

**La protezione brevettuale nel settore farmaceutico:  
come si valutano i requisiti di brevettabilità  
di anticorpi monoclonali per uso terapeutico**

Tesi di laurea in  
Brevettistica e Socio-economia farmaceutiche  
Tesi pratico-professionale

Presentata da  
Sara Bertoli

Relatore  
Prof.ssa Patrizia Rampinelli

Matricola n° 0000592351

Correlatore  
Dott. Claudio Germinario



*Alla nonna Lola e al nonno Benvenuto*



# INDICE

<b>INTRODUZIONE</b> .....	<i>pag.</i>	V
 <b>CAPITOLO I</b>		
<b>Il brevetto farmaceutico</b> .....	<i>pag.</i>	7
1.1 Definizione di brevetto per invenzione .....	»	7
1.2 Oggetto del brevetto ed esclusioni dalla brevettabilità .....	»	8
1.3 Requisiti di brevettabilità .....	»	12
1.4 Struttura della domanda di brevetto .....	»	14
1.5 Diritto di priorità .....	»	16
1.6 SPC: <i>Supplementary Protection Certificate</i> .....	»	17
 <b>CAPITOLO II</b>		
<b>Regole generali per la protezione brevettuale di anticorpi per uso terapeutico</b> .....	<i>pag.</i>	19
2.1 Brevettabilità in settori specifici .....	»	19
2.2 Il concetto di novità applicato ai medicinali .....	»	20
2.3 Il requisito dell'attività inventiva in ambito farmaceutico .....	»	23
2.4 Brevettabilità degli anticorpi .....	»	25
 <b>CAPITOLO III</b>		
<b>Caso del brevetto ep 1537878: Uso di un Anticorpo monoclonale umanizzato nel trattamento del Melanoma</b> .....	<i>pag.</i>	33
3.1 Immunologia .....	»	33
3.1.1 Sistema immunitario innato e acquisito .....	»	33
3.1.2 Cellule immunitarie.....	»	35
3.1.2.1 Fagociti .....	»	35
3.1.2.2 Cellule che presentano l'antigene (APC) .....	»	35
3.1.2.3 Linfociti T .....	»	36
3.1.2.4 Linfociti B .....	»	37
3.1.3 Anticorpi .....	»	38
3.1.3.1 Struttura degli anticorpi .....	»	38
3.1.3.2 Funzioni principali svolte dagli anticorpi .....	»	40
3.1.3.3 Variabilità degli anticorpi .....	»	41
3.1.4 Frammenti di anticorpi .....	»	42
3.1.5 Anticorpi policlonali, monoclonali .....	»	43
3.1.6 Anticorpi per uso umano .....	»	44

3.1.7 Anticorpi nella ricerca.....	<i>pag.</i>	44
3.2 Presentazione del caso: contenuto del brevetto EP1537878 .....	»	46
3.3 Sufficienza di descrizione .....	»	50
3.4 Validità della priorità .....	»	51
3.5 Novità .....	»	53
3.5.1 Il documento di anteriorità WO01/14557 .....	»	53
3.5.2 Il documento di anteriorità WO02/07499 .....	»	59
3.5.3 Documento di anteriorità Dong et al. (Giugno 2002) .....	»	59
3.5.4 Conclusioni sulla novità.....	»	62
3.6 Attività inventiva.....	»	64
3.6.1 WO01/14557 come <i>closest prior art</i> .....	»	65
3.6.2 Dong et al. (Giugno 2002) come <i>closest prior art</i> .....	»	74
3.6.3 Documenti utilizzabili per contestare l'attività inventiva, nel caso in cui la priorità non fosse considerata valida .....	»	78
 <b>CONCLUSIONI</b> .....	 <i>pag.</i>	 81
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	»	83
<b>RINGRAZIAMENTI</b> .....	»	85

## **Introduzione**

L'obiettivo della mia tesi è quello di dimostrare quali possono essere le difficoltà nel trattare la brevettabilità delle invenzioni farmaceutiche biotecnologiche.

Discuterò la validità di un brevetto che protegge un'invenzione di una certa complessità, sia brevettuale che tecnica. L'invenzione è costituita da un anticorpo monoclonale per uso nella terapia antitumorale, e il brevetto in questione, EP1537878, è attualmente oggetto di numerosi procedimenti di invalidità. Ad oggi, la validità di questo brevetto è oggetto di dibattito presso diversi tribunali e corti di vari Paesi europei.

Questa tesi è frutto del lavoro svolto durante il mio tirocinio presso la SIB (Società Italiana Brevetti, sede di Roma), dove ho potuto acquisire e approfondire le nozioni fondamentali in materia di brevetti, e sono stata introdotta all'utilizzo di banche dati specifiche (Espacenet, UIMB, WIPO, USPTO).

Il caso concreto che tratterò è un brevetto europeo, quindi ho impostato il mio lavoro sulla legge europea, ovvero sui contenuti della EPC 2000 (*European Patent Convention*).

Per poter comprendere il contenuto dell'invenzione dal punto di vista scientifico, mi sono servita di un documento redatto dalla Prof.ssa Vassiliki A. Boussiotis (*Harvard Medical School*), creato per spiegare ai giudici i principi di base dell'immunologia, necessari a comprendere l'invenzione in tutti i suoi aspetti. Il suddetto documento mi è stato di supporto nel capire a fondo sia il brevetto EP'878, sia i documenti facenti parte dello stato dell'arte anteriore.

Al di là delle difficoltà tecniche, la protezione brevettuale di un'invenzione implica difficoltà di natura brevettistica quanto all'interpretazione stessa dei requisiti di brevettabilità, soprattutto nel contesto di un campo molto specifico, come può essere quello farmaceutico-biotecnologico.

Il lavoro svolto mi ha permesso di confrontarmi con le problematiche tipiche dell'esame di validità di brevetti che proteggono anticorpi monoclonali per uso terapeutico. Guidata dagli insegnamenti del Dott. Claudio Germinario e dalla sua esperienza nel campo, ho preso in esame ognuno dei requisiti di brevettabilità di EP'878, basandomi sulle regole generali fornite dalla legge e dalla giurisprudenza europee come interpretate nello specifico settore degli anticorpi.

Il Capitolo I contiene gli elementi introduttivi al significato di brevetto.

Nel Capitolo II approfondirò il significato che assumono i requisiti di brevettabilità, in particolare novità e attività inventiva, nel settore farmaceutico, e fornirò le regole generali da applicare nel caso specifico della brevettabilità di un anticorpo per uso terapeutico.

Nel capitolo III chiarirò il contesto scientifico nel quale è stata sviluppata l'invenzione attraverso un *excursus* in tema di immunologia. In seguito passerò alla descrizione del brevetto, all'analisi dei requisiti di brevettabilità (sufficienza di descrizione, novità, attività inventiva) e alla validità del diritto di priorità. Gli aspetti sopradescritti sono oggetto di numerosi procedimenti giudiziari tuttora in corso.

# CAPITOLO I

## IL BREVETTO FARMACEUTICO

### **1.1 Definizione di brevetto per invenzione**

Il brevetto per invenzione è l'istituto giuridico attraverso il quale si assicura all'inventore il diritto di utilizzazione esclusiva dell'invenzione per 20 anni dalla data di deposito della domanda di brevetto. Per diritto di utilizzazione esclusiva si intende il diritto di impedire a terzi di produrre, usare, mettere in commercio, vendere o importare l'oggetto del brevetto in questione, salvo se con il consenso del titolare<sup>1</sup>.

L'invenzione, nel linguaggio brevettuale, è intesa come la soluzione a un problema tecnico. Le invenzioni industriali consistono nella realizzazione di un nuovo prodotto, o procedimento, o uso, che fornisca una soluzione nuova e inventiva a un problema tecnico, vale a dire un insegnamento tecnico indirizzato a un esperto del campo.

L'esperto è una figura fittizia, una persona o un gruppo di persone, le cui conoscenze in un settore specifico sono fissate dallo stato della tecnica, dotata di accessibilità a ciò che riguarda l'arte anteriore, e di disponibilità dei mezzi necessari per lavorare e sperimentare in quel campo.

Il compromesso del brevetto è quello di concedere al titolare la possibilità di sfruttare l'invenzione e trarre profitto da essa in regime di monopolio finché è valida la copertura brevettuale, obbligandolo, però, a rendere accessibile al pubblico la descrizione dettagliata della sua invenzione.

Per mezzo di tale descrizione, altri inventori possono trarre ispirazione per successive ulteriori invenzioni, contribuendo al progresso scientifico.

Lo sfruttamento dell'invenzione in regime di monopolio permette il ritorno economico degli investimenti effettuati precedentemente.

Per ottenere un brevetto è necessario depositare la domanda presso un'autorità competente, secondo le modalità e procedure previste dalla legge. Nel caso del

---

<sup>1</sup> Art. 66 CPI.

brevetto europeo, la domanda viene depositata presso l'EPO (*European Patent Office, Munich - Germany*), facendo riferimento a quanto stabilito dalla EPC 2000.

I contenuti della domanda di brevetto, fino al momento in cui avviene il deposito, devono essere mantenuti segreti evitandone la predivulgazione. Dalla data di deposito essi rimangono segreti per un periodo di 18 mesi, dopodiché la domanda viene pubblicata, e gli insegnamenti da essa forniti diventano accessibili alla collettività ed entrano a far parte dello stato della tecnica.

La protezione brevettuale dura 20 anni a partire dalla data di deposito della domanda, e non è rinnovabile. Per i farmaci e i fitosanitari esiste un'eccezione alla durata ventennale, che consiste nella possibilità di ottenere un certificato complementare di protezione, del quale discuterò nel paragrafo 1.6.

Il brevetto può decadere prima dello scadere dei 20 anni per mancato pagamento delle tasse di brevetto: in tal caso la protezione brevettuale cessa di esistere a partire dall'anno successivo. Oppure, se successivamente alla concessione del brevetto dovesse risultare che esso manchi di uno o più requisiti di brevettabilità<sup>2</sup>, esso potrà essere annullato a partire dalla sua origine.

## **1.2 Oggetto del brevetto ed esclusioni dalla brevettabilità**

L'Articolo 52 (1) EPC dichiara che i brevetti europei possono essere rilasciati per qualsiasi invenzione, in tutti i campi della tecnologia, ammesso che essa sia nuova, implichi attività inventiva e sia soggetta ad applicazione industriale.

Il comma 2 dello stesso articolo specifica ciò che non è considerato come invenzione ai sensi del comma 1:

- Scoperte, teorie scientifiche, metodi matematici;
- Creazioni estetiche;
- Metodi per attività intellettuali, per gioco, commerciali e programmi per computer;

---

<sup>2</sup> Requisiti di brevettabilità: si veda paragrafo 1.3.

- Presentazioni di informazioni.

Un'invenzione può basarsi su una scoperta, o su una teoria scientifica, ma non può essere protetta da brevetto se costituita dalla scoperta in quanto tale, come stabilito dal comma 3 del suddetto articolo, perché non sarebbe contraddistinta da alcuna applicazione concreta. L'invenzione deve costituire un'entità derivata da procedimenti in cui l'intervento dell'uomo sia essenziale, e che rappresenti una soluzione riproducibile a un problema tecnico<sup>3</sup>.

Le teorie scientifiche e i metodi matematici in quanto tali sono considerati frutto dell'attività creativa dell'uomo, ma non possiedono un fine pratico immediato, e appare difficile intravederne un'applicabilità industriale e uno sfruttamento commerciale.

Una creazione estetica è costituita da un'entità che si distingue solo per la sua apparenza e la sua esteriorità, ad esempio un oggetto di arte visuale. Per essere brevettabile, l'invenzione può possedere contemporaneamente sia aspetti tecnici, sia aspetti estetici, astratti, o non tecnici. Peraltro, se un effetto estetico si ottiene attraverso una particolare struttura tecnica, si potrebbe ottenere la protezione di quest'ultima.

Per quanto riguarda i metodi per attività intellettuali e per gioco, non risolvendo essi un problema tecnico, sono esclusi dalla brevettabilità, ma possono essere tutelati attraverso l'istituto giuridico del *diritto d'autore*<sup>4</sup>. Lo stesso vale per le presentazioni di informazioni, poiché essendo caratterizzate da uno scopo puramente esplicativo, non costituiscono un'invenzione se considerate come tali.

Nell'Articolo 53 della EPC ("Eccezioni alla brevettabilità") sono elencate le tipologie di invenzioni per le quali non può essere rilasciato un brevetto europeo:

---

<sup>3</sup> C., Galli, A.M., Gambino, "*Codice commentato della proprietà industriale*", UTET-Unione Tipografico-Editrice Torines, 2011, p.552

<sup>4</sup> Diritto d'autore: Istituto giuridico per la tutela delle opere dell'ingegno di carattere creativo riguardanti le scienze, la letteratura, la musica, le arti figurative, l'architettura, il teatro, la cinematografia, la radiodiffusione, i programmi per elaboratore e le banche dati, qualunque ne sia il modo o la forma di espressione.

- a) Invenzioni il cui sfruttamento commerciale vada contro l'ordine pubblico e la moralità;

Il rispetto dell'ordine pubblico e della moralità si riferisce alla protezione della pubblica sicurezza, della persona fisica in quanto parte della società, e dell'ambiente, ed è relativo alle norme e i principi etici radicati nella cultura in questione, in questo caso la cultura europea. Anche se l'attuazione di un'invenzione fosse eticamente accettabile, questa non può essere brevettata se il suo sfruttamento commerciale non lo è, o se può essere considerato immorale.

La norma non stabilisce che il rilascio del brevetto per sé costituisca atto contrario all'ordine pubblico o al buon costume, quanto piuttosto considera l'attuazione dell'invenzione in esso rivendicata<sup>5</sup>.

- b) Varietà vegetali<sup>6</sup> o razze animali, o i procedimenti essenzialmente biologici per la produzione di piante o animali; questa clausola non si applica a procedimenti microbiologici, o i prodotti da essi ottenuti<sup>7</sup>;

Il divieto di brevettazione delle nuove varietà vegetali comprende i casi in cui l'invenzione consista esclusivamente nella modifica genetica di una varietà vegetale, anche se detta modifica è il frutto di un procedimento di ingegneria genetica.

---

<sup>5</sup> Cfr. C., Galli, A.M., Gambino, “*Codice commentato della proprietà industriale*”, UTET-Unione Tipografico-Editrice Torines, 2011, p. 619

<sup>6</sup> La Rule 26 della EPC definisce la varietà vegetale come insieme vegetale di un *taxon* botanico del grado più basso conosciuto, definito in base ai caratteri risultanti da un certo genotipo o combinazione di genotipi (incroci e selezione), che sia distinto da ogni altro insieme vegetale in base all'espressione dei caratteri e che sia idoneo ad essere riprodotto.

<sup>7</sup> La Rule 26 della EPC definisce un procedimento microbiologico come un procedimento che coinvolge, o si svolge su, materiale biologico, o porta all'ottenimento di esso. Per materiale biologico si intende ciò che contiene informazioni genetiche, e si può riprodurre, o può essere riprodotto in un sistema biologico.

Il termine “microorganismo” si riferisce a batteri e altri organismi unicellulari, di dimensione inferiori al limite visibile, che possono essere manipolati e propagati in laboratorio (virus, funghi unicellulari, lieviti, alghe, protozoi, cellule animali e vegetali).

Per ottenere la concessione di un brevetto devono essere soddisfatte due condizioni: deve esserci l'eseguibilità tecnica trasversale, ovvero la modificazione genetica deve essere applicabile a una classificazione tassonomica superiore, e l'oggetto del brevetto non deve derivare solo da procedimenti essenzialmente biologici.

I procedimenti essenzialmente biologici si basano interamente su fenomeni naturali, quali l'incrocio o la selezione. Pertanto, un metodo che implica l'inserzione di un gene attraverso procedimenti di ingegneria genetica e non è solamente basato sulla ricombinazione naturale degli interi genomi, che porta all'ottenimento di piante o animali, può essere brevettabile se è presente l'eseguibilità tecnica trasversale.

Non si applica l'esclusione nel caso in cui un brevetto riguardi una caratteristica tecnica che può essere inserita mediante tecniche di ingegneria genetica a diverse varietà vegetali o razze animali, non essendo esso specifico per una singola varietà (o razza).

I microrganismi, se nuovi, sono brevettabili, e lo è anche il procedimento per produrli.

- c) Metodi chirurgici, terapeutici o diagnostici, per il trattamento del corpo umano o animale; questa clausola non si applica ai prodotti, in particolare sostanze o composizioni, che si utilizzano in tali metodi;

I metodi chirurgici, terapeutici e diagnostici mancano del requisito dell'applicabilità industriale, perciò sono esclusi dalla brevettabilità. Inoltre, la loro esclusione dalla brevettabilità è anche dovuta al fatto che gli atti del clinico o del chirurgo di fornire una diagnosi ed indicare un'eventuale terapia, sebbene possano configurarsi a scopo di lucro, non sono considerati attività commerciale. In altre parole il personale medico deve essere libero da ogni restrizione nell'esercizio della sua attività professionale, e avere libera fruibilità dei metodi che attengono alla vita e alla salute. Lo scopo è quello di evitare che si verificano situazioni in cui medici o veterinari siano influenzati, nella scelta del tipo di trattamento per il paziente, dal fatto che esso sia coperto, o meno, da un brevetto.

Come discuterò in maniera più approfondita nel Capitolo II, paragrafo 2.2, non sono escluse dalla brevettabilità le sostanze o composizioni utilizzate in uno dei summenzionati metodi.

### **1.3 Requisiti di brevettabilità**

Esistono determinati requisiti che deve possedere un'invenzione industriale per poter ottenere la tutela brevettuale, ovvero: novità, attività inventiva, applicabilità industriale, liceità e ripetibilità (o sufficienza di descrizione).

#### **1. Novità<sup>8</sup>**

Si considera nuovo tutto ciò che non è compreso nello stato della tecnica. Lo stato della tecnica è ciò che è stato reso accessibile al pubblico nel territorio dello Stato o all'estero prima della data di deposito della domanda di brevetto<sup>9</sup>.

