) una tercera vhCDR que comprende una SEC ID No: 14; y b) una región variable de cadena ligera que comprende: i) una primera vlCDR que comprende una SEC ID No: 16 ii) una segunda vlCDR que comprende una SEC ID No: 18; y iii) una tercera vlCDR que comprende una SEC ID No: 20. (Reivindicaciones 1,4), que comprende una cadena pesada SEC ID No: 2 y una cadena ligera SEC ID No: 4. (reivindicaciones 7-8), un ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo (reivindicación 22) y una cadena ligera del anticuerpo (reivindicación Expediente 13-299760- -3 1er Art 45. 23), una célula huésped que contiene los ácidos nucleico (reivindicación 24) y el método para hacer un anticuerpo (reivindicación 25).
- 1.6.2 Un anticuerpo comprendiendo: a) una región variable de cadena pesada que comprende: i) una primera vhCDR que comprende la SEC ID No: 9 ii) una segunda vhCDR que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEC ID No: 11; y iii) una tercera vhCDR que comprende una SEC ID No: 13; y b) una región variable de cadena ligera que comprende: i) una primera vlCDR que comprende una SEC ID No: 15 ii) una segunda vlCDR que comprende una SEC ID No: 17; y iii) una tercera vlCDR que comprende una SEC ID No: 19. (reivindicaciones 2,5), que comprende una cadena pesada SEC ID No: 1 y una cadena ligera SEC ID No: 3. (reivindicaciones 9-10), un ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo (reivindicación 22) y una cadena ligera del anticuerpo (reivindicación 23), una célula huésped que contiene los ácidos nucleico (reivindicación 24) y el método para hacer un anticuerpo (reivindicación 25).
- 1.6.3 Un anticuerpo comprendiendo: a) una región variable de cadena pesada que comprende: i) una primera vhCDR que comprende la SEC ID No: 10 ii) una segunda vhCDR que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEC



ID No: 12 y SEC ID No: 51; y iii) una tercera vhCDR que comprende una SEC ID No: 14; y b) una región variable de cadena ligera que comprende: i) una primera vlCDR que comprende una SEC ID No: 16 ii) una segunda vlCDR que comprende una SEC ID No: 18; y iii) una tercera vlCDR que comprende una SEC ID No: 20. (reivindicaciones 1,4), que comprende una cadena pesada SEC ID No: 45 y una cadena ligera SEC ID No: 46. (reivindicaciones 11-12), un ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo (reivindicación 22) y una cadena ligera del anticuerpo (reivindicación 23), una célula huésped que contiene los ácidos nucleico (reivindicación 24) y el método para hacer un anticuerpo (reivindicación 25).

- 1.6.4 Un anticuerpo comprendiendo: a) una región variable de cadena pesada que comprende: i) una primera vhCDR que comprende la SEC ID No: 56 ii) una segunda vhCDR que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEC ID No: 57; y iii) una tercera vhCDR que comprende una SEC ID No: 58; y b) una región variable de cadena ligera que comprende: i) una primera vlCDR que comprende una SEC ID No: 59 ii) una segunda vlCDR que comprende una SEC ID No: 60; y iii) una tercera vlCDR que comprende una SEC ID No: 61. (reivindicaciones 3,6), que comprende una cadena pesada SEC ID No: 52 y una cadena ligera SEC ID No: 53. (reivindicaciones 13-14), el anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo, donde dicha fracción es un fármaco (reivindicación 17-18), un ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo (reivindicación 22) y una cadena ligera del anticuerpo (reivindicación 23), una célula huésped que contiene los ácidos nucleico (reivindicación 24) y el método para hacer un anticuerpo (reivindicación 25).

En el oficio No. 2612 es señalado que no hay unidad de invención puesto que los anticuerpos mencionados en la presente solicitud hacen referencia a anticuerpos con características estructural diferente y no comparten elementos técnicos comunes. Además se evidencia que únicamente el grupo inventivo cuatro tiene sustento por medio de pruebas técnicas, en los demás grupos inventivos no hay sustento para tales, ni las posibles variantes con cambios de aminoácidos realizadas en las reivindicaciones 4-6 para la construcción de dichos anticuerpos.

