

## בחינה בכתב בעריכת פטנטים

יולי 2011

### עריכת פירוט: ביוטכנולוגיה

עריכת הבקשה במבחן זה צריכה להתבסס על המכתב והמאמר המצורפים אשר התקבלו מן הממציא ומסכמים באופן מלא את הידיעות שבבסיס האמצאה דנן.

לפני שתפנו לעריכת הבקשה, אנא קראו בעיון את ההנחיות הבאות:

1. הבקשה צריכה לכלול פרוט ומערכת תביעות אשר יתאימו לקבלה של פטנט במדינות שונות בעולם.

2. הבקשה צריכה לכלול תביעות עבור כל האספקטים שהם לדעתכם כשירי פטנט באמצאת הממציא. זכרו, אין לתבוע אספקטים שאינם עומדים בדרישות החוק.

3. אין לכם מגבלה על כמות התביעות הכלולה בבקשה. בעריכת מערכת התביעות אין צורך להתחשב בדרישות אחידות האמצאה (דהיינו מערכת התביעות יכולה לכלול יותר מ"אמצאה" אחת).

4. במידה ומערכת התביעות שערכתם כוללת תביעות המתאימות למדינה/רשות אחת ולא אחרת, אנא ציינו זאת בבהירות. ניתן לערוך את הבקשה כך שתכלול מערכת תביעות שלמה המיועדת למדינה אחת ולהוסיף רק את התביעה/תביעות ראשית/ראשיות עבור כל אחת מן המדינות בהן הניסוח שונה.

5. הפירוט והתביעות צריכים לעמוד בדרישות הסעיפים 12 ו-13 לחוק הפטנטים הישראלי וסעיפי חוק מקבילים במדינות אחרות.

6. בהתייחסות לחומר הכתוב המצורף, יש לצאת מנקודת ההנחה כי כל הידע הקודם הובא בפניכם וכי התיאור הקצר של אותו ידע קודם ממצה. להזכירכם, זהו אינו מבחן בביוטכנולוגיה.

7. היה ולדעתך חסר מידע שעל הממציא להשלים, יש להוסיף שאלות והערות לעניין זה (באופן מודגש, בפניה לממציא, כך שיהיה ברור שאין זה חלק מהפירוט ובנוסף יהיה ברור מה מהות המידע החסר) במקום מתאים בטקסט או ברשימה נפרדת. נא לא לשאול שאלות מיותרות. על שאלות שאין בהן צורך ואשר מעידות על חוסר הבנה יורד ציון.

8. הציון במבחן ייקבע לפי השקלול הבא:

- הבנת מהות האמצאה כפי שזו תבוא לידי ביטוי בהגדרה/הגדרות הכללית/הכלליות בפירוט ובתביעות הבלתי תלויות: **25%**

- ניסוח כולל של מערכת התביעות: **30%**

## בחינה בכתב בעריכת פטנטים

יולי 2011

### עריכת פירוט: ביוטכנולוגיה

○ יופחת ציון על אספקטים שלא נתבעו וכן על אספקטים שאינם עומדים בדרישות של חוקי הפטנטים. למשל, כל אספקט שנתבע צריך לעמוד בדרישות התועלת או Utility (ס' 3 לחוק הפטנטים הישראלי וסעיפים מקבילים במדינות אחרות)

- התייחסות נכונה לדרישות חוקי הפטנטים במדינות שונות, כפי שתבוא לידי בתביעות: **10%**

- תיאור: **25%**

- הערכה כללית, לרבות מהות השאלות שיופנו לממציא: **10%**

### ציון עובר: 70

מגבלת הזמן שמוטלת על הנבחנים תילקח בחשבון בחישוב הציון.