L'accessibilità alle informazioni può essere data da: divulgazioni orali e scritte, salvo se in regime confidenziale, o ancora pubblicazioni scientifiche, tesi di laurea, oppure disegni, se sufficienti a fornire un insegnamento all'esperto del settore. Anche il solo uso pubblico, senza descrizione, è considerato una forma di divulgazione.

Se la descrizione dell'invenzione risulta accessibile al pubblico in una qualunque maniera, essa diviene parte dello stato della tecnica, anche nel caso in cui nessuno vi abbia realmente acceduto.

La novità di un'invenzione è compromessa solo se l'invenzione è anticipata in tutti i suoi particolari rivendicati.

---

<sup>8</sup> Art 54 EPC 2000, e Art. 46 CPI.

<sup>9</sup> Art 46 comma 2 CPI.

## 2. Attività inventiva<sup>10</sup>

Un'invenzione implica attività inventiva, ovvero originalità, tali che essa non risulti ovvia a un esperto del settore, alla luce delle conoscenze definite dallo stato della tecnica.

L'invenzione non deve risultare in modo evidente dallo stato della tecnica all'esperto del ramo, e deve apportare un vero e proprio vantaggio, imprevedibile e inatteso, rispetto alla tecnica esistente.

Per verificare l'inventività dell'invenzione, sarà necessario valutare se l'oggetto del brevetto deriva in maniera evidente dall'insieme delle anteriorità costituenti lo stato dell'arte, inteso nella sua interezza, come complesso di insegnamenti e indicazioni a cui l'inventore può attingere al fine di risolvere il problema tecnico al quale il brevetto offre una risposta.

## 3. Applicabilità industriale<sup>11</sup>

Il requisito dell'applicabilità industriale consiste nel fatto che l'invenzione deve essere materialmente realizzabile, e deve consentire una produzione industriale, in qualsiasi genere di industria, compresa quella agricola.

## 4. Liceità<sup>12</sup>

Non possono essere brevettate invenzioni la cui attuazione vada contro l'ordine pubblico e la moralità.

Tale esclusione non è da intendersi come un divieto all'attuazione in sé, quanto piuttosto come all'impedimento che trovati che contravvengano ai principi fondamentali di ordine pubblico e buon costume abbiano un qualche riconoscimento legale, dato da un'autorità governativa, quale appunto il brevetto<sup>13</sup>.

---

<sup>10</sup> Art 56 EPC 2000, e Art 48 CPI.

<sup>11</sup> Art 57 EPC 2000, e Art. 49 CPI.

<sup>12</sup> Art 53 (a) EPC 2000, e Art. 50 CPI.

<sup>13</sup> C., Galli, A.M., Gambino, *“Codice commentato della proprietà industriale”*, UTET-Unione Tipografico-Editrice Torines, 2011, p.619

Lo stabilirsi se un oggetto è da considerarsi contrario alla moralità o all'ordine pubblico è indipendente dal fatto che esso sia vietato da una disposizione legislativa. D'altra parte, l'assenza di un divieto di attuazione da parte della legge, non significa necessariamente che l'attuazione dell'invenzione non vada contro la moralità o l'ordine pubblico<sup>14</sup>.

#### 5. Ripetibilità o sufficienza di descrizione

L'invenzione deve essere ripetibile, ovvero deve essere sufficientemente descritta, in maniera chiara e completa, fornendo tutti i dettagli necessari per permetterne la realizzazione senza difficoltà da parte dell'esperto del settore<sup>15</sup>.

Nella domanda di brevetto devono essere presenti tutte le componenti necessarie alla sua comprensione, quali la descrizione, le rivendicazioni ed eventuali disegni.

### **1.4 Struttura della domanda di brevetto**

Quando si intende brevettare un'invenzione è necessario depositare la domanda di brevetto presso un'autorità competente<sup>16</sup>.

La domanda di brevetto è composta da:

- Titolo
- Riassunto
- Descrizione e critica dello stato della tecnica
- Rivendicazioni
- Disegni (se necessari)

Il titolo deve corrispondere all'oggetto dell'invenzione.

---

<sup>14</sup> D., Visser, “ *The annotated European Patent Convention* ” ( seventeenth revised edition ) H. Tel, Publisher , 2010, p. 64

<sup>15</sup> Art 83 EPC 2000 e art. 51 CPI.

<sup>16</sup> Per quanto riguarda il brevetto europeo, la domanda deve essere depositata presso l' EPO (*European Patent Office*), con sede operativa a Monaco di Baviera.

Il riassunto deve spiegare sinteticamente in cosa consiste l'invenzione, in modo da consentire a terzi la comprensione sommaria dell'oggetto dell'invenzione.

La descrizione deve specificare il campo di applicazione dell'invenzione, indicare lo stato della tecnica preesistente ed esporre l'invenzione in modo che il problema tecnico e la soluzione proposta possano essere compresi. Sarà necessario indicare la cd. *closest prior art*, ovvero l'arte anteriore più vicina alla propria invenzione, che spesso è indirizzata alla risoluzione dello stesso problema tecnico.

L'invenzione può consistere nella risoluzione di un problema tecnico fino a quel momento rimasto irrisolto, oppure una maniera nuova e inventiva per risolvere un problema tecnico.

La descrizione, come già precedentemente detto, deve essere sufficientemente chiara e completa, in modo di consentire la riproduzione dell'invenzione da parte di un esperto del ramo. Essa deve contenere almeno una modalità di realizzazione dell'invenzione, utilizzando esempi esplicativi dove appropriato.

Se è necessario, può essere accompagnata da disegni, grafici, tabelle, e tutto ciò che possa essere utile ai fini della riproducibilità. A loro volta, tutti questi elementi, devono essere brevemente descritti.<sup>17</sup>

Inoltre, la descrizione deve indicare esplicitamente, laddove non risulti già ovvio dalla natura dell'invenzione, il modo in cui l'invenzione può essere utilizzata in ambito industriale.

Le rivendicazioni<sup>18</sup> devono definire l'oggetto per cui si richiede la protezione, indicandone le caratteristiche tecniche. Esse devono essere chiare, concise e basarsi sulla descrizione, senza lasciare dubbio alcuno su quale sia l'oggetto del brevetto. Esiste infatti uno stretto rapporto tra rivendicazioni e descrizione: la protezione sarà concessa solo a ciò che viene esplicitamente descritto e rivendicato.

---

<sup>17</sup> Rule 42 EPC 2000

<sup>18</sup> Rule 43 EPC 2000

Nei brevetti che riguardano in particolare i medicinali, è necessario riportare nella domanda i dati sperimentali e i risultati ottenuti che dimostrano in maniera plausibile la risoluzione del problema tecnico.

## **1.5 Il diritto di priorità**

Chiunque abbia presentato una domanda di brevetto per invenzione in uno Stato aderente alla Convenzione di Parigi per la Protezione della Proprietà Industriale, o membro della *World Trade Organization*, gode di un diritto di priorità di 12 mesi per il deposito di una domanda di brevetto per la stessa invenzione, in ciascuno o alcuni degli Stati membri<sup>19</sup>. Le condizioni fondamentali sono due: che sia lo stesso richiedente, o il suo successore avente diritto, e che sia la stessa invenzione. Il brevetto possiede, oltre al limite temporale di vent'anni, un limite territoriale per cui è valido nel territorio del Paese in cui viene rilasciato. Pertanto, al fine di ottenere la protezione in diversi Stati, sarebbe necessario effettuare una serie di depositi simultanei per ciascuno di essi, ma ciò risulterebbe impossibile dal punto di vista pratico. Il diritto di priorità permette quindi di depositare una domanda di brevetto, e di avere un anno di tempo per decidere in quali territori lo si vuole estendere.

I brevetti ereditano, come data di deposito della domanda, la data in cui è stata depositata la priorità, e non la data in cui è stato richiesto di estendere il brevetto a quello Stato<sup>20</sup>.

Nel caso in cui durante i 12 mesi dalla data di priorità, proseguendo le ricerche relative all'invenzione, si raggiungano nuovi risultati e nuove caratteristiche aggiuntive da rivendicare nella stessa invenzione, è possibile depositare un'ulteriore priorità.

Il diritto di priorità è valido solo per i contenuti descritti nella priorità depositata<sup>21</sup>.

---

<sup>19</sup> Art 87 EPC 2000

<sup>20</sup> Art. 89 EPC 2000

<sup>21</sup> Esempio: nella prima priorità, depositata in data "1", viene rivendicato l'oggetto A, e dopo 3 mesi, in data "2", si deposita una seconda priorità in cui viene rivendicato l'oggetto A in combinazione con B.

La priorità può rivelarsi importante, poiché sono frequenti i casi in cui altre domande di brevetto depositate prima della data di priorità, ma pubblicate successivamente (quindi facenti parte dello stato della tecnica secondo l'Art 54(3) EPC), oppure documenti resi accessibili al pubblico durante i 12 mesi di priorità, siano citati durante i procedimenti di esame o di opposizione di brevetti<sup>22</sup>. Infatti, l'esame dei requisiti di brevettabilità di un oggetto rivendicato richiede, in primo luogo, l'individuazione della sua data di priorità.

## **1.6 SPC: *Supplementary Protection Certificate***

### **(Certificato Complementare di Protezione)**

Il brevetto non rappresenta l'autorizzazione all'attuazione di un'invenzione, ma garantisce il suo sfruttamento commerciale e industriale.

In ambito farmaceutico, per poter effettuare la vendita di un prodotto in un territorio, bisogna ottenere un'autorizzazione amministrativa rilasciata dall'autorità competente. In Italia, l'AIFA (Agenzia Italiana del Farmaco) rilascia l'AIC (Autorizzazione all'Immissione in Commercio).

La ricerca di nuovi medicinali comporta grandi investimenti in termini di tempo e di denaro, che possono essere recuperati attraverso la vendita del prodotto ottenuto. Tuttavia, l'attesa per il rilascio dell'AIC provoca una considerevole riduzione del tempo di sfruttamento dell'invenzione, poiché i dati sperimentali

---

Dopo 12 mesi dalla prima priorità viene depositata la domanda di brevetto europeo di A+B per i diversi Stati in cui la si vuole estendere.

Se si scopre che durante i 12 mesi a partire dalla data "1" era stato pubblicato un documento che descriveva l'oggetto A, questo non pregiudica la novità dell'invenzione, perché chi ha richiesto il brevetto gode del diritto di priorità sull'invenzione A.

Se, invece, si scopre un documento che descrive A+B, pubblicato nel periodo che intercorre tra le date "1" e "2", significa che il diritto di priorità non è valido, e il documento che descrive A+B può essere considerato arte anteriore. L'ultima domanda depositata contiene A+B, ma il diritto di priorità non vale sulla combinazione di A con B, vale solo per il contenuto della prima priorità, cioè A. Il diritto di priorità di A+B vale solo a partire dalla data "2".

<sup>22</sup> F.J., Zimmer, , S.M., Zeman , J., Hammer K., Goldbach, B., Allekotte, *"Protecting and Enforcing Life Science Inventions in Europe"* (second edition), C.H. Beck oHG, 2015, p. 40

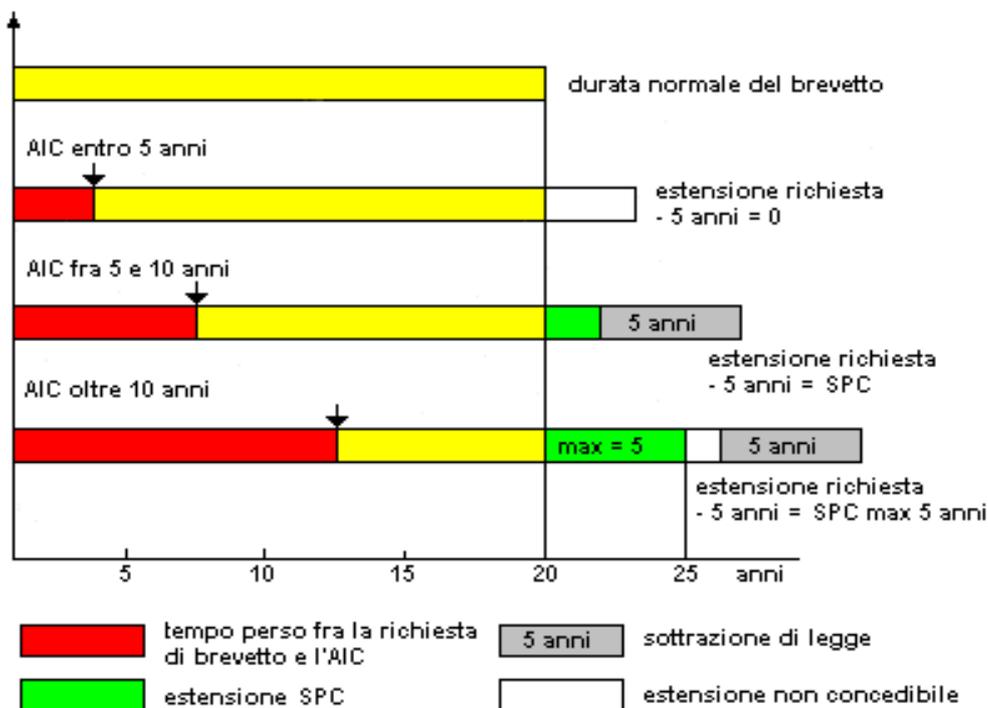
che devono essere forniti alle autorità richiedono diversi anni di sperimentazioni cliniche.

L'SPC (*Supplementary Protection Certificate*), che in Italia corrisponde al Certificato Complementare di Protezione (CCP), concede un prolungamento dei tempi di protezione per un massimo di 5 anni, oltre i 20 anni dalla data di deposito della domanda di brevetto. Esso consente il recupero, almeno parziale, della durata effettiva del brevetto.

Per calcolare l'SPC si contano gli anni che trascorrono dal deposito della domanda di brevetto e il rilascio dell'AIC, e a essi si sottrae un numero di anni pari a 5. Il valore ottenuto, che deve comunque essere minore o uguale a 5, corrisponde al numero di anni da sommare alla vita residua del brevetto.

Come appare evidente dalla seguente figura, si ha un aumento apprezzabile della durata di protezione nel caso in cui il rilascio dell'AIC abbia richiesto un'attesa maggiore di 5 anni a partire dalla data di deposito della domanda di brevetto.

**Figura 1- Schema di calcolo del *Supplementary Protection Certificate*.**



Fonte: <http://dctf.uniroma1.it/galenotech/brevetti.htm>

## CAPITOLO II

### REGOLE GENERALI PER LA PROTEZIONE BREVETTUALE DI ANTICORPI PER USO TERAPEUTICO

#### 2.1 Brevettabilità in settori specifici

Nel momento in cui è nato il mondo brevettuale, le uniche invenzioni che si intendeva proteggere erano quelle meccaniche. Successivamente, il progressivo sviluppo di settori come quello farmaceutico e biotecnologico, ma anche informatico, hanno richiesto una nuova interpretazione dei requisiti stessi di brevettabilità, e nuove regole per la protezione di invenzioni realizzate in questi campi. Dato che in ogni settore specifico si pongono circostanze tecniche tipiche, è opportuno integrare le regole generali già esistenti, con apposite norme create attraverso la via legislativa e giurisprudenziale.

L'oggetto della presente tesi è un brevetto che protegge un anticorpo monoclonale per uso nella terapia antitumorale, ovvero un'invenzione biotecnologica, che trova la sua applicazione in ambito farmaceutico.

Per trattare le invenzioni biotecnologiche, gli articoli della EPC vanno affiancati in particolar modo ai contenuti delle Rules da 26 a 29 EPC.

La Rule 26 fornisce alcune definizioni utili, come quella di materiale biologico *“materiale che contiene informazioni genetiche ed è capace di riprodursi o di essere riprodotto in un sistema biologico<sup>23</sup>”*, e di invenzioni biotecnologiche *“invenzioni che concernono un prodotto che consiste di, o contiene, materiale biologico, o un processo per mezzo del quale il materiale biologico è prodotto, processato o usato<sup>24</sup>”*.

Ai sensi della Rule 27 EPC, un'invenzione biotecnologica è brevettabile se consiste di materiale biologico isolato dal suo ambiente naturale, o diversamente prodotto mediante un procedimento tecnico. Tale invenzione è brevettabile anche se la sua struttura è identica a quella dell'elemento naturale, a condizione che,

---

<sup>23</sup> Cfr. Rule 26 (3) EPC

<sup>24</sup> Cfr. Rule 26 (2) EPC

come previsto dalla Rule 29 EPC, l'invenzione sia dotata di applicabilità industriale e che questa sia chiaramente spiegata nel brevetto.

Un anticorpo per uso terapeutico, essendo una proteina, rientra nella definizione di invenzione biotecnologica e può essere brevettabile, vista la sua applicazione come medicinale.

Per affrontare il problema della brevettabilità di un'invenzione nel campo dei farmaci, ritengo opportuno chiarire il significato che assumono in ambito farmaceutico i requisiti della novità e dell'inventività. Dopodiché, spiegherò come le regole generali per la brevettabilità possono essere applicate a un caso più specifico, che è quello di un anticorpo per uso terapeutico.

## **2.2 Il concetto di novità applicato ai medicinali**

Normalmente non è possibile brevettare una sostanza compresa nello stato della tecnica, poiché essendo conosciuta mancherebbe del requisito della novità. Tuttavia, una sostanza medicinale si caratterizza per il fatto che possiede un'azione farmacologica, e di conseguenza non la si può trattare come una qualsiasi sostanza.

I metodi terapeutici sono esclusi dalla brevettabilità<sup>25</sup>, ma, come specificato nell'articolo 54 (4) della EPC 2000, non lo sono le sostanze o composizioni utilizzate nei summenzionati metodi, ammesso che il loro uso per tali scopi non sia già compreso nello stato della tecnica.