En relación con este requerimiento el solicitante ha limitado la invención a un único concepto inventivo que es el anticuerpo que cuya región variable de cadena pesada que comprende: una primera vhCDR que comprende la SEC ID NO: 10; una segunda vhCDR que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEC ID NO: 12 y la SEC ID NO: 51; y una tercera vhCDR que comprende la SEC ID NO: 14; y la región variable de cadena ligera que comprende una primera vlCDR que comprende la SEC ID NO: 16; una segunda vlCDR que comprende la SEC ID NO: 18; y una tercera vlCDR que comprende la SEC ID NO: 20.

1.7. Cumplimiento de los Requisitos de Patentabilidad

1.7.1 Argumentos del concepto técnico No. 2612

Con relación al cumplimiento de los requisitos de patentabilidad definidos en los artículos 14, 16 y 18 de la Decisión 486 y de acuerdo al análisis realizado por el examinador en el oficio No. 2612 y las objeciones planteadas allí, el solicitante se permite manifestar que con



base en los comentarios señalados en el transcurso de la presente respuesta, a continuación desarrollo los argumentos relacionados con la actividad inventiva, considerando que la materia objeto de estudio es la que ahora se reclama en la Reivindicación 1. Por tanto, a continuación exponemos nuestros análisis en relación con la información divulgada en D1 y D2.

El Examinador considera que D1 es el estado de la técnica anterior más próximo a la presente invención. D1 es un trabajo de investigación relacionado con la identificación de inhibidores peptídicos novedosos de ecto-ADP-Ribosil Ciclasa de BST1.

El documento divulga la identificación de dos péptidos 15mer los cuales inhiben la ADP-Ribosil Ciclasa del BST1. Este documento indica que los anticuerpos contra BST-1 inducen la fosforilación de tirosina de las proteínas intracelulares.

No hay discusión en ninguna parte de D1 sobre la idoneidad de BST-1 como un objetivo terapéutico para los anticuerpos, o la existencia de anticuerpos para este objetivo que puedan inducir la muerte celular.

Contrariamente a esto, la presente invención describe la producción de anticuerpos específicos para BST-1 que pueden causar la muerte celular mediante la inducción de ADCC o por la interiorización de una toxina celular.

A la luz de estas diferencias el problema a ser resuelto no es simplemente el suministro de nuevos anticuerpos para BST-1, como ha afirmado el Examinador, sino más bien, éste puede ser considerado ser el suministro de anticuerpos **que son capaces de inducir la muerte celular**. En el presente caso, el problema se resuelve por el desarrollo de los anticuerpos reivindicados de la invención.

La persona versada en la materia que examine D1 puede aprender que ADP-Ribosil Ciclasa de BST-1 puede ser inhibido por un péptido sintético. Ellos aprenden de la existencia de anticuerpos contra BST-1 y que BST-1 puede funcionar como moléculas receptoras al ser parte de una ruta de transducción de señal.

Como se indicó anteriormente, no hay ningún indicio en D1 que esta molécula sería un objetivo idóneo para anticuerpos que pueden causar la muerte celular. Además, no hay ningún indicio que los anticuerpos descritos en D1 pueden causar la muerte celular ya sea por el ADCC o por la vía ADC. En este contexto, los inventores han encontrado sorprendentemente que los anticuerpos reivindicados para BST-1 **pueden inducir la muerte celular a través de ambas vías ADCC y ADC** haciendo estas candidatos prometedores para las terapias contra desordenes/trastornos donde se manifiesta BST-1.

La persona versada en la técnica que busca direccionar el problema técnico de la identificación de anticuerpos terapéuticos y examinando D1 no obtendría ningún indicio sobre cuáles anticuerpos contra BST-1 serían idóneos para este propósito y, por tanto, no habría ninguna motivación para producir estos, o para considerar combinar las enseñanzas de D1 con D2. Por lo tanto, se afirma que las reivindicaciones son inventivas sobre la técnica anterior.



Sin embargo, incluso si la persona versada en la técnica fuera motivada a considerar D2 a la luz de la enseñanza de D1, se afirma que la combinación de estos documentos no los conduciría a la presente invención.

D2 divulga simplemente la existencia de un anticuerpo monoclonal para CD157. Este documento indica que CD157 está involucrado en interacciones entre las células del cáncer de ovario y está implicado en la migración y difusión celular. Este (D2) revela que altos niveles de expresión de CD157 en los tumores de ovario se relacionan con un peor pronóstico para los pacientes, que el de los pacientes que tienen tumores con menor expresión.