אנא קרא/קרא את המבחן בעיון. מומלץ לגשת ראשית לעריכת התביעות העצמאיות ולאחר מכן את התביעות התלויות ולאחר מכן לערוך את הפירוט בכללותו על סמך התביעות. אם כי כל אחד ואחת רשאים כמובן לעבוד באופן הנוח לו/לה. היה ולא יוותר די זמן להשלים את הכתיבה, יש לפחות לכלול הסבר קצר שיבהיר אלו קטעים חסרים ומה יהיה כלול בהם.

שימי/שים לב שהשיטות המדעיות המתוארות אינן מלאות וזה נעשה כדי למנוע מכם עסוק בפרטים מיותרים. הניח/הניח שתאור השיטות הללו מלא. כמו כן גם מקטעי חומצות האמינו ומקטעי חומצות הגרעין הם חלקיים כאשר האמצע שלהם חסר (יש מקטע של נקודות במקום וזאת כדי שלא להכביד על הדפים שלא לצורך). התייחסו לאלה כאילו שהאמצע קיים (אתם יכולים להכניס את הללו לפירוט באותו האופן). אין גם צורך לשאול את הממציא שאלות בעניין זה.

**בהצלחה!**

## בחינה בכתב בעריכת פטנטים

יולי 2011

### עריכת פירוט: ביוטכנולוגיה

מועמד יקר,

אני מצרף מאמר שכתבתי יחד עם חוקרים מהמחלקה שלי שהוא סיכום של מחקר ביולוגי שנערך על פני מספר שנים, שעומד להתפרסם בקרוב.

הממצאים המדווחים במאמר עשויים, לדעתי, לשמש, בין היתר, בסיס לפיתוח תרופה לסרטן הכבד. בקצרה, מצאתי, שאצל חולים בסרטן הכבד יש עליה גדולה מאד ברמה של חלבון ממבראנלי על תאי הכבד הסרטניים. חלבון זה (שלו נתנו את הכינוי liver cancer-associated membrane antigen ובקיצור LICAMA הינו חלבון חדש והינו וריאנט קיטוע (splice variant) של חלבון ידוע (Helbon123) אשר מופיע בתאי כבד נורמאליים.

הממצאים שבידנו מביאים אותנו למסקנה כי ה-LICAMA קשור לתהליך הסרטני. פרקציה מסיסה של החלבון (S-LICAMA) מופיעה בדם ונראתה קורלציה מובהקת בין רמתה בדם להתפתחות המחלה. במהלך שנות המחקר בעניין זה היו לנו מספר ממצאים מרתקים הקשורים ב-LICAMA אשר מדווחים במאמר המצורף.

גילוי ה-LICAMA, ה-S-LICAMA והקורלציה שבין הרמה של S-LICAMA לבין חומרת המחלה הוצגו על ידי בכנס בינ"ל שנערך בחודש מאי 2011 ב-Rivendell (כנס של ה-Elfian Society for Cancer Research). אציין כי פרסום כתוב של העבודות שהוצגו בכנס צפוי לצאת לאור ב-15 באוגוסט 2011 (Baggins, F., 2011, New ) (liver cancer-associated proteins, Proc. It. Soc. Can. Res. 12: 234-236).

בעקבות אותה מצגת בכנס הנ"ל פנתה אלי חברת ההשקעות Rohirim Associates והביעה עניין בהקמת חברה שתתקח על עצמה את המשך פיתוח תרופה ואולי גם אספקטים אחרים שנובעים ממחקרינו. יש אם כן חשיבות רבה להגיש בקשת פטנט בהקדם.

אנא ידע אותי אם נדרש לך חומר נוסף. אשמח גם אם תנחה אותי על פעולות שעלי לנקוט כדי להבטיח הגנת פטנט.