Se una sostanza era già nota in precedenza, ma non ne era noto l'uso terapeutico, sarà possibile brevettare la stessa sostanza finalizzata all'uso terapeutico. Infatti, in questo caso, la novità non risiede nella sostanza in sé, ma nella sua applicazione in un metodo medico.

Il comma 5 dello stesso articolo stabilisce che, se nello stato della tecnica è stata descritta una sostanza per uso terapeutico, essa può essere brevettata in una nuova, specifica applicazione medica, purché quest'ultima non sia presente nello stato della tecnica. Si tratta quindi di una seconda applicazione terapeutica della sostanza già nota: "Sostanza X per uso nel trattamento della patologia Y".

---

<sup>25</sup> Art 53 (c) EPC 2000.

Per “seconda applicazione terapeutica” si intende:

- Una nuova patologia (Esempio: Aspirina come antinfiammatorio. Secondo uso terapeutico: Aspirina nella terapia antiaggregante.)<sup>26</sup>
- Una nuova tipologia di pazienti (Esempio: vaccinazione per la malattia di Aujeszky ai maialini sieronegativi. Nuova tipologia di paziente: maialini sieropositivi.)<sup>27</sup>
- Una nuova via di somministrazione (Esempio: HCG via intramuscolo. Nuova via di somministrazione: HCG via sottocutanea.)<sup>28</sup>
- Un nuovo regime di dosaggio (Esempio: Alendronato 10 mg al giorno. Nuovo dosaggio: Alendronato 70 mg alla settimana.)<sup>29</sup>

La brevettabilità della I e II applicazione “medica<sup>30</sup>” non si basa sulla sostanza in quanto tale, ma sulla novità ed inventività della sua applicazione terapeutica.<sup>31</sup>

La possibilità di proteggere la seconda applicazione terapeutica di un medicamento è stata ufficializzata con la revisione della EPC. Nel testo precedente (EPC 1973) non era consentito brevettare per un nuovo uso una

---

<sup>26</sup> L'acido acetilsalicilico utilizzato a basso dosaggio, è risultato efficace nella terapia antiaggregante a causa dell'inibizione della ciclossigenasi-I piastrinica, che provoca l'inibizione della produzione di trombossano, il quale favorisce l'aggregazione piastrinica.

<sup>27</sup> La malattia di Aujeszky è una malattia virale del suino, nota anche come “pseudorabbia”. I maialini appena nati sono detti sieropositivi perché possiedono ancora l'immunità conferitagli passivamente dalla madre, ma dopo un certo periodo di tempo perdono questa immunità e diventano sieronegativi. La somministrazione di un vaccino contenente il virus attenuato ai maialini sieropositivi, ha portato risultati vantaggiosi rispetto alla vaccinazione dei maialini sieronegativi.

<sup>28</sup> La somministrazione dell'ormone HCG sottocute, anziché intramuscolo, è vantaggiosa perché si ha un miglioramento della *compliance*, una diminuzione delle reazioni avverse (es. eritema cutaneo, reazioni allergiche), e un migliore mantenimento dei livelli serici di HCG.

<sup>29</sup> La somministrazione settimanale di 70 mg di alendronato, invece che 10 mg giornalieri, riduce gli effetti collaterali gastrointestinali, in particolare a livello dell'esofago, e favorisce la *compliance* del paziente.

<sup>30</sup> Per applicazione medica si intende sia l'impiego terapeutico di una sostanza attiva, che quello diagnostico *in vivo*, o anche profilattico.

<sup>31</sup> Ribadisco che l'oggetto del brevetto non è l'applicazione terapeutica della sostanza, bensì la sostanza stessa, che acquisisce carattere nuovo a causa della nuova applicazione in campo medico.

sostanza nota, fino al momento in cui la Enlarged Board of Appeal consentì l'uso della *Swiss-type claim*<sup>32</sup>. Infatti una rivendicazione nella forma: “Uso di una sostanza X per trattare una malattia Y” sarebbe interpretata come diretta ad un trattamento terapeutico e quindi esclusa dalla brevettabilità<sup>33</sup>.

La *Swiss-type claim* è invece strutturata nella seguente maniera: “Uso della sostanza (o composizione) X per la fabbricazione di un medicamento per il trattamento della patologia Y”.

Specificando che la sostanza attiva serve per la preparazione di un medicamento, si supera l'ostacolo rappresentato dal divieto di rivendicare metodi di trattamento terapeutico del corpo umano (o animale).

Ad oggi, una *Swiss-type claim* può essere accettata dall'EPO<sup>34</sup> solo se la data di deposito della domanda di brevetto è anteriore al 29 gennaio 2011<sup>35</sup>. Da questa data in poi, una rivendicazione di questo tipo viene considerata formalmente inammissibile, anche se in alcuni Paesi quali la Cina, la Corea, il Canada, resta applicabile.

La nuova formulazione accettata dalla convenzione è quella stabilita dall'Art. 54 (5) EPC, vale a dire “*purpose-limited product claim*”, cioè: “Sostanza X per specifico uso nel trattamento della patologia Y”, ammesso che tale uso implichi attività inventiva.

La legge italiana in materia di brevetti<sup>36</sup>, pur ricalcando il contenuto della EPC, presenta alcune differenze.

L' Art. 54 (5) della EPC, già citato in precedenza, è quello che regola il secondo uso terapeutico, e afferma che una sostanza compresa nello stato della tecnica può essere brevettata per il suo uso in uno dei metodi descritti nell'articolo 53(c)<sup>37</sup>, ossia un metodo medico.

---

<sup>32</sup> Decisioni G1/83, G5/83, G 6/83 EPO.

<sup>33</sup> “L'uso per trattamento terapeutico” è interpretato come “metodo terapeutico”, di conseguenza rientrerebbe tra le eccezioni alla brevettabilità, ai sensi dell' art. 53 (c) EPC.

<sup>34</sup> European Patent Office.

<sup>35</sup> Cfr. The European Patent Office “*Guidelines for Examination in the European Patent Office*” (edition June 2012).

<sup>36</sup> Codice della Proprietà Industriale

<sup>37</sup> Metodi terapeutici, diagnostici, chirurgici.

Nel CPI, l'articolo che tratta la novità è il 46, nel quale il comma 3 stabilisce che una sostanza compresa nello stato della tecnica può essere brevettata per una nuova utilizzazione, senza specificare che la nuova utilizzazione deve riguardare un metodo medico. Questo significa che la legge italiana teoricamente non pone gli stessi limiti della legge europea e prevede che la brevettabilità di una sostanza per una nuova finalità sia possibile per qualsiasi tipologia di sostanza, anche se nota.

### **2.3 Il requisito dell'attività inventiva in ambito farmaceutico**

Per valutare la presenza di attività inventiva si ricorre al *problem-solution approach*:

- 1) Si determina la *closest prior art*;
- 2) Si stabilisce qual è il problema tecnico come differenza tra l'insegnamento dato dalla *closest prior art* e l'invenzione;
- 3) Si identifica la soluzione proposta, che è l'invenzione come rivendicata;
- 4) Si verifica se effettivamente il problema è stato risolto, mediante i dati sperimentali dimostrativi;
- 5) Si valuta se quella soluzione a quel problema poteva essere ovvia all'esperto.

Il quarto passaggio è quello che caratterizza le invenzioni farmaceutiche: non basta semplicemente affermare che una sostanza svolge una determinata azione nel trattamento di una particolare patologia, ma è necessario dimostrare plausibilmente che l'effetto dichiarato è stato realmente conseguito, di norma con risultati sperimentali.

Un importante principio da applicare per verificare l'originalità è il *could-would approach*, che consiste nel differenziare tra ciò che l'esperto avrebbe potuto fare (*could*), e ciò che effettivamente avrebbe fatto (*would*) per risolvere il problema. In altre parole, se si dimostra che l'esperto non aveva una valida motivazione per

risolvere il problema tecnico come proposto dalla domanda di brevetto, allora si può dire che l'invenzione è dotata di attività inventiva.

L'attività inventiva è qualcosa che va oltre la mera applicazione degli insegnamenti dello stato della tecnica da parte di un esperto.

L'esame dell'attività inventiva consiste non solo nel verificare se lo stato della tecnica aveva fornito un suggerimento per risolvere il problema in un certo modo, rendendo tale soluzione ovvia all'esperto, ma anche nello stabilire se l'esperto avrebbe seguito tale insegnamento con una ragionevole aspettativa di successo.

La "*reasonable expectation of success*" è un aspetto che si applica nei casi in cui l'arte anteriore suggerisce in maniera teorica una via da intraprendere per risolvere un problema tecnico.

Nel caso in cui l'esperto segua il suggerimento fornito dall'arte anteriore e il risultato è positivo, l'invenzione potrebbe comunque essere considerata inventiva, in assenza di una ragionevole aspettativa di successo. Tanto più inesplorato è un ambito di ricerca tanto più difficile diventa prevedere la sua conclusione e, di conseguenza, minore sarà l'aspettativa di successo<sup>38</sup>.

Al contrario, più un campo è stato studiato e sperimentato, e più se ne conoscono i procedimenti e le tecnologie, maggiori saranno le probabilità di ottenere un risultato positivo. In altre parole, meno ambizioso è il traguardo da raggiungere e più è alta l'aspettativa di successo, tanto più facilmente l'invenzione sarà considerata ovvia<sup>39</sup>.

Se l'esperto realizza un'invenzione nuova, ma lo fa semplicemente seguendo gli insegnamenti della tecnica, con la disponibilità di tutti i mezzi e le conoscenze necessari per realizzarla, allora la probabilità di fallire può essere scarsa, e quindi l'invenzione non si considera inventiva.

---

<sup>38</sup> *Case Law of the Board of Appeals of the European Patent Office, Patentability, Inventive step, Reasonable Expectation of success.*

<sup>39</sup> Cfr. F.J., Zimmer, S.M., Zeman, J., Hammer, K., Goldbach B., Allekotte, "*Protecting and Enforcing Life Science Inventions in Europe*" (second edition), C.H. Beck oHG, 2015, p. 195

## 2.4 Brevettabilità degli anticorpi

### Importanza delle caratterizzazioni funzionali

Gli anticorpi costituiscono una classe di composti che presenta caratteristiche particolari, delle quali bisogna tenere conto, se si intende brevettarli.

Essi sono proteine, quindi rientrano nella definizione di invenzioni biotecnologiche<sup>40</sup>. Ciò che li contraddistingue è la loro capacità di legarsi a un antigene, cioè la loro caratterizzazione funzionale, e il risultato di questo legame può portare a un'azione farmacologica, infatti essi trovano impiego in ambito terapeutico.

Per trattare la brevettabilità di un anticorpo per uso medicinale bisogna fare riferimento a una serie di regole generali, che sono il risultato dell'intersezione tra quanto è stato già commentato in questo capitolo quanto alla brevettazione nel settore farmaceutico, e considerazioni addizionali specificatamente riguardanti gli anticorpi.

Sottolineo che un anticorpo è normalmente definito con caratterizzazione funzionale: “anticorpo capace di riconoscere un certo antigene”.

Un importante fattore che influenza il tipo di rivendicazione per un anticorpo è basato sul fatto che il *target* dell'anticorpo sia o meno, descritto nell'arte anteriore.

Di seguito sono riportati alcuni casi possibili, riassunti nella Tabella 1, utili a comprendere quali sono le problematiche che possono insorgere quando si ha a che fare con la brevettabilità di un anticorpo.

#### Caso 1:

Si viene a conoscenza di un antigene (Ag) nuovo, la cui immunogenicità<sup>41</sup> non è scontata. Prenderò come esempio il recettore PD-1<sup>42</sup>.

---

<sup>40</sup> Rule 26(2) EPC 2000.

<sup>41</sup> Immunogenicità: capacità di un antigene di scatenare una risposta immunitaria umorale e/o cellulo-mediata.

<sup>42</sup> Nel capitolo III verrà discusso il brevetto EP1537878, che ha come oggetto un anticorpo che si lega al recettore PD-1 in modo da inibire la sua attivazione. Il recettore PD-1 è espresso sulla superficie dei linfociti T e appartiene alla famiglia dei co-recettori CD28. La sua attivazione provoca la trasmissione di un segnale che inibisce la proliferazione dei linfociti T, perciò il risultato è un'inibizione

Un anticorpo (Ab) specifico per l'AgPD-1 sarà, per forza di cose, nuovo e inventivo. Antigene e anticorpo sono descritti per la prima volta, ed è possibile brevettare l'anticorpo rivendicandolo nella sua forma più generica, senza doverlo caratterizzare ulteriormente. La rivendicazione sarà del tipo: "Anticorpo che riconosce l'antigene PD-1", e tale definizione abbraccia ogni possibile forma dell'anticorpo (policlonale, monoclonale, umanizzato, umano, i relativi frammenti, ecc.)<sup>43</sup>.

### **Caso 2:**

L'AgPD-1 è noto e la sua immunogenicità è prevedibile.

L'Ab generico che riconosce PD-1 può essere nuovo, in quanto descritto per la prima volta, ma difficilmente sarà inventivo, dato che, una volta che si è a conoscenza dell'antigene, si hanno a disposizione diverse tecniche per costituire un Ab che lo riconosca.

Al contrario, sarà considerato inventivo se dotato di una certa specificità, per esempio quando l'anticorpo riconosce un particolare epitopo<sup>44</sup> dell'antigene. Oppure quando l'anticorpo ha una funzione nuova ed imprevista, per esempio quella di "anticorpo bloccante", ossia anticorpo che legandosi al recettore ne blocca l'attivazione e la trasmissione del segnale, o quella di "anticorpo stimolante", che legandosi al recettore lo attiva e innesca la trasmissione del segnale.

### **Caso3:**

L'AgPD-1 è noto, e lo è l'Ab generico anti-PD-1.

Un anticorpo specifico, in questo caso, sarebbe una selezione dal concetto generale di "Ab anti-PD-1". Un'invenzione di selezione consiste nel prelevare un intervallo di elementi, o *sub-range*, che si trova all'interno di un *range* più ampio,

---

dell'attivazione linfocitaria. Il legame con un anticorpo che inibisce l'attivazione del recettore, al contrario, porterà a un potenziamento della risposta immune.

<sup>43</sup> I concetti di immunologia (antigene, anticorpo, ecc) sono spiegati nel paragrafo 3.1.

<sup>44</sup> Epitopo: regione di superficie di una proteina che viene riconosciuta da un anticorpo. Diversi anticorpi possono legarsi a diversi epitopi, i quali possono essere espressi sulla superficie di una stessa proteina estranea.

e che non era stato menzionato esplicitamente nella descrizione generale del *range* più ampio<sup>45</sup>.

Un Ab specifico può risultare nuovo e inventivo se dotato di una funzione nuova e non prevedibile.

Occorre quindi che lo si caratterizzi, ovvero lo si descriva cogliendo la sua specificità, per esempio definendolo come un anticorpo bloccante, oppure come un anticorpo capace di neutralizzare un patogeno. Infatti, una definizione generica “anticorpo anti-PD-1” non anticipa la definizione specifica “anticorpo anti-PD-1 che blocca il segnale di PD-1”, poiché tale specificità non era esplicitata nella definizione generica.

La caratterizzazione potrà essere di tipo funzionale, perciò si rivendica una caratteristica funzione dell’anticorpo, oppure di tipo strutturale se per esempio si rivendica una determinata sequenza amminoacidica delle regioni CDR<sup>46</sup>.

#### **Caso 4:**

L’AgPD-1 è noto, e l’Ab generico è noto per esempio come agente diagnostico *in vitro*.

Un anticorpo specifico per uso terapeutico, invece, può essere nuovo e inventivo, ai sensi dell’art. 54 EPC, nella forma: “Anticorpo anti-PD-1 per uso nel trattamento di infezioni virali”.

In questo caso l’anticorpo era noto per una utilizzazione diversa da quella terapeutica, quindi può essere brevettabile rivendicandolo per l’uso come medicamento, in base a quanto è stato commentato nel paragrafo 2.2.

#### **Caso 5:**

L’AgPD-1 è noto, e lo è l’Ab generico o l’anticorpo policlonale.

Un anticorpo monoclonale<sup>47</sup> diretto ad uno specifico epitopo dell’AgPD-1 è nuovo e, se dotato di una funzione inattesa, inventivo. Anche in questo caso, come nel caso 3, si tratta di una selezione da concetto generale “Ab anti-PD-1”.

---

<sup>45</sup> Cfr. The European Patent Office “*Guidelines for Examination in the European Patent Office*” (edition June 2012), part G, chapter VI, 8.

<sup>46</sup> Regioni CDR: si veda Capitolo III, paragrafo 3.1.3.

<sup>47</sup> Anticorpo monoclonale: si veda capitolo III, paragrafo 3.1.5.

Il concetto generale era noto, ma ciò che è stato selezionato da questo concetto non lo era.

**Caso 6:**

L'AgPD-1 è noto, e un Ab monoclonale anti-PD-1 è noto.

Un altro anticorpo monoclonale anti-PD-1, legante un altro epitopo, è nuovo e inventivo se ha una nuova funzione. Per esempio si conosce un anticorpo che blocca il recettore PD-1 inibendo la trasmissione del suo segnale, ma se si crea un anticorpo monoclonale che lega il recettore PD-1 mimando il ligando naturale, quindi stimolando la trasmissione del segnale, questo sarà nuovo e inventivo.

**Caso 7:**

L'AgPD-1 è noto, e un Ab monoclonale anti-PD-1 è noto.

Un anticorpo monoclonale anti-PD-1 ottenuto per tecnologia di manipolazione genetica, caratterizzato dalla specifica sequenza CDR 1, 2, 3 (*heavy*), e 1, 2, 3 (*light*)<sup>48</sup>, è nuovo e inventivo, se svolge una nuova funzione.

**Caso 8:**

AgPD-1 e Ab anti-PD-1 sono noti.

I frammenti dell'anticorpo<sup>49</sup> (Fab, scFv, ecc.) sono nuovi ed inventivi, se dotati di una nuova funzione rispetto all'anticorpo anti-PD-1 noto.