Finalmente los autores especulan que CD157 puede servir como un novedoso objetivo de las terapias para el control de la invasión y difusión de la cavidad peritoneal por las células de cáncer de ovario seroso. No hay absolutamente ningún dato publicado para apoyar esta especulación y, no hay discusión más allá de la mera especulación, de la idoneidad de BST-1 como objetivo terapéutico para los anticuerpos, o la existencia de anticuerpos para este objetivo que puedan inducir la muerte celular.

Este documento no enseña a la persona versada en la técnica nada diferente de lo que ya había dicho D1.

Por lo tanto, la persona versada en la técnica examinando D1 y D2 conjuntamente no estaría motivado a producir anticuerpos terapéuticos contra BST-1 porque no hay ningún indicio en ninguno de los documentos sean revisados de forma individual o en conjunto que los anticuerpos contra BST-1 tendrían algún efecto terapéutico. Por lo tanto, las reivindicaciones actuales deben ser consideradas inventivas.

En relación con la Reivindicación 26, se afirma que puesto que los anticuerpos de la invención son inventivos, el método de producción del anticuerpo debe ser también inventivo.

1.7.1. Conclusión

Basándose en los argumentos establecidos en la presente respuesta y con las modificaciones propuestas en el nuevo capítulo reivindicatorio, se considera que se han superado los cuestionamientos de falta de claridad. Adicionalmente, dado que los anticuerpos de D1 y D2 son diferentes y tienen un objetivo distinto a los que se pretende mediante el desarrollo de la presente invención, no existe en el estado de la técnica evidencia alguna que lleve a establecer que la presente invención no sea novedosa o inventiva.

Con todo respeto, es necesario que el examinador base sus argumentos en información existente en el estado de la técnica y no descontextualice la información para probar que era posible producir el objeto de la presente solicitud.

En este orden de ideas, se solicita a ese despacho que efectúe el análisis de la información **en el contexto en que la misma es suministrada**. Son muy diferentes las características y propiedades del anticuerpo de la presente invención, si se compara con los anticuerpos existentes en el estado de la técnica e igual ocurre con el método que aquí se reivindica. Siendo así, no hay razón alguna para negar el anticuerpo y el método que se reclama en el nuevo capítulo reivindicatorio.



2. Anexo

- 2.1 El nuevo capítulo reivindicatorio, por medio del cual se evidencian los ajustes realizados, conforme a los argumentos expuestos en la actual respuesta.
- 2.2 Anexo I. Artículo adjunto de Kohls y Lappi. Mab-Zap: A Tool For Evaluating Antibody Efficacy For Use In An Immunotoxi.

3. Petición

De acuerdo a lo manifestado en el numeral 1 del presente escrito, así como el nuevo capítulo reivindicatorio que se anuncia en el numeral 2, hemos cumplido con los requerimientos exigidos por su Despacho, por lo que me permito elevar mi respetuosa petición de practicar el examen de fondo, en concordancia con el Artículo 45 de la Decisión 486 de la Comunidad Andina, reconocer el cumplimiento de la totalidad de los requisitos de patentabilidad y en consecuencia, otorgar el privilegio de patentes para la presente invención, de acuerdo al nuevo capítulo reivindicatorio.

Del Señor Jefe,


JUAN CARLOS URIBE RESTREPO
C.C. No. 79.159.313 de Bogotá
T.P.A. 54.493 de Min. Justicia

4290210439612/mgr
Colo 6213 0301 62827

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que se une específicamente con BST1, comprendiendo dicho anticuerpo:
 - a) una región variable de cadena pesada que comprende:
 - i) una primera vhCDR que comprende la SEC ID NO: 10;
 - ii) una segunda vhCDR que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de la SEC ID NO: 12 y la SEC ID NO: 51; y
 - iii) una tercera vhCDR que comprende la SEC ID NO: 14; y
 - b) una región variable de cadena ligera que comprende:
 - i) una primera vlCDR que comprende la SEC ID NO: 16;
 - ii) una segunda vlCDR que comprende la SEC ID NO: 18; y
 - iii) una tercera vlCDR que comprende la SEC ID NO: 20.
2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende:
una cadena pesada de la SEC ID NO: 2, y
una cadena ligera de la SEC ID NO: 4.
3. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende:
una cadena pesada de la SEC ID NO: 46, y
una cadena ligera de la SEC ID NO: 49.
4. Un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, el cual compite por la unión a BST1 o une un epítipo en BST1 reconocido por un anticuerpo de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