בברכה,

ד"ר פרודו בגינס

**New Liver Cancer-Associated Proteins: Novel Target for Liver Cancer Therapy**

Frodo Baggins, F. Samwise Gamgee, Meriadoc Brandybuck and Peregrin Took

Department of Biotechnology and Biochemistry, The Shire University

North-West Middle-Earth

**Introduction**

Primary liver cancer, hepatocellular carcinoma (HCC), is among the leading cancer diseases in prevalence in Asia and its incidence is on the rise throughout the world. Patients with hepatitis B or C virus (HBV or HCV) infection are at risk of developing liver cancer. Additional populations susceptible to this risk are patients that suffer from cirrhosis (scarring of the liver) that may occur as a result of alcohol abuse, chronic liver inflammation, HBV or HCV infection and some other factors. In most cases the disease is diagnosed at a relatively advanced disease stage and the prognosis is poor. Complete tumor resection by surgery can be accomplished in less than 20% of the patients. While in such patients the prognosis is fair, in other patients the prognosis is poor with a median life expectancy of less than 6 months. Treatment of HCC by chemotherapy or radiation is usually ineffective.

Gandalf et al., 2002 (J. Cancer Res., 45: 678) found that in the serum of HCC patients there is an increased level of a certain protein that was absent from serum of healthy individuals and of patients with other solid tumors. This group was unable to characterize the protein and could only identify it by its molecular weight, of 34 kilo Dalton (kD), through electrophoresis (thus, accordingly denoting this protein as "HCC-associated antigen 34" (HCCAA34)). Gandalf et al., noted that the correlation between the occurrence of HCC and the level of HCCAA34 is a phenomenon that merits further investigation and postulated their belief that further characterization of HCCAA34 may form a basis for the development of a therapy to treat HCC.

Gimly et al., 2004 (J. Clin. Oncol. 71: 1234) raised goat polyclonal antibodies against HCC cell lines and reacted them with sera of HCC patients. They found that a fraction of this polyclonal antibody preparation reacted strongly with the HCC sera. They concluded that the HCCAA34 is correlated in some way with HCC cells.

# בחינה בכתב בעריכת פטנטים

יולי 2011

## עריכת פירוט: ביוטכנולוגיה

Through the use of the anti-HCC polyclonal antibody preparation described by Gimly et al, 2004 (and which was kindly provided by them) we managed to isolate and subsequently characterize an antigen on the cell surface of the HCC cells which binds to the same antibodies that bind to HCCAA34. We found this antigen to be a 43 kD membrane-bound protein. We have denoted this protein as "liver cancer-associated membrane antigen" (LICAMA). We were also able to purify and sequence the HCCAA34 and found it to have a sequence identical to the extracellular portion of LICAMA. We denoted this soluble protein as S-LICAMA. We then cloned this protein in a CHO cell line and raised human monoclonal antibodies (mAbs) thereto. We tested some of these human mAbs and found them capable of blocking the proliferation of HCC cells in culture and slow tumor growth in animals. Our study demonstrates the potential of an antibody-based treatment that targets LICAMA in the treatment of HCC.

### **Materials and Methods**

#### *Polyclonal antibodies*

Goats anti-HCCAA34 antibodies were kindly provided by Gimly et al. These were raised by injecting crushed cells of the HCC cell line into goats and then isolating and purifying anti-serum from the goat serum, as described previously by Gimly et al (supra).

#### *Anti-HCCAA34 columns*

The goats anti-HCCAA34 antibodies were bound to gel beads using the procedure described by Aragorn et al, 2002 (Annals of Minas Tirith 17: 3455). The beads with these bound antibodies were packed into columns. These anti-HCCAA34 antibody columns were used in many of the experiments described below (termed herein as "A34 column").

#### *Isolation of S-LICAMA*

Pooled sera from 15 HCC patients were mixed with a suitable buffer and then passed through the A34 column. An elution buffer was then passed through the A34 column and all the proteins previously bound by the antibodies and released by this procedure were collected.

# בחינה בכתב בעריכת פטנטים

יולי 2011

## עריכת פירוט: ביוטכנולוגיה

### Binding Assays

S-LICAMA obtained through the procedure described above, was radioactively labeled as described by Legolas et al, 1998 (MD Biol. Methods 35: 456). The radioactive S-LICAMA was then introduced into an A34. The presence of radioactivity in the column, indicating binding, was verified. Tested protein preparations were passed through this radioactive A34 column and the existence of a protein that competes on binding and hence displaces the radioactively labeled S-LICAMA was assayed by measuring radioactivity in the eluate.