---

<sup>48</sup> *Heavy chains, light chains*: si veda capitolo III, paragrafo 3.1.3

<sup>49</sup> Frammenti anticorpali: si veda capitolo III, paragrafo 3.1.4.

**Tabella 1- Schema riassuntivo dei casi presi in esempio per definire le regole di brevettabilità di un anticorpo.**

	ANTIGENE (Recettore PD-1)	ANTICORPO ANTI- PD1	L'ANTICORPO È BREVETTABILE?
Caso 1.	Nuovo	Nuovo e inventivo.	Sì, nella sua forma generica.
Caso 2.	Noto	Nuovo, inventivo?	Sì, se dotato di una determinata specificità (specificità di legame, funzione imprevista, ecc).
Caso 3.	Noto	Noto in forma generica.	Sì, se specifico e dotato di una funzione nuova e non prevedibile (caratterizzazione funzionale o strutturale).
Caso 4.	Noto	Noto per uso in tecniche analitiche.	Sì, se per la prima (o seconda, terza, ecc...) applicazione terapeutica.
Caso 5.	Noto	Noto in forma generica o policlonale.	Sì, se in forma monoclonale con una determinata specificità, che gli conferisce una funzione nuova e inattesa.
Caso 6.	Noto	Noto in forma monoclonale.	Sì, se monoclonale con diversa specificità.
Caso 7.	Noto	Noto in forma monoclonale.	Sì, per esempio attraverso una caratterizzazione strutturale, se dotato di una funzione nuova e inventiva.
Caso 8.	Noto	Noto	No, ma lo sono i frammenti anticorpali, se dotati di una funzione nuova e inventiva.

Fonte: Dott. Claudio Germinario

La rivendicazione di un anticorpo specifico obbliga, in primo luogo, a spiegare come selezionarlo, come produrlo, e in secondo luogo a dimostrare che funzioni e che effettivamente possieda la specificità rivendicata.

Trattandosi molto spesso di un'invenzione di selezione, bisogna indicare come realizzarla e come riprodurre le caratteristiche specifiche che la distinguono dall'anticorpo generico.

Un esempio di anticorpo a cui è stata attribuita specificità rispetto a un anticorpo generico, è un anticorpo monoclonale. Esso riconosce un unico epitopo sulla superficie dell'antigene, e di conseguenza è nettamente distinguibile da un anticorpo policlonale generico, e la sua azione è specifica e riproducibile.

Non si può proteggere un anticorpo per il solo fatto che è monoclonale, infatti, dal momento che si conoscono le tecniche per ottenere questo tipo di anticorpi, l'invenzione sarebbe priva di originalità. Ciononostante, un anticorpo

monoclonale, anziché policlonale, può essere brevettato se utile per ottenere una risposta riproducibile e prevedibile nei pazienti.

Per brevettare un'invenzione che ha come oggetto un anticorpo monoclonale specifico, che svolge una funzione nuova, è necessario spiegare come ottenerlo e selezionarlo. A tale scopo è possibile depositare l'ibridoma<sup>50</sup> che lo produce presso un istituto riconosciuto per il deposito di microrganismi e cellule, come previsto dal Trattato di Budapest<sup>51</sup>, in modo che sia disponibile al pubblico.

Il deposito di materiale microbiologico è necessario quando un'invenzione riguarda un procedimento microbiologico o un prodotto di tale procedimento, e implica l'utilizzazione di un microrganismo non accessibile al pubblico e che non può essere descritto in maniera tale da permettere a ogni persona esperta del ramo di attuare l'invenzione, come previsto dall'art. 83 EPC. In tali circostanze la descrizione deve essere effettuata, anziché per iscritto, mediante il deposito del materiale microbiologico<sup>52</sup>.

Nella rivendicazione, l'oggetto per cui si richiede la protezione sarà un preciso anticorpo monoclonale, prodotto da un ibridoma.

Un anticorpo noto può essere protetto se si dimostra che svolge un'azione terapeutica utile, e se si spiega come produrlo (si deposita l'ibridoma e si rivendica l'anticorpo prodotto dall'ibridoma, identificato con un numero di deposito).

Il requisito della novità è soddisfatto perché esso costituisce un'invenzione di selezione, rispetto all'anticorpo generico che era già conosciuto.

Un anticorpo umano<sup>53</sup> è un altro esempio di anticorpo a cui è stata attribuita specificità, perché il fatto che sia umano, lo rende distinguibile da un anticorpo di

---

<sup>50</sup> Ibridoma: si veda Capitolo III, paragrafo 3.1.5.

<sup>51</sup> Il Trattato di Budapest del 28 aprile 1977 nasce dall'esigenza di istituire un sistema di deposito di materiale biologico riconosciuto a livello internazionale, per consentire a un soggetto che voglia depositare in più Paesi una domanda di brevetto per un'invenzione implicante materiale biologico, di provvedere al suo deposito in un solo centro di raccolta riconosciuto dagli altri Paesi. (Cfr. A., Vanzetti, *"Codice della proprietà Industriale"* Giuffrè Editore, Capo IV, art. 162, 2013).

<sup>52</sup> Si veda Rule 31 EPC 2000.

<sup>53</sup> Anticorpo umano: si veda capitolo III, paragrafo 3.1.6.

diversa natura, come lo può essere un anticorpo umanizzato, o un anticorpo murino.

Anche in questo caso, non si rivendica l'anticorpo umano in quanto umano, bensì "l'anticorpo che riconosce l'antigene X, che svolge tale azione terapeutica, e che è umano".

Prendendo come esempio le rivendicazioni del brevetto EP1537878<sup>54</sup>, si ha un anticorpo anti-PD-1 che svolge una certa azione, e che è umano o umanizzato. Il fatto che sia umano lo distingue da un generico anticorpo anti-PD-1.

---

<sup>54</sup> Le rivendicazioni di EP1537878 sono riportate nel Capitolo III, paragrafo 3.2.



# **CAPITOLO III**

## **CASO DEL BREVETTO EP1537878: USO DI UN ANTICORPO MONOCLONALE UMANIZZATO NEL TRATTAMENTO DEL MELANOMA**

### **3.1 Immunologia**

Per poter comprendere a fondo il caso del brevetto EP1537878, che presenterò successivamente nel presente capitolo, è stato necessario approfondire il contesto scientifico su cui si basa l'invenzione, in materia immunologica. A tale scopo, mi sono servita in particolar modo di un documento che spiega i principi e gli aspetti fondamentali dell'immunologia, che rappresentano il *background* tecnico dell'invenzione. Esso è stato redatto dalla Prof.ssa Vassiliki A. Boussiotis, appositamente per la comprensione di tutti gli aspetti tecnici dell'invenzione di EP'878 da parte dei giudici.

Nei seguenti paragrafi riporterò alcuni concetti utili ad affrontare il caso concreto di un anticorpo monoclonale umanizzato per uso terapeutico.

#### **3.1.1 Sistema immunitario innato e acquisito**

Il sistema immunitario è costituito da organi, tessuti e cellule circolanti, e la sua funzione consiste principalmente nel contribuire a difendere l'organismo dagli insulti provenienti dall'ambiente (infezioni, traumi, insulti chimici, ecc.).

È possibile distinguere due tipi di difesa: l'immunità innata (o aspecifica) e l'immunità adattativa (o specifica, o acquisita).

L'immunità innata costituisce la prima linea di difesa contro le sostanze e agenti estranei. Le cellule del sistema immunitario riconoscono e rispondono a un numero limitato di molecole espresse da molti microrganismi o cellule tissutali danneggiate, in modo da tenere sotto controllo l'infezione, almeno temporaneamente, o risolvere il danno tissutale. La risposta immunitaria innata si

innesca rapidamente ed è sempre attiva, ma non genera nessun tipo di memoria, pertanto costituisce una difesa aspecifica.

I principali componenti del sistema immunitario innato sono: le barriere epiteliali (pelle, mucose), le barriere fisiologiche<sup>55</sup>, le proteine del complemento<sup>56</sup>, e le cellule dell'immunità innata. Tra queste ultime si hanno i fagociti (macrofagi, neutrofili, cellule dendritiche), altre cellule infiammatorie (mastociti, granulociti eosinofili) e le cellule linfoide innate (linfociti Natural Killer, ILC-1, -2, -3).

L'immunità adattativa, invece, interviene quando è richiesta una difesa a lungo termine. Per attivarsi necessita di più tempo, ma risponde a una varietà di molecole molto più ampia, grazie alla presenza di recettori specifici. Inoltre, è in grado di generare una memoria immunitaria, cosicché, nelle successive esposizioni allo stesso patogeno, si possa sviluppare rapidamente una risposta specifica e più potente.

Il sistema immunitario adattativo ha la capacità di generare “cellule effettrici” e “cellule della memoria”. Le cellule effettrici sono dirette contro patogeni specifici, hanno una vita relativamente breve, e il loro compito è quello di produrre citochine e attivare la risposta immunitaria cellulo-mediata e umorale, descritte in seguito.

Le cellule della memoria, invece, rimangono in circolo al termine dell'infezione per prevenire o limitare l'eventuale re-infezione da parte dello stesso patogeno. La memoria immunitaria può permanere per diversi anni nell'organismo.

I protagonisti della risposta immunitaria adattativa, ossia le cellule effettrici, sono i linfociti, i quali circolano nella linfa e nel sangue. Essi sono suddivisi in linfociti B e linfociti T. Questi ultimi sono ulteriormente divisibili nei seguenti sottogruppi: linfociti T-helper, linfociti T-citotossici e linfociti T-regolatori. Le principali funzioni svolte dai linfociti saranno discusse nel paragrafo successivo.

---

<sup>55</sup> La flora intestinale è un esempio di barriera fisiologica del tubo digerente, poiché è costituita da microrganismi che competono con i batteri patogeni e quindi svolgono una funzione difensiva per l'organismo.

<sup>56</sup> Proteine del complemento: sono proteine plasmatiche che riconoscono molecole microbiche e sono coinvolte nella distruzione dei patogeni.

È possibile distinguere due tipi di immunità specifica:

-la risposta immunitaria umorale è l'immunità adattativa mediata dai linfociti B, e consiste nella produzione di anticorpi e tutti i processi che la accompagnano;

-la risposta immunitaria cellulo-mediata è l'immunità adattativa mediata dai linfociti T, che svolgono un'azione citotossica, distruttiva nei confronti del patogeno, e di produzione di mediatori della risposta immunitaria<sup>57</sup>.

### **3.1.2 Cellule immunitarie**

#### **3.1.2.1 Fagociti**

Uno dei principali meccanismi attraverso cui agisce la risposta immunitaria è la fagocitosi. Essa vede coinvolti i fagociti come i macrofagi, i neutrofilo, i monociti e le cellule dendritiche.

Il patogeno viene inglobato dalla cellula fagocitaria attraverso il fagosoma, il quale si fonde con il lisosoma per formare il fagolisosoma e all'interno di quest'ultimo, il patogeno viene distrutto per azione degli enzimi proteolitici lisosomiali.

I patogeni sono resi più facilmente riconoscibili dai fagociti se sono stati "opsonizzati"<sup>58</sup>, vale a dire ricoperti sulla loro superficie con proteine del complemento o anticorpi.

#### **3.1.2.2 Cellule che presentano l'antigene<sup>59</sup> (APC)**

Le cellule che presentano l'antigene sono cellule facenti parte del sistema immunitario innato e svolgono l'azione di presentare gli antigeni alle cellule del

---

<sup>57</sup> Le citochine, come esempio di mediatori della risposta immunitaria, sono molecole solubili che inducono proliferazione e differenziazione delle cellule immunitarie e promuovono la risposta infiammatoria.

<sup>58</sup> "Opsonizzazione": si veda paragrafo 3.1.3.2, "Funzioni principali svolte dagli anticorpi".

<sup>59</sup> Antigene: sostanza, spesso di origine proteica, in grado di essere riconosciuta dal sistema immunitario adattativo.

sistema immunitario adattativo. Le APC più attive sono le cellule dendritiche, ma hanno lo stesso ruolo anche i monociti e i macrofagi.

La presentazione dell'antigene si realizza nel seguente modo: l'APC assorbe al suo interno l'antigene attraverso la fagocitosi o pinocitosi, dopodiché l'antigene viene degradato, e i frammenti risultanti vengono esposti sulla superficie dell'APC. In questo modo, l'antigene viene presentato ai linfociti T nel contesto del complesso maggiore di istocompatibilità<sup>60</sup>, per permettere la successiva attivazione linfocitaria.

### 3.1.2.3 Linfociti T

Sulla superficie dei linfociti T è presente un recettore, detto "TCR", che riconosce l'antigene presentato dalle APC come descritto nel paragrafo precedente. Sulla superficie di una cellula T sono presenti diversi TCR, e ognuno di essi è specifico per un antigene. Pertanto, si hanno milioni di cellule T con diversi TCR e diverse specificità antigeniche.

I linfociti T che non hanno ancora avuto contatto con un antigene sono detti "naïve". Il contatto con un antigene innesca l'attivazione dei linfociti T, i quali maturano e proliferano, dando così origine a cellule effettrici e cellule della memoria.

Per compiere il processo di attivazione dei linfociti T, oltre alla presentazione dell'antigene, è necessario un segnale co-stimolatorio, al quale partecipano alcuni co-recettori:

- CD3: associato al recettore TCR;
- CD4: sui linfociti T-helper;
- CD8: nei linfociti T citotossici;

---

<sup>60</sup> Complesso maggiore di istocompatibilità (MHC): due classi di proteine fondamentali per il riconoscimento degli antigeni. MHC di classe I: è presente su tutte le cellule nucleate, presenta l'antigene ai linfociti T citotossici (CD8+). MHC di classe II: è presente sulle APC e sui linfociti B, presenta l'antigene ai linfociti T-helper (CD4+). Ogni individuo esprime sulle proprie cellule un profilo MHC unico, motivo per cui il tessuto di un organo trapiantato viene riconosciuto come estraneo e rigettato (mancanza di istocompatibilità).

Le cellule della memoria necessitano di una co-stimolazione minore, o non la richiedono affatto, per essere attivate.

I linfociti T attivati si differenziano in linfociti T-helper, T-citotossici e T-regolatori.

I linfociti T-helper hanno il compito di produrre mediatori e attivare i macrofagi, oltre a quello di cooperare nell'attivazione delle cellule effettrici della risposta immune, vale a dire i linfociti B e i linfociti T-citotossici.

I linfociti T-citotossici hanno la capacità di uccidere direttamente le cellule infettate da un patogeno intracellulare, ad esempio un virus, e in alcuni casi sono in grado di distruggere le cellule tumorali.

I linfociti T-regolatori intervengono per tenere sotto controllo i processi immunitari e limitare le risposte abnormi che possono portare allo sviluppo di autoimmunità<sup>61</sup>.

#### **3.1.2.4 Linfociti B**

I linfociti B esprimono sulla loro superficie anticorpi che fungono da recettori (BCR), attraverso i quali i linfociti legano l'antigene e lo internalizzano. Ogni linfocita B esprime uno specifico anticorpo, e una popolazione di linfociti B esprime milioni di diversi anticorpi.

L'anticorpo lega specificamente un antigene, il quale viene internalizzato, processato ed esposto sulla superficie dei linfociti B per presentarlo ai linfociti T-helper attivati. Ciò permette l'attivazione del linfocita B, che ha luogo mediante il

---

<sup>61</sup> Malattie autoimmuni: la reazione immunitaria si scatena contro i componenti del proprio organismo, che prendono il nome di autoantigeni, a causa della perdita della tolleranza immunologica. La tolleranza immunologica è la mancata responsività dei linfociti nei confronti degli antigeni riconosciuti come "self". Essa è costituita dalla tolleranza centrale e periferica. La tolleranza centrale è quella che si origina durante la maturazione dei linfociti. Alcuni linfociti T possono sfuggire alla tolleranza centrale, ma esistono i meccanismi di tolleranza periferica per neutralizzarli:

- soppressione mediata dai linfociti T regolatori;
- anergia: i cloni potenzialmente autoreattivi sopravvivono, ma sono resi incapaci di reagire nei confronti degli autoantigeni;
- apoptosi attivazione-dipendente: i linfociti maturi in seguito al riconoscimento dell'autoantigene vengono indotti ad apoptosi.

Quando si ha la rottura dei meccanismi di tolleranza, i cloni autoreattivi prendono il sopravvento e si sviluppa la malattia autoimmune.

contatto tra il linfocita B che espone l'antigene con cui è venuto a contatto, e il linfocita T-helper che è stato attivato da quello stesso antigene.

Dopo l'attivazione, i linfociti B proliferano e si differenziano in plasmacellule e cellule della memoria.

Le plasmacellule producono anticorpi specifici per l'antigene che originariamente ha provocato l'attivazione del linfocita. Gli anticorpi svolgono diverse funzioni, che verranno elencate nel paragrafo successivo.

Le cellule della memoria non producono anticorpi, ma li esprimono sulla propria superficie e sono rapidamente riattivate in risposta a un successivo contatto con lo stesso antigene.

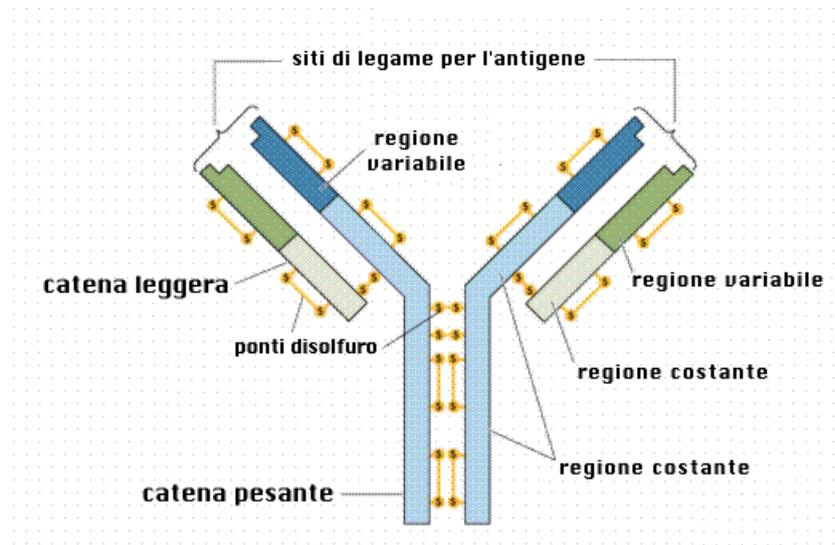
### **3.1.3 Anticorpi**

#### **3.1.3.1 Struttura degli anticorpi**

Gli anticorpi, o immunoglobuline, sono costituiti da una struttura proteica che forma una sorta di "Y", in cui si trovano due catene pesanti (catene H, o *heavy chains*) e due catene leggere (catene L, o *light chains*), collegate tra loro da ponti disolfuro.