5. El anticuerpo como se reivindica en la reivindicación 1 a 4, en donde el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa de un isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.
6. El anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende además un motivo unido covalentemente.
7. El anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el motivo es un fármaco.
8. El anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dicho fármaco se selecciona del grupo que consiste de un maitansinoide, una dolastatina, una auristatina, un tricoteceno, una calicheamicina, CC1056 y derivados de los mismos.
9. El anticuerpo aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dicho anticuerpo induce la citotoxicidad mediada por una célula dependiente de un anticuerpo (ADCC), la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y/o la citotoxicidad de célula T.
10. El anticuerpo aislado de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el anticuerpo es un anticuerpo diseñado que tiene unión incrementada para los receptores Fc y/o la potencia incrementada para ADCC, y/o el anticuerpo biespecífico.
11. El anticuerpo aislado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, 9 o 10, en donde el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico o multiespecífico que se une específicamente a un primer antígeno que

- comprende BST1 y un segundo antígeno seleccionado del grupo que consiste de un antígeno CD3 y un antígeno CD5.
12. Un ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores y comprende la secuencia SEQ ID NO:6.
 13. Un ácido nucleico que codifica una cadena ligera del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y comprende la secuencia SEQ ID NO:8.
 14. Una célula huésped que contiene ácidos nucleico de la reivindicación 12 y/o 13.
 15. Un método para hacer un anticuerpo que comprende cultivar una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 14, bajo condiciones en donde el anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo está expresado, y aislar opcionalmente el anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo.

Mab-Zap: A Tool for Evaluating Antibody Efficacy for Use in an Immunotoxin

Matthew D. Kohls and Douglas A. Lappi
Advanced Targeting Systems, San Diego, CA, USA

BioTechniques 28:162-165 (January 2000)

ABSTRACT

Immunotoxins, consisting of antibodies coupled to toxins, are extremely useful tools in the elimination of specific cell populations in vitro and in vivo for research and therapeutic applications. The antibody is used to target the toxin to a specific cell population, which is distinguished by its cell-surface antigen. Not all antibodies are suitable for creating an immunotoxin, and large numbers of antibodies may need to be screened. This is a time-consuming and expensive process if each potential candidate must be conjugated to the toxin and purified. A faster and more economical way to identify potential targeting antibodies is to use a second immunotoxin, an anti-IgG antibody that is coupled to the toxin. The second immunotoxin eliminates the need to couple every candidate antibody to the toxin because it can simply be added to cells in culture with the antibody of interest. Using this method, many antibodies can be screened quickly and efficiently for their ability to internalize.

INTRODUCTION

Immunotoxins are widely used to eliminate specific cell populations in vitro and in vivo for both basic research and pharmaceutical development. Immunotoxins are frequently cited in the neurosciences, where immunolesioning agents can be constructed from antibodies to specific cell types for the study of behavior (8). 192 IgG-SAP is the most specific and potent lesioning agent available for the cholinergic neurons of the basal forebrain (9), and reports of its use have appeared in over 100 publications. Immunotoxins may also have therapeutic applications: an anti CD-7-SAP immunotoxin is in preclinical development for the treatment of leukemia (4), for example.

The creation of an immunotoxin is a long and costly process. An antibody to the antigen of choice must be produced, and the performance of the antibody as part of an im-

munotoxin must be evaluated. Desirable traits of an immunotoxin antibody include high specificity and rapid internalization. The choice of the correct antibody is crucial to the performance of an immunotoxin because a well-chosen antibody allows the complete elimination of a specific cell population with no nonspecific killing. If the antibody is to be conjugated to the toxin, both the unconjugated antibody and the free toxin must be purified away from the conjugate. Screening large numbers of antibodies for immunotoxin capabilities in this manner would be prohibitively expensive in both cost and time. The ability to perform a primary screen before conjugation and purification is a great advantage in the creation of an immunotoxin. Weltman et al. reported on a ricin-based second immunotoxin for screening monoclonal antibodies to tumor associated antigens (7).