### Purification of LICAMA

The protein fraction from HCC cells, suspended in a buffer was passed through an A34 column. Non-bound proteins were removed, the bound fraction was then eluted and collected and then tested for purity using a two-dimensional electrophoresis. The eluted proteins were suspended again in a buffer and the process was repeated 2 more times. Eventually, a highly purified protein fraction was obtained. This protein was termed LICAMA.

### Gel Electrophoresis, Sequencing, Cloning and Monoclonal Antibodies Production and Antibody Humanization

Gel electrophoresis, protein sequencing, cloning of sequenced proteins in CHO cells, raising monoclonal antibodies and humanization of antibodies were all carried out in the manner described in Basic Biotechnology Technique, Saruman, W., editor (Isengard Publications, Inc., 2003).

## Results and Discussion

### Anti-HCCAA34 antibodies bind to soluble protein

Pooled sera from 15 HCC patients were passed through an A34 column. The non-bound fractions were removed and then the bound fraction was eluted and collected. Gel electrophoresis was carried out on this protein fraction that revealed that it contained a number of proteins, as summarized in Table 1:

# בחינה בכתב בעריכת פטנטים

יולי 2011

## עריכת פירוט: ביוטכנולוגיה

**Table 1**

Band No.	1	2	3	4	5
Apparent Molecular Weight (kD)	12	22	34	68	102
Amount (units*)	0.03	0.25	7.32	1.66	0.78

\* The unit was defined according to the method of Boromir et al, Proc. Shire Royal Acad. 76: 234. 1996

As the results in the table show, the dominant protein fraction had an apparent molecular weight of 34 kD, a finding that agrees well with that of Gandalf et al, 2002. This was the protein later denoted by us as S-LICAMA (this term will be used to denote the protein throughout this paper). Band Nos. 4 and 5 are likely dimeric and trimeric forms of S-LICAMA. Bands Nos. 1 and 2 may reflect degradation products of S-LICAMA or another impurity.

### Initial Characterization of LICAMA and S-LICAMA

Our hypothesis was that the correlation between the level of this protein in the serum and the occurrence of HCC in patients may be explained by the shedding of proteins expressed in HCC cells. We went on to test this hypothesis. We isolated cell membranes from the HCC cell line XYZ123, purified the protein fraction of these membranes and then re-suspended this protein fraction in a suitable buffer solution.

Membranes from the HCC cell line XYZ123 were isolated, treated so as to precipitate all of the proteins, the precipitate was collected and subjected to a two-dimensional gel electrophoresis and each protein fraction was then separately tested. Each of these fractions was extracted and dissolved in a buffer and then passed through an A34 column with radioactively-labeled S-LICAMA. The eluate was then checked for released radioactivity, such release indicating presence of an antigen that binds to the same antibody and hence displaces the radioactively-labeled S-LICAMA. The results are presented in Table 2:

**Table 2**

Protein fraction (arbitrary indications)	A	B	C	D	E	F	G
Amount of released radioactivity (% of radioactivity originally in the column)	2	1	0.5	78	2	1	0.3

# בחינה בכתב בעריכת פטנטים

יולי 2011

## עריכת פירוט: ביוטכנולוגיה

As it can be clearly seen, fraction D was the one that caused a marked displacement of the radioactively-labeled bound S-LICAMA indicating that this fraction has epitopes that bind to the antibodies and with equal affinities that bound the S-LICAMA.

In another assay, using the method adopted from Aragorn et al, 2005 (Proc. Royal Acad. Rohan 124: 12345) we found that the molecular weight of the above fraction D is 72 kD. This is in agreement with our hypothesis that the S-LICAMA is a soluble fraction of LICAMA that enters the circulation through shedding of the extracellular portion of this membrane protein.