Sia le catene pesanti che quelle leggere sono formate da una porzione costante e una porzione variabile. Le porzioni variabili corrispondono ai bracci della "Y" e formano gli "*antigen binding sites*", ovvero i siti deputati al legame con l'antigene. La struttura dell'immunoglobulina è schematizzata nella seguente figura.

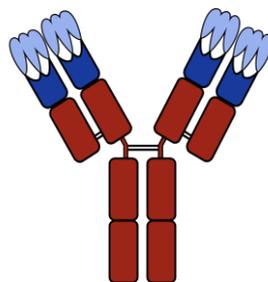
**Figura 2- Struttura di un'immunoglobulina: le catene leggere sono colorate in verde, mentre le catene pesanti sono colorate in blu; le parti più chiare costituiscono la regione costante, quelle più scure la regione variabile; Nella porzione terminale delle catene, sui bracci della "Y", sono indicati i siti di legame per l'antigene.**



Fonte: [http://enicocastello.info/Biologia/Fisiologia%20animale\\_Iperesto/Cap.04/Par.4/strutt.immunogl.html](http://enicocastello.info/Biologia/Fisiologia%20animale_Iperesto/Cap.04/Par.4/strutt.immunogl.html)

Nella figura 3 si evidenzia che su ogni *antigen binding site* sono localizzati tre segmenti CDR<sup>62</sup> (tre sulla catena pesante, tre sulla catena leggera), i quali determinano la specificità per un epitopo<sup>63</sup>. Le regioni CDR di anticorpi diversi differiscono tra loro per la sequenza amminoacidica che li compone e a volte per la loro lunghezza.

**Figura 3- Rappresentazione schematica di un'immunoglobulina. In rosso è rappresentata la regione costante, e in blu la regione variabile, sulla quale sono rappresentate in azzurro le regioni CDR (3 su ogni catena).**



Fonte: <https://en.wikipedia.org/wiki/Antibody>

<sup>62</sup> *Complementarity Determining Regions*, o regioni ipervariabili dell'anticorpo.

<sup>63</sup> Epitopo: regione di superficie di una proteina che viene riconosciuta da un anticorpo. Diversi anticorpi possono legarsi a diversi epitopi, i quali possono essere espressi sulla superficie di una stessa proteina estranea.

Gli anticorpi sono suddivisibili in classi: IgG<sup>64</sup>, IgM, IgA, IgE e IgD. Le diverse classi si distinguono per il tipo di regione costante. Gli anticorpi appartenenti a una stessa classe presentano un'uguale regione costante, la quale influisce sulle proprietà biologiche dell'anticorpo, ma possono esibire diversi domini variabili, perciò legarsi a differenti epitopi specifici.

La capacità del sistema immunitario di produrre delle modifiche nei domini variabili degli anticorpi, permette agli anticorpi di legarsi a singoli epitopi differenti.

Una plasmacellula che è in grado di produrre una classe di anticorpi, nel corso della vita può andare incontro al fenomeno di *class-switching* isotipico, ovvero cambierà la classe di immunoglobuline prodotte, conservandone la specificità e le proprietà di legame. In altre parole varia la regione costante, quindi l'azione biologica dell'immunoglobulina, ma viene mantenuta la regione variabile che riconosce un determinato epitopo.

### **3.1.3.2 Funzioni principali svolte dagli anticorpi**

Le funzioni svolte dagli anticorpi sono:

- 1) Opsonizzazione, o facilitazione della fagocitosi: l'anticorpo si lega all'antigene tramite gli *antigen binding sites*, mentre tramite la porzione costante (Fc) crea un legame con i recettori presenti sulla superficie dei fagociti, attivando così la fagocitosi.
- 2) Attivazione del complemento: l'anticorpo lega l'antigene tramite il dominio variabile, e la porzione costante (Fc) lega una proteina del complemento. A questo punto si innesca una cascata di attivazione delle proteine del complemento, che porta all'opsonizzazione del patogeno e media la sua distruzione. L'opsonizzazione può essere data sia dall'azione di proteine del complemento, che di anticorpi, come descritto nel punto 1.
- 3) Neutralizzazione dell'antigene: il legame dell'anticorpo con il patogeno provoca la neutralizzazione dell'azione dannosa di quest'ultimo.

---

<sup>64</sup> Le IgG (immunoglobuline G) costituiscono la classe di anticorpi che prevale, ed è suddivisibile in sottoclassi (IgG1, IgG2, ecc.).

- 4) ADCC (citotossicità anticorpo dipendente): gli anticorpi collaborano con l'azione citotossica dei linfociti T-citotossici, dei linfociti-NK e dei macrofagi: l'immunoglobulina si lega a un antigene esposto sulla membrana di una cellula attraverso gli *antigen binding sites* lasciando libero il proprio dominio costante, il quale viene riconosciuto dai recettori presenti sulle sopraccitate cellule ad attività citotossica.

### 3.1.3.3 Variabilità degli anticorpi

La variabilità degli anticorpi è dovuta al riarrangiamento delle sequenze di DNA codificanti per gli anticorpi durante lo sviluppo dei linfociti B.

I gruppi di geni che codificano per gli anticorpi sono suddivisi in piccoli segmenti, che subiscono selezione casuale e vengono riarrangiati nei linfociti B. In tale maniera vengono generati anticorpi diversi tra loro, i quali circolano nell'attesa di incontrare un antigene, per il quale avranno una bassa affinità.

Il contatto di un anticorpo con un antigene avvia un ulteriore processo di diversificazione degli anticorpi. Nei linfociti B in proliferazione, con l'esposizione a un antigene, si ha un aumento delle mutazioni a carico dei geni che codificano per la regione variabile<sup>65</sup>. In particolare viene riarrangiata la parte che codifica per le regioni CDR, dette anche "regioni ipervariabili", infatti è in esse che si concentra la maggiore variabilità tra le sequenze amminoacidiche di anticorpi diversi.

In questo modo si ha la produzione di un *range* di anticorpi con una variabile affinità per l'antigene. Tra questi vengono progressivamente favoriti quelli dotati di più alta affinità, i quali si espandono a discapito degli altri.

Questo processo prende il nome di "maturazione di affinità".

Il risultato è la possibilità di produrre anticorpi per un'enorme varietà di antigeni e anche di sviluppare specificità nei confronti di un solo antigene.

---

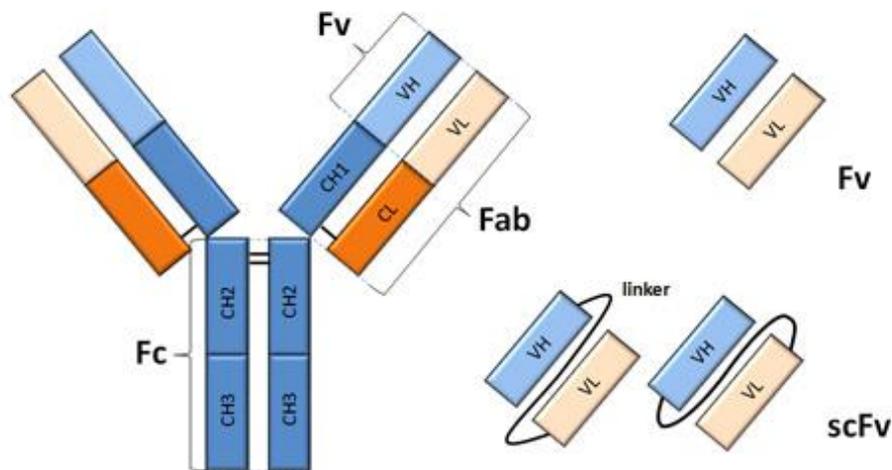
<sup>65</sup> Gli anticorpi sono catene polipeptidiche codificate da segmenti genetici che si riarrangiano nei linfociti B.

### 3.1.4 Frammenti anticorpali

La regione di un'immunoglobulina che forma il sito di legame per l'antigene può essere isolata per formare il frammento chiamato "FAB" (*Fragment Antigen Binding*). Esso contiene la regione variabile, inclusi i domini CDR, e anche una piccola parte della regione costante.

Isolando soltanto la regione variabile di un anticorpo si ottiene il frammento "Fv" (*Fragment variable*), il quale comprende le porzioni variabili della catena leggera e della catena pesante. Questi due domini variabili possono, inoltre, essere legati tra loro mediante una breve catena di amminoacidi per costituire il frammento "scFv", o "*single-chain Fv*". I frammenti anticorpali qui menzionati sono schematizzati nella seguente figura.

**Figura 4- Rappresentazione schematica dei frammenti anticorpali: Fv (*Fragment variable*), Fc (*Fragment crystallizable*), Fab (*Fragment antigen binding*), scFv (*single-chain Fragment variable*). Le catene pesanti sono colorate in blu, mentre quelle leggere in arancione. La porzione più chiara rappresenta la regione variabile della catena leggera (VL) e pesante (VH).**



Fonte: <http://www.abdesignlabs.com/technical-resources/scfv-cloning/>

Ognuno dei frammenti citati possiede le stesse proprietà di legame di un anticorpo completo, nonostante siano frammenti monovalenti, ovvero presentino un solo sito di legame per l'antigene e non due, come avviene nell'immunoglobulina completa.

Le immunoglobuline bivalenti sono capaci di legare due molecole antigeniche simultaneamente, attraverso i due *antigen binding sites*. Isolando il frammento “FAB2”, si ottiene un frammento anticorpale bivalente, che contiene entrambe le regioni variabili comprendenti i siti di legame per l’antigene.

Inoltre, si può isolare il frammento “Fc” (Frammento cristallizzabile<sup>66</sup>), costituito dalla regione costante, che è formata da una porzione delle due catene pesanti, e corrisponde allo stelo della “Y” dell’immunoglobulina.

### **3.1.5 Anticorpi policlonali e monoclonali**

Inoculando un antigene in un animale da laboratorio, è possibile purificare dal suo siero le immunoglobuline prodotte. In questa maniera si ottengono anticorpi “policlonali”, ovvero una popolazione di anticorpi prodotti da diverse plasmacellule, che quindi si legano a epitopi diversi di uno stesso antigene.

Gli anticorpi policlonali possono anche essere sintetizzati attraverso le tecniche di ingegneria genetica.

Gli anticorpi monoclonali, invece, si caratterizzano per il fatto di possedere tra loro identiche proprietà di legame verso l’antigene. Dal momento che essi sono prodotti da cloni di una sola plasmacellula, sono specifici per lo stesso epitopo.

La produzione di una grande quantità di anticorpi monoclonali può essere ottenuta mediante il metodo di Köhler e Milstein: nell’animale da laboratorio viene inoculato un antigene in modo da stimolare la produzione di anticorpi da parte dei linfociti B. Le cellule B specializzate nella produzione di un particolare anticorpo vengono isolate e messe in coltura.

Esse producono anticorpi specifici per un epitopo e, attraverso la fusione con cellule derivanti da un mieloma murino, possono essere immortalizzate. Il risultato della fusione è un ibridoma che produce anticorpi monoclonali in grandi quantità.

---

<sup>66</sup> Frammento cristallizzabile: chiamato così perché, se immerso in un liquido proteico, tende a cristallizzare, ovvero formare dei complessi con altri composti presenti.

### **3.1.6 Anticorpi per uso umano**

L'ibridoma costituito attraverso il metodo di Köhler e Milstein precedentemente descritto, risulta più efficiente e maggiormente produttivo se è costituito da cellule di origine murina, e non umana. Tuttavia, se si intende utilizzare gli anticorpi per uso farmaceutico nell'uomo, gli anticorpi murini daranno facilmente origine a una risposta immunitaria diretta contro gli anticorpi stessi (produzione di "*human anti-mouse antibody*", HAMA).

Per questo motivo sono stati studiati diversi metodi per rendere gli anticorpi compatibili con l'uso umano.

Inizialmente si è arrivati alla creazione di un anticorpo chimerico, formato dalla regione costante di un'immunoglobulina umana, e la regione variabile dell'anticorpo murino, in modo da ottenere la specificità di legame desiderata ed eliminare la risposta HAMA. Così facendo, tuttavia, essa viene solo attenuata.

Inserendo soltanto i domini CDR murini su di un'immunoglobulina umana omologa all'immunoglobulina del topo, si ottiene un anticorpo "umanizzato", e ciò permette una significativa riduzione della risposta immune anti-anticorpo, ma al tempo stesso viene ridotta anche l'affinità dell'anticorpo per l'antigene.

Mediante l'uso di topi transgenici è possibile ottenere anticorpi completamente umani. Ciò è possibile rimpiazzando i geni delle linee germinali delle immunoglobuline murine con le sequenze genetiche codificanti per anticorpi umani, cosicché l'animale, venendo in contatto con l'antigene, produrrà anticorpi umani.

Le plasmacellule che producono questi anticorpi possono essere isolate e utilizzate per produrre gli ibridomi, secondo il metodo di Köhler e Milstein riportato nel precedente paragrafo.

### **3.1.7 Anticorpi nella ricerca**

Gli anticorpi monoclonali possono essere sfruttati per la loro specificità nello studio dei recettori presenti sulla superficie delle cellule.

Un anticorpo monoclonale specifico per un recettore presente sulla superficie di una cellula può essere usato per diversi scopi: per identificare le cellule che

esprimono tale recettore; per determinare se il recettore lega specificamente un'altra particolare molecola, cioè un ligando; per studiare la specificità del recettore per un ligando e la funzione di quel recettore.

La specificità di un recettore per un ligando può essere determinata con un "anticorpo anti-recettore". A una coltura in cui le cellule esprimono il recettore in esame, viene aggiunto il ligando in forma solubile. Se il legame ligando-recettore è inibito da un anticorpo che blocca il recettore, vuol dire che il recettore è specifico per quel ligando.

La funzione biologica di un recettore può essere studiata *in vitro* esaminando gli effetti funzionali di un agente bloccante il recettore. Ad esempio si può scoprire che il blocco di un recettore inibisce la proliferazione cellulare, quindi il recettore sarà coinvolto con tale attività biologica.

Le funzioni di un recettore *in vivo* possono essere studiate iniettando un anticorpo bloccante ad animali da sperimentazione, ed esaminando gli effetti del blocco recettoriale sull'animale.

Per esempio, la crescita di un tumore in topi trattati con un anticorpo bloccante può essere messa a confronto con quella che si ha in topi trattati con un anticorpo di specificità non rilevante. Se il trattamento con l'anticorpo bloccante provoca un aumento della crescita tumorale, e il recettore in studio è presente esclusivamente sulle cellule immunitarie, il risultato dimostra che il recettore è necessario per la risposta immunitaria antitumorale.

Se invece il blocco di un recettore espresso sulle cellule immunitarie mediante un anticorpo provoca un'inibizione della crescita tumorale, significa che tale recettore è coinvolto in meccanismi di "immuno-evasione", vale a dire strategie di depotenziamento della risposta immunitaria contro i tumori<sup>67</sup>.

---

<sup>67</sup> L'esempio descritto corrisponde al caso di cui mi occuperò nei paragrafi seguenti, che riguarda il recettore PD-1. Gli studi condotti sul suddetto recettore hanno dimostrato il suo ruolo nell'immuno-evasione tumorale.

### **3.2 Presentazione del caso: contenuto del brevetto EP1537878**

Nei capitoli precedenti sono stati affrontati gli argomenti che mi permettono di descrivere nei seguenti paragrafi il caso concreto di un brevetto avente come oggetto un anticorpo monoclonale per uso terapeutico.

In data 02.07.2003, una casa farmaceutica giapponese ha depositato la domanda di brevetto internazionale PCT/JP2003/008520<sup>68</sup>, rivendicando la priorità<sup>69</sup> di due precedenti domande giapponesi, la prima depositata il 03.07.2002, e la seconda depositata il 06.02.2003.

La domanda di brevetto internazionale ha originato la corrispondente domanda di brevetto europeo EP 03741154.3, la quale ha prodotto il brevetto EP1537878 (Figura 5).

---

<sup>68</sup> Il PCT o Trattato di Cooperazione in materia di Brevetti (*Patent Cooperation Treaty*) è un trattato multilaterale gestito dalla WIPO (*World Intellectual Property Organization*) che ha sede a Ginevra. La procedura PCT facilita l'ottenimento di una protezione per le proprie invenzioni negli Stati membri: un'unica domanda internazionale ha gli stessi effetti di una domanda nazionale per gli Stati designati.

<sup>69</sup> Diritto di priorità: si veda capitolo I, paragrafo 1.5.

Figura 5- Prima pagina del brevetto EP1537878.