Advanced Targeting Systems has created a second immunotoxin that is a useful tool for screening antibodies as potential immunotoxins. Called Mab-ZAP, this second immunotoxin is a goat anti-mouse polyclonal anti-IgG antibody that is conjugated to saporin, the most potent of the plant ribosome-inactivating proteins (5). Saporin induces cell death by apoptosis (1). The mechanism of action of Mab-ZAP is detailed in Figure 1. Use of a second immunotoxin eliminates the time-consuming and expensive step of conjugating each candidate antibody to the toxin: it can simply be added to cells in culture conditions together with the antibody of interest. Mab-ZAP allows a large number of antibodies to be screened quickly and efficiently or individual monoclonals to be evaluated for efficacy for use in an immunotoxin.

MATERIALS AND METHODS

These experiments are designed to demonstrate the specificity and function of Mab-ZAP and also show that Mab-ZAP will not be internalized easily by cells unless a primary anti-

body is present. Mab-ZAP and 192 IgG are administered to cells in culture both singly and together, and elimination of cells is measured. The results are also compared to the proven conjugate 192 IgG-SAP (Advanced Targeting Systems, San Diego, CA, USA).

Cells

C6 cells, a rat glioma cell line shown to express p75 (10), were obtained from ATCC (Manassas, VA, USA) and single-cell cloned for sensitivity to 192 IgG-SAP, creating cell line C6/9. Cells are maintained in F12K medium with 2 mM L-glutamine, 15% horse serum, 2.5% FBS, 1.5 g/L sodium bicarbonate and penicillin-streptomycin.

Antibodies and Immunotoxins

Mab-ZAP is a goat anti-mouse IgG covalently linked to saporin, a ribosome-inactivating protein (RIP) from the seeds of the plant *Saponaria officinalis* (3,6). 192 IgG is a mouse monoclonal antibody to the rat low-affinity nerve growth factor receptor, also known as p75 (2). Xpress™ antibody, a

mouse monoclonal antibody to an N-terminal tag used in protein expression in the Xpress system was a gift from M. Berg-seid (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Cytotoxicity Assay

We prepared 96-well microplates (Corning, Corning, NY, USA) by plating C6/9 cells at 2500 cells/90 μ L/well. The plates are incubated 16 h at 37°C in the presence of 5% CO₂. The medium used is F12K that contains 2 mM L-glutamine, 15% horse serum, 2.5% FBS, 1.5 g/L sodium bicarbonate and penicillin-streptomycin.

Antibodies and Mab-ZAP are added in a volume of 10 μ L, bringing the well volume to 100 μ L. The plates are incubated 96 h at 37°C in the presence of 5% CO₂. For each plate, 75 μ L phenazine methosulfate (0.92 mg/mL in Dulbecco's PBS) are added to 1.5 mL (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS, 2 mg/mL in Dulbecco's PBS [both from Promega, Madison, WI, USA]), and 20 μ L are added to each well. The plates are incubated 1 h at 37°C in the presence of 5% CO₂.

The plates are read at 492 nm in a Spectra Max 340® and data analyzed using SOFTmax PRO 2.2.1® (both from Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) and GraphPad Prism™ (GraphPad, San Diego, CA, USA). A 4-parameter curve is generated using concentration and percent of control cells surviving, and the concentration of primary antibody at which the antibody + Mab-ZAP complex eliminates fifty percent of the cells (ED₅₀) is calculated from that curve.

RESULTS

First, a competitive assay demonstrates that the ability of Mab-ZAP in conjunction with 192 IgG to eliminate C6/9 cells is comparable to 192 IgG-SAP. To avoid 192 IgG binding to p75 positive cells and internalizing before complexing, Mab-ZAP is always added to the wells first. Another alternative is to preincubate Mab-ZAP and 192 IgG together before adding them to the wells. Sequential addition was chosen because it is much more efficient than preincubation for screening large numbers of primary antibodies. As seen in Figure 2, although the ED₅₀s listed in the table for Mab-ZAP + 192 IgG are quite similar for the three concentrations of Mab-ZAP assayed, the curve generated by 50 ng/well most closely approximates that generated by 192 IgG-SAP. The ED₅₀s in Figure 2 also show that Mab-ZAP + 192 IgG is three to four-fold less effective than the directly conjugated 192 IgG-SAP.

The curve generated with 10 ng/well Mab-ZAP demonstrates that the elimination effect is diluted out by excess levels of free primary antibody (Figure 2). At low concentrations of Mab-ZAP and higher concentrations of 192 IgG, not all the 192 IgG that has complexed with Mab-ZAP is internalized because uncomplexed 192 IgG competes for the same sites on the C6/9 cells. For example, when 192 IgG is at 10 nM and Mab-ZAP is at 10 ng/well, there is approximately a 210-fold excess of free 192 IgG over complexed Mab-ZAP + 192 IgG.