### Sequencing of LICAMA and S-LICAMA

We sequenced each of these proteins using a protein sequencer kindly lent to us by Bree Biological Industries, Old Forrest, Middle Earth. The S-LICAMA was found to be a 363 mer protein (namely consisting of 363 amino acid residues) and LICAMA to be a 443 mer protein. The amino acid sequence of each of these proteins is shown in the following Figures 1 and 2:

---

1	MSTYHQNKDD EETSMCCAAS RGLLLLIVSS TTTAYYSAGG FLIMTTSQQN	50
51	.....	100
	.....	
300	FLTTTAAYYH QNNKDDEECR RRRSGGARFL LISSSYGAF SQQNCRRYQN	350
351	RRAAATTDDE AGL	363

**Figure 1: the amino acid sequence of S-LICAMA.**

---



# בחינה בכתב בעריכת פטנטים

יולי 2011

## עריכת פירוט: ביוטכנולוגיה

---

1	<b>MTYHQNKDDF</b> <b>MCCAASLLLV</b> <b>RGTTQLIVSS</b> <b>LIYYSAGIIV</b> <b>FLIMTTTVIL</b>	50
51	<b>VVIILLFFMM</b> <b>QNNKDDEECR</b> <b>WWGGAADVIL</b> <b>MSTYHQNKDD</b> <b>EETSMCCAAS</b>	100
101	.....	150
	.....	
401	<b>RRRSGGARFL</b> <b>LISSYYGAF</b> <b>SQQNCRRYQN</b> <b>RRAAATTDDE</b> <b>AGL</b>	443

**Figure 2: the amino acid sequence of LICAMA. The portion that is emphasized by bold letter is the 80 amino acid trans-membrane portion of this protein; the remainder is the extracellular portion.**

---

As can be seen, by comparing the two sequences, the S-LICAMA sequence is identical to the extracellular portion of LICAMA. This suggests that S-LICAMA enters circulation through shedding of the extracellular portion of LICAMA.

### Cloning of S-LICAMA

Through the employment of standard techniques we have constructed a coding sequence of S-LICAMA shown in Figure 3.

---

1 AUGACUUAUCAC ..... UAA 1332

**Figure 3: Coding sequence that was prepared for S-LICAMA and that was used for cloning in CHO cells.**

---

The sequence was cloned in an open reading frame in CHO cells. A high yielding CHO cell line was obtained (C113 cell line). Pure S-LICAMA was harvested from the C113 cells using methods that have been previously described.

## בחינה בכתב בעריכת פטנטים

יולי 2011

### עריכת פירוט: ביוטכנולוגיה

#### Production of anti-S-LICAMA monoclonal antibodies

The pure S-LICAMA obtained from the CHO cells was used to immunize transgenic mice as described in US patent Nos. 6,114,598 and 6,682,736 and using techniques hitherto described (Saruman, *Supra*) we have obtained 12 hybridoma clones that produced anti-S-LICAMA monoclonal antibodies (mAbs) of the IgG2 type. The antibodies of all the clones were isolated and binding affinities to S-LICAMA produced by the C113 cells was measured. The binding affinity data is shown in Table 3:

**Table 3**

Clone	Binding Affinity to S-LICAMA
HY 004	$1.7 \times 10^{-7}$
HY 026	$2.5 \times 10^{-8}$
HY 067	$4.1 \times 10^{-9}$
HY 072	$8.5 \times 10^{-8}$
HY 093	$1.6 \times 10^{-11}$
HY 112	$6.3 \times 10^{-10}$
HY 117	$2.5 \times 10^{-12}$
HY 132	$7.9 \times 10^{-8}$
HY 156	$4.5 \times 10^{-12}$
HY 174	$7.2 \times 10^{-10}$
HY 178	$4.1 \times 10^{-10}$
HY 197	$3.5 \times 10^{-9}$

The 3 clones HY 093, HY 117 and HY 156 had the highest affinities and were chosen for further studies.