<p>(19) </p>	 <p>(11) <b>EP 1 537 878 B1</b></p>																				
<p>(12) <b>EUROPEAN PATENT SPECIFICATION</b></p>																					
<p>(45) Date of publication and mention of the grant of the patent: <b>22.09.2010 Bulletin 2010/38</b></p> <p>(21) Application number: <b>03741154.3</b></p> <p>(22) Date of filing: <b>02.07.2003</b></p>	<p>(51) Int Cl:</p> <table border="0"> <tr> <td><b>A61K 45/00</b> <sup>(2006.01)</sup></td> <td><b>A61K 38/17</b> <sup>(2006.01)</sup></td> </tr> <tr> <td><b>A61K 39/395</b> <sup>(2006.01)</sup></td> <td><b>A61K 31/7088</b> <sup>(2006.01)</sup></td> </tr> <tr> <td><b>A61P 31/00</b> <sup>(2006.01)</sup></td> <td><b>A61P 35/00</b> <sup>(2006.01)</sup></td> </tr> <tr> <td><b>A61P 35/04</b> <sup>(2006.01)</sup></td> <td><b>A61P 37/04</b> <sup>(2006.01)</sup></td> </tr> <tr> <td><b>C12N 5/10</b> <sup>(2006.01)</sup></td> <td><b>C12Q 1/02</b> <sup>(2006.01)</sup></td> </tr> <tr> <td><b>G01N 33/50</b> <sup>(2006.01)</sup></td> <td><b>A61K 35/14</b> <sup>(2006.01)</sup></td> </tr> <tr> <td><b>A61K 33/00</b> <sup>(2006.01)</sup></td> <td><b>A61K 35/00</b> <sup>(2006.01)</sup></td> </tr> <tr> <td><b>G01N 33/574</b> <sup>(2006.01)</sup></td> <td><b>A01K 67/027</b> <sup>(2006.01)</sup></td> </tr> <tr> <td><b>A61K 31/00</b> <sup>(2006.01)</sup></td> <td><b>C07K 16/28</b> <sup>(2006.01)</sup></td> </tr> <tr> <td><b>C07K 14/705</b> <sup>(2006.01)</sup></td> <td><b>C07K 16/46</b> <sup>(2006.01)</sup></td> </tr> </table> <p>(86) International application number: <b>PCT/JP2003/008420</b></p> <p>(87) International publication number: <b>WO 2004/004771 (15.01.2004 Gazette 2004/03)</b></p>	<b>A61K 45/00</b> <sup>(2006.01)</sup>	<b>A61K 38/17</b> <sup>(2006.01)</sup>	<b>A61K 39/395</b> <sup>(2006.01)</sup>	<b>A61K 31/7088</b> <sup>(2006.01)</sup>	<b>A61P 31/00</b> <sup>(2006.01)</sup>	<b>A61P 35/00</b> <sup>(2006.01)</sup>	<b>A61P 35/04</b> <sup>(2006.01)</sup>	<b>A61P 37/04</b> <sup>(2006.01)</sup>	<b>C12N 5/10</b> <sup>(2006.01)</sup>	<b>C12Q 1/02</b> <sup>(2006.01)</sup>	<b>G01N 33/50</b> <sup>(2006.01)</sup>	<b>A61K 35/14</b> <sup>(2006.01)</sup>	<b>A61K 33/00</b> <sup>(2006.01)</sup>	<b>A61K 35/00</b> <sup>(2006.01)</sup>	<b>G01N 33/574</b> <sup>(2006.01)</sup>	<b>A01K 67/027</b> <sup>(2006.01)</sup>	<b>A61K 31/00</b> <sup>(2006.01)</sup>	<b>C07K 16/28</b> <sup>(2006.01)</sup>	<b>C07K 14/705</b> <sup>(2006.01)</sup>	<b>C07K 16/46</b> <sup>(2006.01)</sup>
<b>A61K 45/00</b> <sup>(2006.01)</sup>	<b>A61K 38/17</b> <sup>(2006.01)</sup>																				
<b>A61K 39/395</b> <sup>(2006.01)</sup>	<b>A61K 31/7088</b> <sup>(2006.01)</sup>																				
<b>A61P 31/00</b> <sup>(2006.01)</sup>	<b>A61P 35/00</b> <sup>(2006.01)</sup>																				
<b>A61P 35/04</b> <sup>(2006.01)</sup>	<b>A61P 37/04</b> <sup>(2006.01)</sup>																				
<b>C12N 5/10</b> <sup>(2006.01)</sup>	<b>C12Q 1/02</b> <sup>(2006.01)</sup>																				
<b>G01N 33/50</b> <sup>(2006.01)</sup>	<b>A61K 35/14</b> <sup>(2006.01)</sup>																				
<b>A61K 33/00</b> <sup>(2006.01)</sup>	<b>A61K 35/00</b> <sup>(2006.01)</sup>																				
<b>G01N 33/574</b> <sup>(2006.01)</sup>	<b>A01K 67/027</b> <sup>(2006.01)</sup>																				
<b>A61K 31/00</b> <sup>(2006.01)</sup>	<b>C07K 16/28</b> <sup>(2006.01)</sup>																				
<b>C07K 14/705</b> <sup>(2006.01)</sup>	<b>C07K 16/46</b> <sup>(2006.01)</sup>																				
<p>(54) <b>IMMUNOPOTENTIATING COMPOSITIONS</b>  <b>IMMUNPOTENZIERENDE ZUSAMMENSETZUNGEN</b>  <b>COMPOSITIONS IMMUNOSTIMULANTES</b></p>																					
<p>(84) Designated Contracting States: <b>AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LI LU MC NL PT RO SE SI SK TR</b></p> <p>(30) Priority: <b>03.07.2002 JP 2002194491</b> <b>06.02.2003 JP 2003029846</b></p> <p>(43) Date of publication of application: <b>08.06.2005 Bulletin 2005/23</b></p> <p>(60) Divisional application: <b>10161767.8 / 2 206 517</b> <b>10172772.5</b></p> <p>(73) Proprietors:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD.</b> Osaka-shi, Osaka 541-8526 (JP)</li> <li>• <b>Honjo, Tasuku</b> Kyoto-shi, Kyoto 606-0001 (JP)</li> </ul> <p>(72) Inventors:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>HONJO, Tasuku</b> Kyoto-shi, Kyoto 606-0001 (JP)</li> <li>• <b>MINATO, Nagahiro</b> Kyoto-shi, Kyoto 606-8105 (JP)</li> </ul> </p></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>IWAI, Yoshiko,</b> c/o The Rockefeller University New York, NY 10021 (US)</li> <li>• <b>SHIBAYAMA, Shiro,</b> c/o Ono Pharmaceutical Co., Ltd. Tsukuba-shi, Ibaraki 300-4247 (JP)</li> </ul> <p>(74) Representative: <b>Schön, Christoph et al</b> <b>Kroher-Strobel</b> <b>Rechts- und Patentanwälte</b> <b>Bavariaring 20</b> <b>80336 München (DE)</b></p> <p>(56) References cited:  <table border="0"> <tr> <td><b>EP-A- 1 591 527</b></td> <td><b>EP-A2- 0 670 369</b></td> </tr> <tr> <td><b>WO-A-01/14557</b></td> <td><b>WO-A-02/00730</b></td> </tr> <tr> <td><b>WO-A-02/078731</b></td> <td><b>WO-A-2006/121168</b></td> </tr> <tr> <td><b>WO-A1-01/14557</b></td> <td><b>WO-A1-02/078731</b></td> </tr> <tr> <td><b>WO-A1-03/011911</b></td> <td><b>WO-A2-02/00692</b></td> </tr> <tr> <td><b>WO-A2-02/00730</b></td> <td><b>WO-A2-03/042402</b></td> </tr> </table> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>TAMURA H ET AL:</b> "B7-H1 costimulation preferentially enhances CD28-independent T-helper cell function" <b>BLOOD</b>, W.B.SAUNDERS COMPANY, ORLANDO, FL, US, vol. 97, no. 6, 15 March 2001 (2001-03-15), pages 1809-1816, XP002958254 ISSN: 0006-4971</li> </ul> </p>	<b>EP-A- 1 591 527</b>	<b>EP-A2- 0 670 369</b>	<b>WO-A-01/14557</b>	<b>WO-A-02/00730</b>	<b>WO-A-02/078731</b>	<b>WO-A-2006/121168</b>	<b>WO-A1-01/14557</b>	<b>WO-A1-02/078731</b>	<b>WO-A1-03/011911</b>	<b>WO-A2-02/00692</b>	<b>WO-A2-02/00730</b>	<b>WO-A2-03/042402</b>								
<b>EP-A- 1 591 527</b>	<b>EP-A2- 0 670 369</b>																				
<b>WO-A-01/14557</b>	<b>WO-A-02/00730</b>																				
<b>WO-A-02/078731</b>	<b>WO-A-2006/121168</b>																				
<b>WO-A1-01/14557</b>	<b>WO-A1-02/078731</b>																				
<b>WO-A1-03/011911</b>	<b>WO-A2-02/00692</b>																				
<b>WO-A2-02/00730</b>	<b>WO-A2-03/042402</b>																				

L'oggetto del brevetto è un anticorpo monoclonale, utilizzato per il trattamento del cancro, in particolare il melanoma metastatico.

L'anticorpo è specifico per la proteina PD-1 (*Programmed Death-1*), che è una proteina di membrana espressa sulla superficie dei linfociti T, con funzione di recettore, e appartiene alla famiglia recettoriale CD28.

Sono stati identificati due ligandi endogeni per PD-1, ovvero PD-L1 e PD-L2, anch'essi proteine di membrana, che si trovano sulla superficie di varie cellule, tra

cui le cellule APC<sup>70</sup>, le cellule infettate da antigeni virali o batterici, e alcune cellule tumorali. Quando uno dei ligandi si lega a PD-1, il complesso PD-1/PD-L1 (o PD-L2) scatena un segnale nel linfocita T che ha effetto inibitore sull'attività del linfocita stesso, cioè un effetto immunosoppressore.

Il ruolo fisiologico del segnale prodotto da PD-1/PD-L1 (o PD-L2) consiste in un meccanismo di controllo delle reazioni abnormi autoimmunitarie, ovvero un meccanismo di tolleranza immunologica periferica.

Tuttavia, la presenza di PD-L1 e PD-L2 su alcuni tipi di cellule tumorali, e il loro legame con PD-1 presente sulla superficie dei linfociti T, risultano avere un ruolo nella cosiddetta "immuno-evasione" tumorale, cioè portano all'inibizione della risposta immunitaria citotossica contro le cellule tumorali, favorendo lo sviluppo del tumore.

L'invenzione si basa sulla scoperta che, un anticorpo in grado di legare selettivamente il recettore PD-1, blocchi per competizione il legame con il ligando naturale del recettore stesso e, interferendo in tale maniera con il *pathway* PD-1/PD-L, viene bloccato il segnale immunosoppressivo e potenziata la risposta immunitaria contro eventuali cellule tumorali.

Il brevetto è stato contestato per mancanza di validità da parte di un'altra casa farmaceutica multinazionale.

Il brevetto EP1537878 contiene quattro rivendicazioni di seguito riportate:

1. "Uso dell'anticorpo anti-PD-1 che inibisce il segnale immunosoppressivo di PD-1 per la fabbricazione di un medicinale per il trattamento del cancro."
2. "Uso come nella rivendicazione 1, in cui l'anticorpo anti-PD-1 è un anticorpo umano anti-PD-1"
3. "Anticorpo anti-PD-1 che inibisce il segnale immunosoppressivo di PD-1 per uso nel trattamento del cancro. "
4. . "Anticorpo anti-PD-1 per l'uso descritto nella rivendicazione 3, in cui l'anticorpo anti-PD-1 è un anticorpo umano anti-PD-1."

---

<sup>70</sup> Cellule che presentano l'antigene: si veda capitolo III, paragrafo 3.1.2.

Le rivendicazioni, in pratica, sono due, ripetute in due diverse forme: le rivendicazioni 1 e 2 sono redatte secondo la *Swiss-type claim*<sup>71</sup>, mentre per le rivendicazioni 3 e 4 è stato adottato il formato per la protezione della prima o seconda applicazione terapeutica, ai sensi della EPC 2000 (*purpose-limited product claim*).

In origine, nella domanda di brevetto veniva rivendicato l'uso di qualsiasi anticorpo anti-PD-1 (anti-recettore) e anti-PD-L1 (anti-ligando), ma nel brevetto viene concessa solo la protezione sull'anticorpo anti-PD-1.

L'oggetto delle rivendicazioni 1 e 3 è un anticorpo, che può essere di qualsiasi tipo (policlonale, monoclonale, frammenti di anticorpi), e di qualsiasi origine (animale, umana, umanizzata). Le rivendicazioni 2 e 4 comprendono invece solo l'anticorpo umano, o umanizzato.

L'ampia descrizione contenuta nel brevetto riguarda diverse forme teoriche di realizzazione e di applicazione terapeutica dell'invenzione, e sono presenti 13 esempi che ne illustrano i vari aspetti.

In particolare, l'esempio 13, riportato nella figura 6, è quello che dimostrerebbe la reale efficacia terapeutica dell'anticorpo *in vivo*. Esso descrive un esperimento in cui un anticorpo monoclonale anti-PD-1 viene somministrato a topi ai quali sono state inoculate cellule di melanoma, per valutarne l'effetto sulle metastasi tumorali. Secondo i risultati della sperimentazione, si ha la soppressione delle metastasi delle cellule di melanoma.

---

<sup>71</sup> *Swiss-type Claim*: si veda Capitolo II, paragrafo 2.2.

**Figura 6- Esempio 13 del brevetto EP1537878: dimostrazione dell'efficacia *in vivo* di un anticorpo monoclonale anti-PD-1 per la soppressione delle metastasi tumorali.**

Example 13

**[0128]** The inhibiting effect of anti-PD-1 antibody on cancer metastasis was evaluated by intraperitoneal administration of anti-mouse PD-1 monoclonal antibody to C57BL/6 mice to which B16 melanoma cells had been transferred at intervals of 2 days followed by measuring the liver weight on day 18 after transfer.

**[0129]** The increase in the liver weight of anti-PD-1 antibody administrated group was significantly suppressed than that in control IgG administrated control group (liver weight/carcinoma cell non-transferred group: 1.3g, decrease from control group: 6.8g to anti-PD-1 antibody administrated group: 3.5g.). The suppression of the increase in this weight presents that the metastasis of B16 melanoma cells is suppressed.

### 3.3 Sufficienza di descrizione

Ai sensi dell'articolo 83 EPC, la protezione brevettuale è valida solo se l'invenzione rivendicata è descritta nel testo del brevetto in maniera sufficientemente chiara e completa da permettere la sua realizzazione da parte di un esperto del campo<sup>72</sup>.

In questo caso la protezione conferita dal brevetto è piuttosto ampia, poiché gli anticorpi sono rivendicati in generale, senza alcuna limitazione quanto alla loro origine e tipologia. Anche il tipo di cancro da trattare è del tutto generico.

Tuttavia, non tutte le forme di realizzazione dell'invenzione comprese nelle rivendicazioni 1 e 3 sono in grado di risolvere il problema tecnico alla base, dal momento che è stato provato che non tutti i tipi di tumore rispondono al trattamento in questione<sup>73</sup>. Ciò equivale a dire che le rivendicazioni 1 e 3 coprono forme di realizzazione che non sono presentate nella descrizione del brevetto in un modo sufficientemente chiaro e completo da essere realizzate da un esperto nell'arte.

Inoltre, essendo rivendicato un anticorpo finalizzato a uno specifico uso terapeutico, è indispensabile che la sua efficacia sia plausibilmente dimostrata, e in questo caso l'esempio numero 13 del brevetto EP'878 dovrebbe soddisfare tale esigenza. Nei restanti esempi vengono fornite informazioni di altro tipo, che da sole potrebbero non bastare per attestare l'efficacia terapeutica dell'anticorpo.

---

<sup>72</sup> La figura dell'esperto del campo è descritta nel Capitolo I, paragrafo 1.1.

<sup>73</sup> Il fatto che non tutte le forme di realizzazione comprese nelle rivendicazioni risolvano il problema tecnico, è spiegato con maggiori dettagli nel paragrafo 3.6.1, che riguarda l'esame dell'attività inventiva.

### 3.4 Validità della priorità

In base a quanto previsto dagli articoli 87 e 89 EPC, e quanto è stato detto nel capitolo I, paragrafo 1.5 (Diritto di priorità), la priorità è valida solo per i contenuti sufficientemente descritti sia nel brevetto che nella priorità.

In nessuna delle due priorità che sono state depositate per il brevetto EP1537878 è presente il sopraccitato esempio 13 (figura 6), e ciò potrebbe costituire una motivazione per contestare la validità della priorità, dato che la dimostrazione esplicita mediante dati sperimentali dell'efficacia dell'uso terapeutico dell'anticorpo è presente soltanto nel suddetto esempio.

Inoltre, secondo il brevetto, il segnale immunosoppressore che deve essere inibito attraverso l'anticorpo rivendicato è quello prodotto dall'interazione di ambedue i ligandi, PD-L1 o PD-L2, col recettore PD-1. Al contrario, la prima priorità descrive soltanto uno dei due ligandi, cioè PD-L1.

La capacità di inibire il segnale immunosoppressivo è una caratteristica di tipo funzionale, ed è una caratteristica essenziale dell'invenzione. Tuttavia il significato stesso di "*segnale immunosoppressivo di PD-1*" è variato dalla prima priorità rispetto al brevetto EP. Nella prima priorità "*il segnale da inibire*" era il segnale scatenato dalla stimolazione del PD-1 da parte del solo PD-L1, mentre nel brevetto è spiegato che anche PD-L2 può attivare il segnale immunosoppressivo. L'introduzione del concetto di PD-L2 comporta un ampliamento del significato tecnico del brevetto.

Il segnale generato dall'interazione PD1/PD-L1 non è identico a quello generato da PD-1/PD-L2, poiché quest'ultimo risulta meno potente rispetto al primo<sup>74</sup>. Di conseguenza il segnale da inibire, presenta caratteristiche qualitative e quantitative sostanzialmente diverse, se è generato da uno, o dall'altro ligando.

Anche se la priorità e la domanda (o brevetto), citano in una rivendicazione la stessa caratteristica (formalmente identica), il cui significato tecnico però è stato

---

<sup>74</sup> , Y., Latchman Y., Iwai, J., Brown, V., Boussiotis, B., Carreno, H., Nishimura, T., Okazaki, T., Honjo, A., Sharpe, G., Freeman, PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. Nature Immunology 2, 261-268, (2001)

ampliato passando dalla priorità alla domanda di brevetto, allora ci troviamo di fronte a un ampliamento dell'invenzione rispetto all'invenzione nella priorità<sup>75</sup>.