By itself, Mab-ZAP is not internalized at working concentrations. This fact is significant because no activation is necessary for the Mab-ZAP molecule to stop protein synthesis, only internalization so that the RIP (saporin) has access to the cellular ribosomes. As shown in Figure 3, significant cell

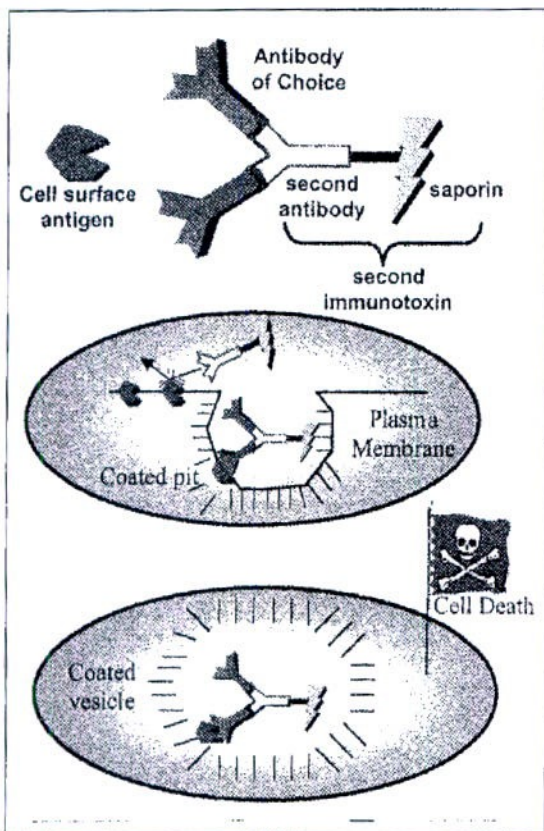


Figure 1. Schematic representation of Mab-ZAP design and function. (A) Mab-ZAP is represented as a second antibody coupled to the ribosome-inactivating protein saporin. Saporin is represented as a lightning bolt. The candidate antibody for an immunotoxin is represented by the antibody of choice. (B) The Mab-ZAP-antibody complex binds the cell-surface antigen and is internalized, but Mab-ZAP alone cannot enter the cell. (C) Once internalized, saporin inactivates the ribosomes, protein synthesis ceases and cell death occurs.

death occurs only above 0.25 $\mu\text{g}/\text{well}$ of Mab-ZAP. Cell death is caused by bulk phase endocytosis, which would include Mab-ZAP. As the concentration of Mab-ZAP approaches 250 ng/well , the number of cells returns to 100% of control. In the absence of a primary antibody, Mab-ZAP is only internalized at high concentrations above 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

The internalization of Mab-ZAP is mediated by 192 IgG. The addition of Xpress antibody demonstrates that the elimination of cells by Mab-ZAP + 192 IgG is diminished by competing the 192 IgG away from Mab-ZAP with an antibody lacking a cell-surface antigen. (The product binds the mouse monoclonal Xpress antibody, but the Xpress antibody has no cell-surface antigen on C6/9 cells. Therefore, the Mab-ZAP + Xpress complex does not bind the cells and become internalized.) Figure 4 shows that the Xpress antibody does compete away Mab-ZAP from 192 IgG; at 1000 ng/well of Xpress antibody, the cell population returns to 78% of control. This re-

sult is compared to 100 pM 192 IgG + 50 ng/well Mab-ZAP without Xpress antibody, which eliminates >50% of the cell population, as shown in Figure 2.

The final step is to demonstrate the effect of varying the Mab-ZAP concentration in the presence of a constant concentration of 192 IgG. Figure 5 shows the effect when Mab-ZAP is diluted out against several concentrations of 192 IgG. As the Mab-ZAP concentration reaches 1 ng/well , surviving cells approach 100%. These data reinforce the data from Figure 2; for C6/9 cells, the most effective Mab-ZAP concentration is from 50–100 ng/well . A stoichiometric effect is also seen: as the number of 192 IgG molecules increases relative to Mab-ZAP molecules, fewer cells are eliminated. Increased levels of free 192 IgG cause the ratio of Mab-ZAP + 192 IgG complexes to free 192 IgG to decrease. More free 192 IgG and fewer 192 IgG + Mab-ZAP complexes bind p75 and are internalized. Figure 5 illustrates the elimination of fewer cells with 1 nM 192 IgG than with 10 pM 192 IgG between 0.39 and 25 ng/well of Mab-ZAP.