#### Inhibition of growth of tumor cells

Cells of the human HCC cell line HC321X were added into a culture medium at an amount of  $2 \times 10^5$  cells/ml.  $0.1 \mu\text{g/ml}$  of each of the 3 human mAbs was added into the culture medium. Cell count was measured after 24 and 48 hrs. Each experiment was repeated 3 times. A pool of non-specific human antibodies added at the same amount and cell grown without any addition served as control. The results are shown in Table 4

## בחינה בכתב בעריכת פטנטים

יולי 2011

### עריכת פירוט: ביוטכנולוגיה

**Table 4**

Treatment	Cell Count after 24 hrs	Cell Count After 48 hrs
HY 093	$1.3 \times 10^5$	$1.6 \times 10^5$
HY 117	$7.4 \times 10^4$	$6.3 \times 10^4$
HY 156	$1.1 \times 10^5$	$1.3 \times 10^5$
Non-specific antibody pool	$4.7 \times 10^5$	$8.5 \times 10^5$
No addition	$4.2 \times 10^5$	$8.8 \times 10^5$

The results show that while all 3 antibodies were successful in inhibiting the tumor cells' growth, the HY 117 mAb was especially efficacious as it even caused some cells' eradication, as evidenced by the lower count after 24 and 48 hrs. The HY 117 mAb was selected for further studies.

#### Animal Studies

Anti-cancer effect of HY 117 mAb was tested in nude mice xenograft models and measured by tumor size. HC321X cells were implanted into the mouse, the animals were sacrificed after 30 days and tumor volume was measured. HY 117 mAb were administered by an intraperitoneal (i.p.) injection at a dose of 1  $\mu$ g/Kg. Injection of a vehicle (saline) alone served as control.

In a first study, the animals were injected twice: once immediately after implantation of the tumor cells and the second one on day 15. In a second study the animal were treated by injection on day 15 only. The results are shown in Table 5:

**Table 5**

Study		Tumor Size (ml) on Day 30	
No.	Details	HY 117 mAb	Control
1	Injection on day 1 and 15	0.7	4.8
2	Injection on day 15 only	1.6	4.6

As can clearly be seen the data demonstrates the effectiveness of the HY 117 mAb in inhibiting HCC tumor development. While the growth inhibition observed in Study No. 1 was more effective, the

## בחינה בכתב בעריכת פטנטים

יולי 2011

### עריכת פירוט: ביוטכנולוגיה

results obtained in Study No. 2 are also impressive. In other studies we have tested the growth of tumor over time in this animal model.

These experiments demonstrated that on day 15 the tumor reached about 70% of the volume the tumor reaches on day 30. Thus, the results of Study No. 2 hint on the ability of an antibody that targets LICAMA to not only inhibit tumor growth but also eradicate an already established tumor. This is also supported by the *in vitro* data that we have obtained. It stands to reason that the potential therapeutic effect is not limited to the specific IgG2 antibodies that were tested and other antibodies, that bind to the same or a different epitope on the extracellular portion of LICAMA, may have a similar effect.

The tested human ant-S-LICAMA mAbs target an epitope on A-LICAMA which exists also on the extracellular portion of LICAMA. The nature of the anti-tumor effect that occurs upon binding of the antibody to LICAMA is not clear and needs to be elucidated by further experiments.

The antibodies against LICAMA may also find use in a variety other applications.

#### **Acknowledgement**

The authors would like to thank the Royal Shire Scientific Institute for their generous support (Grant No. ME-S-1234).

The authors would also like to thank Lady Galadriel for her useful comments and patronage.

The authors would finally like to thank the Council of Elrond for their inspiring contribution that may briefly be summarized as follows:

*Far over the misty mountains cold  
To dungeons deep and caverns old  
We must away ere break of day  
To seek the pale enchanted gold*