Il tipo di ligando, che è l'agente che determina il segnale immunosoppressivo, entra nella definizione stessa del segnale da inibire, che è la caratteristica essenziale dell'invenzione.

Nel brevetto, il concetto di "segnale immunosoppressivo" è più ampio e quindi almeno una parte dell'oggetto protetto da EP'878 potrebbe non avere diritto alla prima priorità.

Posteriormente è stato dimostrato che la natura e la forza delle interazioni di PD-L1 e PD-L2 con PD-1 sono diverse<sup>76</sup>, quindi un anticorpo in grado di inibire l'interazione PD-1/PD-L1, non per forza inibisce anche l'interazione PD-1/PD-L2. La prima priorità descrive soltanto anticorpi in grado di inibire l'interazione PD-1/PD-L1, mentre il brevetto descrive anticorpi in grado di inibire entrambe le interazioni, quindi il concetto di "anticorpi anti PD-1" assume un significato più ampio passando dalla prima priorità al brevetto.

Per questi motivi la validità del diritto di priorità è difficilmente riconoscibile.

Se la priorità dovesse essere dichiarata non valida, i documenti pubblicati nel periodo di tempo che intercorre tra la data di deposito della prima priorità e la data di deposito della seconda priorità o della domanda di brevetto, diventerebbero arte anteriore, e sarebbero utilizzabili sia contro la novità che contro l'attività inventiva dell'invenzione.

Nei successivi paragrafi saranno citati alcuni di questi documenti.

---

<sup>75</sup> Decisione T 500/01 della Commissione dei Ricorsi EPO.

<sup>76</sup> M. Ghiotto et al. *International Immunology* (2010), vol. 22. No. 8, pagg. 651-660: "Abbiamo analizzato i meccanismi molecolari delle interazioni di PD-1 con i suoi ligandi mediante risonanza plasmonica di superficie e legame di superficie cellulare nonché la capacità dei due ligandi di competere per il legame con PD-1. Il PD-L1 e PD-L2 si legano al PD-1 con affinità comparabili, ma si sono osservate differenze sorprendenti al livello delle caratteristiche di associazione e dissociazione. PD-L1, ma non PD-L2, presentava una interazione ritardata reminiscente di un fenomeno di transizione conformazionale [...]."

*Questi dati enfatizzano ulteriormente i meccanismi molecolari differenziali dell'interazione di PD-L1 e PD-L2 con PD-1, e suggeriscono possibili nuovi approcci per la terapia di infezione cronica, cancro e trapianto."*

### 3.5 Esame della novità

Sono stati presentati diversi documenti anteriori a EP1537878, che potrebbero mettere in discussione la presenza di novità nel brevetto, ammettendo che la prima priorità sia considerata valida. Riporto in seguito alcuni passaggi in essi contenuti. In particolare, per discutere il requisito della novità, ho ritenuto opportuno citare il brevetto WO01/14557, che peraltro è indicato come *closest prior art*<sup>77</sup> in EP1537878, e ne commenterò alcune rivendicazioni e due degli esempi in esso presenti. Inoltre riporto un passo del brevetto WO02/079499, che rappresenta uno sviluppo successivo del brevetto WO01/14557 e infine una pubblicazione sulla rivista scientifica “Nature Medicine”<sup>78</sup>, in cui si illustrano alcune ricerche effettuate su PD-1 e PD-L1, anch’esse precedenti a EP1537878.

#### 3.5.1 Il documento di anteriorità WO01/14557

- **WO01/14557: rivendicazioni**

Il brevetto WO01/14557<sup>79</sup> è intitolato: “*PD-1, a receptor for B7-4, and uses therefor*”, dove per B7-4 si intende il ligando PD-L1.

Di seguito sono riportate alcune tra le 28 rivendicazioni del brevetto WO 01/14557, che contengono elementi simili al brevetto EP1537878:

1. Un metodo per modulare la risposta immune, che consiste nel porre a contatto una cellula immunitaria con un agente che modula la via di segnalazione di PD1, modulando, in tal modo, la risposta immunitaria.

(...)

8. Un metodo descritto nella riv. 1, in cui la via di segnalazione di PD1 è inibita usando un agente selezionato tra: un anticorpo bloccante che riconosce PD-1, una

---

<sup>77</sup> *Closest prior art*: arte anteriore più vicina all’invenzione in questione.

<sup>78</sup> H., Dong, H., Tamura, F., Hirano J., Lu, G., Zhu, K., Tamada, E., Celis, L., Chen, “Tumor associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion.” *Nature Medicine* 8, 793-800, (2002)

<sup>79</sup> Data di pubblicazione della domanda di brevetto internazionale 01.03.2001.

forma non attivante di PDL-1 (frammento solubile), un anticorpo che riconosce PDL-1, e una forma solubile di PD-1.

(...)

19. Un metodo per trattare un soggetto, avente una condizione che beneficerebbe di una stimolazione della risposta immune, comprendente la somministrazione di un agente che inibisce la via di segnalazione di PD-1 in una cellula immunitaria del soggetto.

(...)

22. Un metodo come nella riv. 19, in cui la condizione è selezionata tra: un tumore, una patologia neurologica o un disturbo autoimmune.

(...)

Nelle rivendicazioni 1 e 8 del brevetto WO01/14557 viene menzionato un anticorpo anti-PD-1, o che si leghi al recettore o al ligando bloccandolo.

La rivendicazione 19 afferma che la stimolazione della risposta immune prodotta nella suddetta maniera potrebbe apportare un beneficio su di un soggetto affetto da una patologia nella quale sia utile una stimolazione della risposta immune, e nella rivendicazione 22 viene riportato come esempio di una simile patologia quello del tumore.

- **WO01/14557: esempio 17**

Nell' esempio 17, del brevetto WO 01/14557, il cui testo originale è riportato in figura 7, viene esaminata la capacità di inibizione di legame tra B7-4 (vale a dire PD-L1) e PD-1, attraverso l'uso di un anticorpo che lega PD-1.

Viene descritto un test ELISA in cui il frammento scFv umano anti PD-1<sup>80</sup>, ovvero un frammento anticorpale che lega PD-1, viene valutato per la sua capacità di inibire il legame tra PD-1 e PDL-1. In effetti risulta che il frammento scFv dell'anticorpo anti PD-1 inibisce l'interazione tra PDL-1 e PD-1.

---

<sup>80</sup> Il PD-1 scFv è il frammento variabile a singola catena dell'anticorpo anti PD-1 (*single-chain Fv*), che contiene il sito di legame per l'antigene.

Lo stesso esperimento viene condotto utilizzando, anziché il frammento PD-1 scFc, un anticorpo completo contenente le porzioni variabili anti PD-1, il quale risulta ancora più potente nell'inibire il legame rispetto al frammento scFv. L'esempio 17 (Figure 7, 8 e 9) dimostra che l'anticorpo anti-PD-1 lega il recettore PD-1, e che compete in maniera efficace con il ligando naturale del recettore.

**Figura 7- Esempio 17 del brevetto WO01/14557.**

**Example 17. Inhibition of binding of biotinylated human B7-4 Fc to human PD-1Fc**

Fc fusion proteins were generated by linking the extracellular region of PD-1 or B7-4 to the hinge-CH2-CH3 domains of murine Igγ2a. recombinant proteins were produced in COS cells transiently transfected with LipofectAMINE (Gibco-BRL) or stably transfected CHO cell lines and purified from conditioned media using protein A-Sepharose.

The ability of antibodies to B7-4 or PD-1 to inhibit the interaction of human B7-4Fc and human PD-1 Fc was tested using standard ELISA methods. Briefly, human PD-1Fc molecules were immobilized in 96-well plates, blocked, and washed. Biotinylated B7-4Fc molecules (100ng/ml) were added to wells at concentrations of approximately 2000, 700, 200, 70, 25, 8, and 1.18 ng/ml (Figure 25). The wells were incubated with StrepAvidin conjugated horse radish peroxidase, washed, and color was developed using standard methods. The ED50 of B7-4Fc was found to be 108ng/ml.

The ability of murine antibodies to human B7-4 (10D9 and 11D12) or scFv portions of human immunoglobulins (B7-4-1, B7-4-6, and B7-4-12) to inhibit the binding of biotinylated human B7-4Fc to human PD-1Fc was tested at 7 concentrations of inhibitors. The IC50 was found to range from 0.5 nM to 24 nM and the data are presented in Figure 25.

The PD-1 specific scFv were also tested for their ability to inhibit the binding of B7-4 Fc to PD-1Fc using the same ELISA methods described above. Human scFv reactive with PD-1 (PD1-17 scFv) were found to inhibit specific binding (EC50 between  $10^{-7}$  and  $10^{-8}$ ) as shown in Figure 26.  $V_L$  and  $V_H$  domains of the PD1-17scFv were used to generate a complete IgG. In brief, the  $V_H$  and  $V_L$  coding regions were linked to genomic CH and CL gene sequences in expression vectors. The resulting expression vectors were transiently transfected into human 293 cells and the IgG harvested from the conditioned medium. The potency of the grafted whole IgG molecule was higher than for the scFv antibody (EC 50 between  $10^{-8}$ M and  $10^{-9}$ M).

Figura 8.- Riporto la figura 25 a cui è fatto riferimento nell'esempio 17 di WO01/14557.

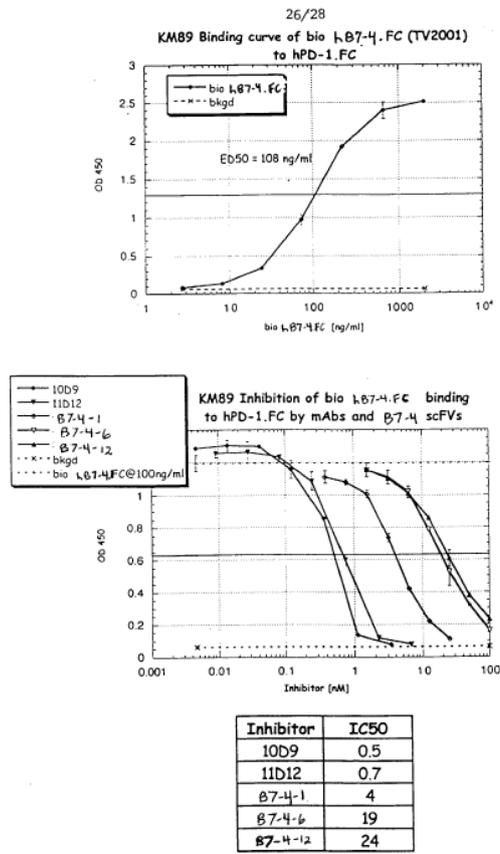
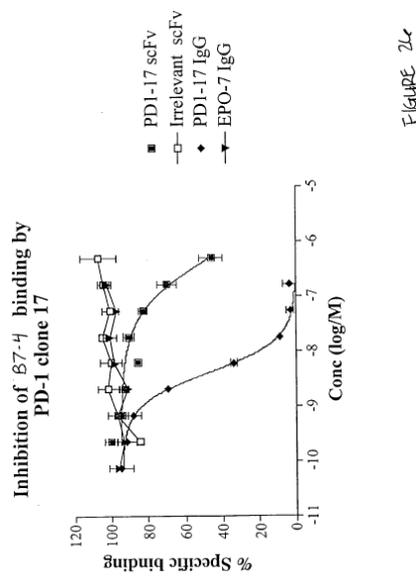


Figure 25

Figura 9- Riporto la figura 26 a cui si fa riferimento nell'esempio 17 di WO01/14557.



- **WO01/14557: esempio 18**

Nell'esempio 18, il cui testo è riportato nella figura 10, si cerca di determinare se la modulazione della via di segnalazione PD-1/PD-L1 abbia un ruolo nella regolazione della risposta immunitaria *in vivo*. I test vengono condotti su topi affetti da encefalomyelite autoimmune sperimentale<sup>81</sup>, che forniscono un modello murino di autoimmunità mediata dai linfociti T.

Da tali esperimenti risulta che i topi trattati con un agente che inibisce il legame PD-1/PD-L1 per competizione, sviluppano una sintomatologia molto più grave rispetto al gruppo di controllo, nel quale tale agente non viene somministrato<sup>82</sup>.

Questo dimostra il ruolo immunoregolatorio mediato dall'interazione tra il recettore PD1 e il ligando PD-L1, poiché somministrando l'agente inibitore, questo occupa il recettore e impedisce, per competizione con il ligando naturale, l'attivazione del recettore e la trasmissione del segnale di soppressione della risposta immune.

---

<sup>81</sup> EAE (*experimental autoimmune encephalomyelitis*) è il modello animale di patologia autoimmune indotta sperimentalmente, che provoca sintomi simili quelli che si verificano nella sclerosi multipla umana.

<sup>82</sup> Ciò avviene perché per attivare il segnale immunosoppressivo dovuto all'interazione ligando PD-L1-recettore PD-1, bisogna che il PD-L1 si trovi anch'esso sulla superficie di una cellula, in modo da avere l'ingombro sterico necessario per attivare il recettore. Se PD-L1 si trova in forma solubile, nonostante si crei il complesso ligando-recettore, il segnale non viene trasmesso e il recettore risulta bloccato.

**Figura 10- Esempio 18 del brevetto WO01/14557.**

Example 18. Administration of Soluble B7-4Fc Exacerbates Disease in a Murine Model.

To determine if modulation of the B7-4/PD-1 pathway has immunoregulatory activity in vivo, the protein was evaluated in a murine model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) that shares many clinical and pathological features with the human disease multiple sclerosis. Female SJL/J mice were immunized with 100µg of proteolipid protein (PLP) in complete Freund's adjuvant. Ten days later, spleens were harvested, processed to single cell suspensions and then restimulated in vitro with 5µg of PLP for 96 hours. Cells were washed three times in PBS and then  $15 \times 10^6$  cells transferred to naive SJL/J mice by intraperitoneal injection. The adoptive transfer of autoreactive T cells results in acute paralysis of recipient mice which manifests as loss of tail tone with subsequent progression to full hind limb paralysis. This paralytic episode coincides with marked infiltration of activated T cells and macrophages in the CNS. Under most conditions, this is an acute model of disease with spontaneous recovery occurring after a short period of paralysis. For evaluation of B7-4Fc, mice were injected subcutaneously with 200µg of the protein in 100µl of sterile saline on days 0, 2, 4, 7 and 11 after cell transfer (n=10). Control mice (n=10) received an equal volume of saline only. All animals were monitored regularly for clinical signs of disease which were scored as follows: 1. Loss of tail tone; 2. Hind limb weakness/partial hind limb paralysis; 3. Complete hind limb paralysis; 4. Hind and forelimb paralysis; 5. Moribund.

In the experiment shown in Figure 27, the incidence and onset of clinical disease were similar in both groups. Mice treated with the B7-4Fc however, developed severe disease with the majority of animals rapidly progressing to complete hind and forelimb paralysis (9/10 and 1/10 for B7-4Fc and control mice respectively). Mortality associated with clinical signs of disease was 10% in the control group and 70% in the B7-4Fc treated mice. In addition, recovery from clinical disease was substantially delayed in the B7-4Fc treated mice that did survive despite the fact that treatment was discontinued on day 11.

In conclusion, using an adoptive transfer model of T cell mediated autoimmunity, administration of soluble B7-4Fc exacerbates clinical signs of disease resulting in increased mortality and delayed recovery from paralysis. These findings are consistent with enhanced activation/infiltration of inflammatory cells into the CNS and clearly demonstrate the immunoregulatory potential for the B7-4Fc protein in vivo.

### 3.5.2 Il documento di anteriorità WO02/07499

Il contenuto del brevetto WO02/079499<sup>83</sup> è quasi uguale a quello del brevetto WO01/14557 precedentemente menzionato, ma contiene alcuni elementi aggiuntivi. In particolare, nella descrizione delle possibili applicazioni dell'invenzione, come riportato nella figura 11, viene menzionata esplicitamente la somministrazione di un anticorpo anti-PD-1 a un soggetto portatore di (o a rischio di) tumore:

*“(...) In una forma di realizzazione, un antagonista di PD-1 (ad esempio un anticorpo non-attivante contro PD-1 o B7-4 o una piccola molecola di PD-1 o B7-4) è somministrato a un individuo che ha, o è a rischio di, un tumore.”*<sup>84</sup>

**Figura 11- Parte di testo tratta dalla descrizione dell'invenzione di WO02/079499 (pag. 85 righe 23-26).**

Accordingly, inhibition of the the interaction between B7-4 on tumor cells and PD-1 is useful in inducing tumor immunity. In one embodiment, a PD-1 antagonist (e.g., a non-activating antibody against PD-1 or B7-4 or a small molecule PD-1 or B7-4 antagonist) is administered to a subject having or at risk for a tumor.

### 3.5.3 Il documento di anteriorità Dong et al. (Giugno 2002):

**Dong, H., Tamura, H., Hirano, F., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., Celis, E., Chen, L., “Tumor associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion.” Nature Medicine 8, 793-800, (2002), figura 5c.**

Nel giugno del 2002 è stato pubblicato un articolo dal titolo *“Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion”*, riguardante uno studio in cui vengono analizzate le azioni biologiche di B7-H1, altro nome di PD-L1, attraverso sperimentazioni *in vitro* e *in vivo*. I risultati

---

<sup>83</sup> Data di pubblicazione della domanda di brevetto internazionale 10.10.2002.

<sup>84</sup> WO02/079499, “PD-1, a receptor for B7-4, and uses therefor”, p. 85, righe 24-26.

ottenuti dai ricercatori hanno permesso di ipotizzare il coinvolgimento di PD-L1 nei meccanismi di immunoevasione del cancro.