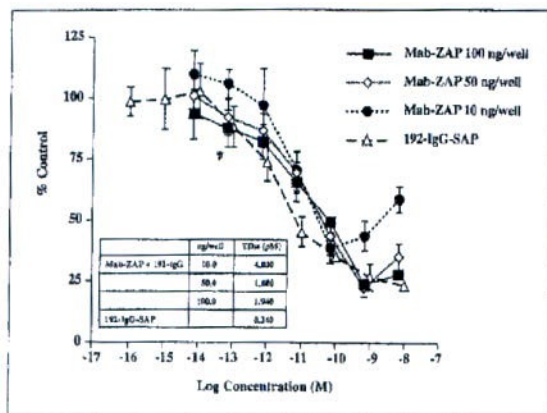


Figure 2. Assay of varying concentrations of Mab-ZAP with a dilution curve of 192 IgG. C6/9 cells are plated as previously described, then 10, 50 or 100 ng/well of Mab-ZAP are added, followed by a dilution curve of 192 IgG from 10 nM to 0.1 μM . The concentration of 192 IgG is plotted against the percent control of treated cells. 192 IgG-SAP is added to a separate plate of C6/9 cells. The table compares the ED_{50} s of the varying concentrations of Mab-ZAP + 192 IgG to those of 192 IgG-SAP. A 4-parameter curve is generated for each set of data using Graphpad Prism. The program also calculates the ED_{50} for each data set from the curve.

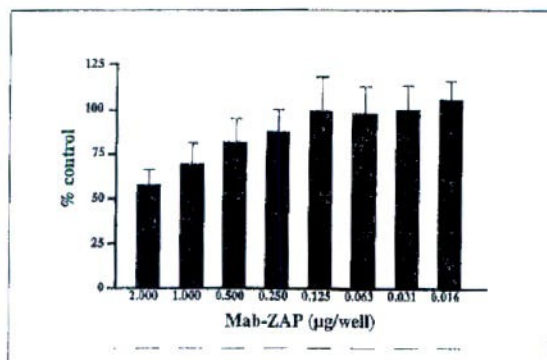


Figure 3. Mab-ZAP alone affects cell growth only above 0.25 $\mu\text{g}/\text{well}$. C6/9 cells are plated as previously described and treated with a dilution curve of Mab-ZAP. Mab-ZAP is added to C6/9 cells in dilutions from 2 $\mu\text{g}/\text{well}$ down to 0.016 $\mu\text{g}/\text{well}$. The concentration of Mab-ZAP is plotted against the percent control of treated cells.

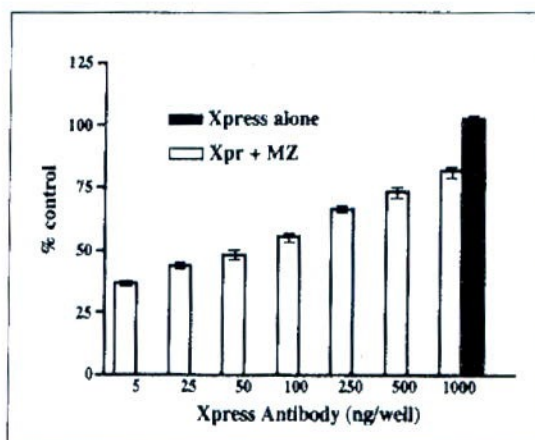


Figure 4. 192 IgG is competed away from Mab-ZAP by Xpress antibody. C6/9 cells are plated as previously described. Xpress antibody is added to the cells from 5–3000 ng/well . 192 IgG is added to a final concentration of 100 pM in each well, then Mab-ZAP is added to each well at 50 ng/well . The amount of Xpress antibody is plotted against the percent control of treated cells.

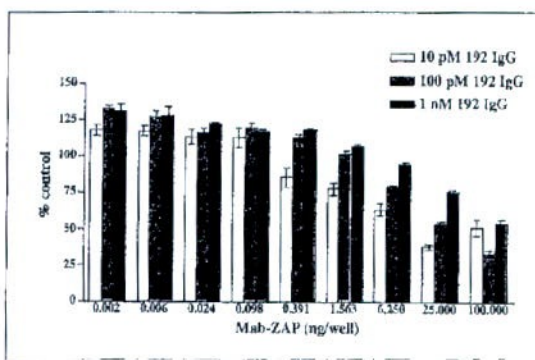


Figure 5. C6/9 cells treated with a dilution curve of Mab-ZAP and a constant concentration of 192 IgG give a dose-dependent response. Mab-ZAP is added to wells in a curve from 100 ng/well to 2 pg/well . Wells are also treated with 1 nM, 100 pM or 10 pM 192 IgG. Mab-ZAP (ng/well) is plotted against the percent control of treated cells.

DISCUSSION

The usefulness of immunotoxins as research reagents and therapeutics is widely recognized, but efficient use of this technology requires an effective screening process. In these experiments, the effectiveness of the second immunotoxin, Mab-ZAP, as a valuable tool for screening is demonstrated. A second immunotoxin demonstrates a candidate antibody's binding and internalization characteristics. It also facilitates narrowing down the number of antibody candidates for immunotoxins, which allows a concentration of time and effort on those antibodies that have the characteristics necessary to make an effective immunotoxin: specificity and internalization.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Denise Higgins for helpful discussions and manuscript review.

REFERENCES

1. Bergamaschi, G., V. Perfetti, L. Tonon, A. Novella, C. Lucotti, M. Danova, M.J. Glennie, G. Merlini and M. Cazzola. 1996. Saporin, a ribosome-inactivating protein used to prepare immunotoxins, induces cell death via apoptosis. *Br. J. Haematol.* 93:789-794.
2. Chandler, C.E., L.M. Parsons, M. Hosang and E.M. Shooter. 1984. A monoclonal antibody modulates the interaction of nerve growth factor with PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 259:6882-6889.
3. Lappi, D.A., F.S. Esch, L. Barbieri, F. Stirpe and M. Soria. 1985. Characterization of a *Saponaria officinalis* seed ribosome-inactivating protein: immunoreactivity and sequence homologies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 129:934-942.
4. Morland, B.J., J. Barley, D. Boehm, S.U. Flavell, N. Ghaleb, J.A. Kohler, K. Okayama, B. Wilkins and D.J. Flavell. 1994. Effectiveness of HB2 (anti-CD7)—saporin immunotoxin in an *in vivo* model of human T-cell leukaemia developed in severe combined immunodeficient mice. *Br. J. Cancer* 69:279-285.
5. Stirpe, F., L. Barbieri, M.G. Battelli, M. Soria and D.A. Lappi. 1992. Ribosome-inactivating proteins from plants: present status and future prospects. *Biotechnology* 10:405-412.
6. Stirpe F., A. Gasper-Campani, L. Barbieri, A. Falasca, A. Abbondanza and W.A. Stevens. 1983. Ribosome-inactivating proteins from the seeds of *Saponaria officinalis* L. (soapwort) of *Agrostemma githago* L. (corn cockle) and of *Asparagus officinalis* (asparagus) and from the latex of *Hura crepitans* L. (sandbox tree). *Biochem. J.* 216:617-625.
7. Weitman, J.K., P. Pedroso, S.A. Johnson, D. Davignon, L.D. Fast and L.A. Leone. 1987. Rapid screening with indirect immunotoxin for monoclonal antibodies against human small cell lung cancer. *Cancer Res.* 47:5552-5556.
8. Wenk, G.L. 1997. The nucleus basalis magnocellularis cholinergic system: one hundred years of progress. *Neurobiol. Learn. Mem.* 67:85-95.
9. Wiley, R.G., T.N. Oeltmann and D.A. Lappi. 1991. Immunocloning: selective destruction of neurons using immunotoxin to rat NGF receptor. *Brain Res.* 562:149-153.
10. Zanellato, A., L. Facci, L. Petrelli, R. Dal Toso and S.D. Skaper. 1994. Characterization and growth-dependent regulation of the nerve growth factor receptor gp140trk in rat C6 glioma cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 23:299-309.

Address correspondence to Dr. Douglas A. Lappi, Advanced Targeting Systems, 11175-A Flinikote Avenue, San Diego, CA 92121 USA. Internet: targeting@atsbio.com