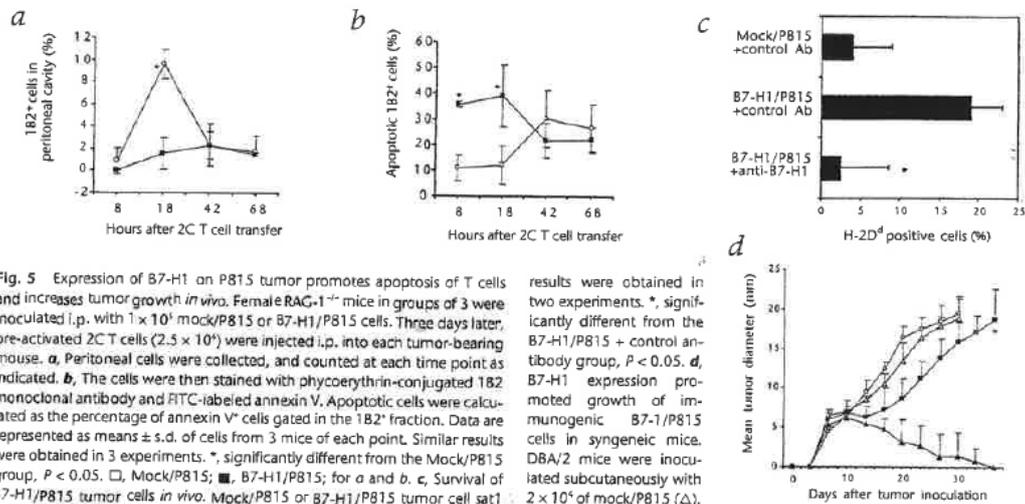
In particolare viene condotto uno studio *in vitro* su cellule di melanoma indotte a esprimere PD-L1, le quali, in co-coltura con linfociti T citotossici attivati, promuovono l'apoptosi dei linfociti tumore-specifici e sono resistenti all'inibizione di crescita mediata dai CTL. Si è visto anche che questa resistenza alla risposta immune poteva essere parzialmente neutralizzata da un anticorpo anti PD-L1.

Inoltre, per capire se l'effetto pro-apoptotico *in vitro* corrisponda *in vivo* alla distruzione dei linfociti T attivati, viene condotto uno studio in cui sono utilizzati dei topi nei quali vengono attivati i linfociti T citotossici, in modo che riconoscano le cellule tumorali.

A una parte dei topi vengono somministrate delle cellule tumorali che non esprimono PD-L1, agli altri le cellule tumorali esprimenti PD-L1.

I linfociti dei topi appartenenti al primo gruppo tendono a espandersi in risposta alla presenza di cellule tumorali, dando una risposta immune che blocca l'espansione delle cellule tumorali, mentre i linfociti del secondo gruppo tendono ad andare incontro ad apoptosi, con conseguente espansione delle cellule tumorali. I risultati dello studio *in vivo* sono presentati nella figura 5 del suddetto articolo, come riportato nella seguente figura.

**Figura 12- H. Dong et al. (Giugno 2002), la figura 5 dell'articolo riporta i risultati degli studi *in vivo* sul ruolo di PD-L1.**



**Fig. 5** Expression of B7-H1 on P815 tumor promotes apoptosis of T cells and increases tumor growth *in vivo*. Female RAG-1<sup>-/-</sup> mice in groups of 3 were inoculated i.p. with  $1 \times 10^5$  mock/P815 or B7-H1/P815 cells. Three days later, pre-activated 2C T cells ( $2.5 \times 10^5$ ) were injected i.p. into each tumor-bearing mouse. **a**, Peritoneal cells were collected, and counted at each time point as indicated. **b**, The cells were then stained with phycoerythrin-conjugated 1B2 monoclonal antibody and FITC-labeled annexin V. Apoptotic cells were calculated as the percentage of annexin V<sup>+</sup> cells gated in the 1B2<sup>+</sup> fraction. Data are represented as means  $\pm$  s.d. of cells from 3 mice of each point. Similar results were obtained in 3 experiments. \*, significantly different from the Mock/P815 group,  $P < 0.05$ . □, Mock/P815; ■, B7-H1/P815; for **a** and **b**. **c**, Survival of B7-H1/P815 tumor cells *in vivo*. Mock/P815 or B7-H1/P815 tumor cell set  $1 \times 10^5$  were inoculated i.p. 3 d before the transfer of activated 2C T cells. Control antibody (Ab) or monoclonal antibody against B7-H1 was injected i.p. 2 h before the transfer of 2C T cells. One day after the transfer of 2C T cells, the peritoneal cells were harvested and stained with antibody against H-2D<sup>d</sup>. The presence of P815 tumor was shown by the percentage of H-2D<sup>d</sup> positive cells. Data are represented as mean  $\pm$  s.d. of cells from 3 mice. Similar

results were obtained in two experiments. \*, significantly different from the B7-H1/P815 + control antibody group,  $P < 0.05$ . **d**, B7-H1 expression promoted growth of immunogenic B7-1/P815 cells in syngeneic mice. DBA/2 mice were inoculated subcutaneously with  $2 \times 10^5$  of mock/P815 (Δ), B7-H1/P815 (□), or  $5 \times 10^4$  of B7-1/P815 (▲), B7-1/B7-H1/P815 (■) tumor cells. Tumor sizes were assessed by measuring 2 perpendicular diameters in millimeters (mm) by a caliper, and the results were expressed as mean  $\pm$  s.d. of tumor diameter from 5 mice. Similar results were obtained in 4 experiments. \*, significantly different from the B7-1/P815 group,  $P < 0.01$ .

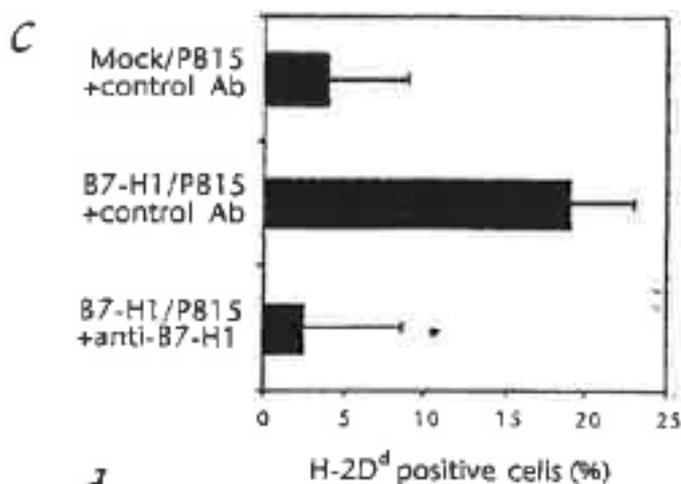
Fonte: Dong, H., Tamura, H., Hirano, F., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., Celis, E., Chen, L., Tumor associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. Nature Medicine 8, 793-800, (2002), p.799.

Nella seguente figura 13 è riportato il dettaglio del riquadro “c” della figura 5, il quale merita particolare attenzione: esso mostra la crescita di cellule tumorali esprimenti PD-L1 inoculate nei topi, in presenza o di un anticorpo di controllo, o di un anticorpo anti-PD-L1 monoclonale, ossia un anticorpo anti-ligando. L’effetto di quest’ultimo anticorpo in termini di inibizione della crescita di cellule tumorali è evidente dalla figura.

Il fatto che le cellule tumorali esprimenti PD-L1 riescano a proliferare, mentre le altre no, dimostra che l’interazione tra PD-1 e PD-L1 provochi la distruzione *in vivo* dei linfociti T citotossici attivati.

Dopoiché viene somministrato un anticorpo monoclonale anti PD-L1 al gruppo trattato con cellule che esprimono PD-L1, e questo risulta inibire la crescita delle cellule tumorali esprimenti PD-L1. Questo dimostra che l’anticorpo monoclonale anti PD-L1, bloccando l’interazione tra PD-1 e PD-L1 impedisce la trasmissione del segnale immunosoppressivo *in vivo*.

**Figura 13- H. Dong et al. (Giugno 2002), il riquadro c della figura 5 mostra, dall'alto verso il basso, la sopravvivenza delle cellule tumorali non esprimenti PD-L1; la sopravvivenza delle cellule tumorali esprimenti B7-H1 (PD-L1) *in vivo* inoculate nei topi in presenza di un anticorpo di controllo; la sopravvivenza di cellule tumorali esprimenti PD-L1 inoculate in topi in presenza di un anticorpo anti-B7-H1 (anti-PD-L1).**



Fonte: Dong, H., Tamura, H., Hirano, F., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., Celis, E., Chen, L., Tumor associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nature Medicine* 8, 793-800, (2002), p.799.

### 3.5.4 Conclusioni sulla novità

Alla luce di quanto esposto nel capitolo III (Regole generali per la protezione brevettuale di anticorpi per uso terapeutico), in particolare nel paragrafo 4.3 (Brevettabilità degli anticorpi), affronterò le problematiche che si verificano nel presente caso riguardo alla presenza del requisito di novità.

Nel caso del brevetto EP1537878 l'antigene, cioè il recettore PD-1 era conosciuto e già descritto nello stato della tecnica. Anche un anticorpo anti-PD-1 era noto come strumento analitico per la ricerca della proteina PD-1<sup>85</sup>.

<sup>85</sup> Y., Agata, A., Kawasaki, H., Nishimura, Y., Ishida, T., Tsubata, H., Yagita, T., Honjo, "Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes" *International Immunology*, Vol. 8, No. 5, pp. 765-772 (1996).

Il suddetto brevetto rivendica un anticorpo specifico anti-PD-1 per uso nel trattamento del cancro, e che ha la caratteristica di inibire il segnale immunosoppressivo trasmesso da PD-1, dato dall'interazione tra PD-1 e PD-L1.

Il concetto generale "anticorpo anti-PD-1" era già conosciuto, quindi un ipotetico anticorpo generico non sarebbe nuovo, né inventivo. Tuttavia, se l'anticorpo è selezionato sulla base di una funzione che non era mai stata descritta prima, esso sarà nuovo, e, se si tratta di una funzione inaspettata, sarà inventivo.

La specificità dell'anticorpo rivendicato in EP'878 consiste nelle seguenti caratterizzazioni:

- si lega a PD-1;
- inibisce il segnale immunosoppressivo di PD-1;
- è un anticorpo specifico per uso terapeutico nel trattamento del cancro.

La *closest prior art* è rappresentata da WO01/14557, nelle cui rivendicazioni sono presenti varie componenti che, globalmente, possono essere messe a confronto con il contenuto del brevetto EP 1537878, tuttavia in nessuna di esse è esplicitamente menzionata la combinazione di tutte le caratteristiche dell'invenzione, cioè l'anticorpo anti-PD-1 che inibisce il segnale immunosoppressivo di PD-1 per il trattamento di un tumore.

Nell'esempio 17 dello stesso documento di anteriorità è descritto un "anticorpo anti-PD-1", come quello rivendicato in EP1537878, e si riporta che questo è efficace nell'inibire il legame tra recettore e ligando, da cui si scatenerrebbe il segnale immunosoppressivo.

Ciò nonostante, questo esempio riguarda un test *in vitro*, mentre nel brevetto EP1537878 viene rivendicata l'efficacia del trattamento terapeutico *in vivo*.

Nell'esempio 18 di WO01/14557 è presentato un test *in vivo*, nel quale, però, non si utilizza l'anticorpo completo anti-PD-1, bensì un composto solubile che blocchi tale recettore (PD-L1Fc solubile). Inoltre, in questo esempio viene utilizzato un modello animale differente, ovvero un modello murino di autoimmunità, anziché i topi in cui sono state inoculate le cellule tumorali.

Quindi si può dire che WO'557 anticipa sicuramente tutti i singoli elementi che compongono l'invenzione di EP'878, ma resta in discussione se anche la specifica combinazione di questi elementi sia anticipata da WO'557.

Riguardo alla pubblicazione su *Nature Medicine*, in pratica viene provato, attraverso uno studio *in vivo*, che un anticorpo anti PD-L1 (cioè ligando) riesce a inibire la crescita delle cellule tumorali esprimenti PD-L1, e diminuisce l'apoptosi dei linfociti T attivati, che hanno azione citotossica sulle cellule tumorali.

Se fosse stato utilizzato un anticorpo anti PD-1, anziché un anticorpo per il suo ligando, questa pubblicazione sarebbe stata sicuramente un'antioriorità invalidante il brevetto EP1537878 per mancanza di novità. Però, dal momento che la pubblicazione in questione riporta dati sperimentali che riguardano solo l'anticorpo anti-PD-L1, e non anti-PD-1, potrebbe non essere ritenuta sufficiente per dichiarare il brevetto EP1537878 non valido.

Il documento anticipa tuttavia il principio farmacologico alla base dell'effetto terapeutico rivendicato. Pertanto l'efficacia di questo documento contro la brevettabilità dell'invenzione di EP'878 non è in discussione.

### **3.6 Esame dell'attività inventiva**

Per esaminare il requisito dell'attività inventiva applicherò il principio del *problem solution approach*<sup>86</sup>, in primo luogo prendendo in considerazione come *closest prior art* il brevetto WO01/14557, e in secondo luogo l'articolo di Dong et al. (Giugno 2002).

---

<sup>86</sup> *Problem-solution approach*: si veda Capitolo II, paragrafo 2.3.

### 3.6.1 WO'557 come *closest prior art*

#### 1. Determinazione della *closest prior art*

Ammettendo che la novità di EP1537878 non sia pregiudicata da WO01/14557, quest'ultimo può essere identificato come arte anteriore più vicina al brevetto in esame, poiché è il documento anteriore che contiene il maggior numero di elementi corrispondenti a EP'878. Gli elementi che caratterizzano le rivendicazioni di EP'878 sono già citati nel paragrafo precedente.

#### 2. Individuazione del problema tecnico

Occorre dunque definire il problema tecnico che l'invenzione intendeva risolvere sulla base della differenza tra la *closest prior art* e l'invenzione del brevetto in esame.

In EP1537878, nella descrizione dell'arte anteriore, viene evidenziato che:

*“WO01/14557 descrive la fabbricazione di un anticorpo anti-PD-1 che inibisce l'interazione tra PD-L1 e PD-1 e discute anche del fatto che PD-1 possa essere implicato nell'immuno-evasione tumorale. Tuttavia, detta pubblicazione non dimostrerebbe né suggerirebbe esplicitamente l'efficacia di detto anticorpo contro tumori in vivo.”<sup>87</sup>*

In base a ciò, si può dedurre che il contributo aggiuntivo fornito da EP1537878 all'arte anteriore siano i risultati delle sperimentazioni condotte sul modello animale, che dovrebbero provare l'efficacia del trattamento antitumorale *in vivo*. I risultati sono descritti nei seguenti esempi di EP1537878:

-Esempio 13 (Si veda figura 6): dimostra che un anticorpo monoclonale anti-PD-1 sia in grado di provocare la soppressione delle metastasi di melanoma, precedentemente inoculato nel modello animale.

---

<sup>87</sup> EP15378787, pag. 4, righe 2-4, [0010].

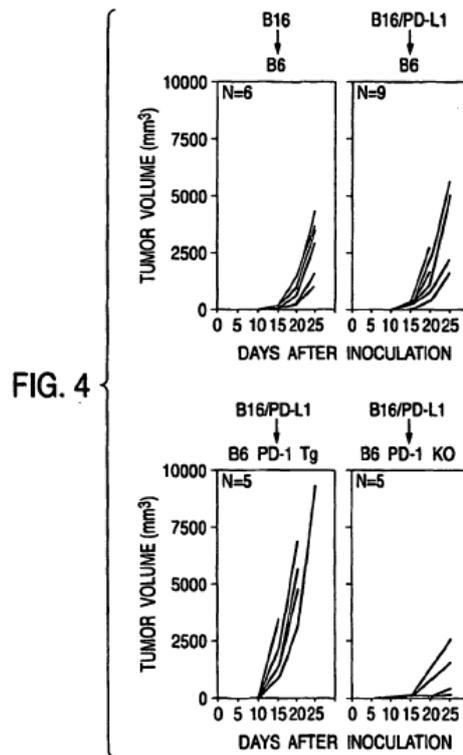
-Esempio 4 (Figure 14 e 15): vengono inoculate delle cellule di melanoma esprimenti PD-L1 in topi K.O.<sup>88</sup> per PD-1, e lo stesso viene fatto con dei topi che esprimono PD-1. Nel primo gruppo si nota una consistente inibizione della crescita tumorale, e ciò dimostra che in assenza dell'interazione PD-1/PD-L1, la crescita tumorale viene inibita.

**Figura 14- Esempio 4 del brevetto EP1537878.**

Example 4

[0101]  $1 \times 10^6$  of B16 melanomas (n=6) or B16/PD-L1 cells (n=6) were hypodermically transferred to B6 mice (n=6) respectively, and the same number of B16/PD-L1 cells were transferred to PD-1 transgenic B6 mice (n=5) and PD-1 gene homo-deficient B6 mice (PD-1<sup>-/-</sup> (n=4)) (Science(2001), vol. 291, issue5502, p.319-332.), each tumor growth was measured by 25 days thereafter. Figure.4 shows the result.

**Figura 15- Riporto la figura a cui è fatto riferimento nell' esempio 4 di EP1537878.**



<sup>88</sup> Topi *Knock Out*: topi che hanno subito una modificazione genetica a scopo di studio, che consiste nella soppressione dell'espressione di un gene (in questo caso, il gene codificante per il recettore PD-1).

-Esempio 5 (Figure 16 e 17): si utilizzano un gruppo di topi che esprimono PD-1, e un gruppo di topi in cui il gene codificante per PD-1 è stato rimosso. A entrambi vengono inoculate cellule di mieloma e il tumore viene completamente rigettato nei topi non esprimenti PD-1, mentre si sviluppa in topi che esprimono il PD-1, confermando il ruolo dell'interazione PD-1/PD-L1 nello sviluppo di un tumore. Inoltre, l'iniezione di un anticorpo anti PD-L1 nei topi esprimenti PD-1 inibisce la proliferazione tumorale. Ciò dimostra che utilizzando un anticorpo che lega PD-L1 e impedisce l'interazione con PD-1, si ottiene il silenziamento del segnale inibitorio PD-1/PD-L1, quindi la proliferazione delle cellule T (linfociti T citotossici) e di conseguenza l'inibizione dello sviluppo del tumore.

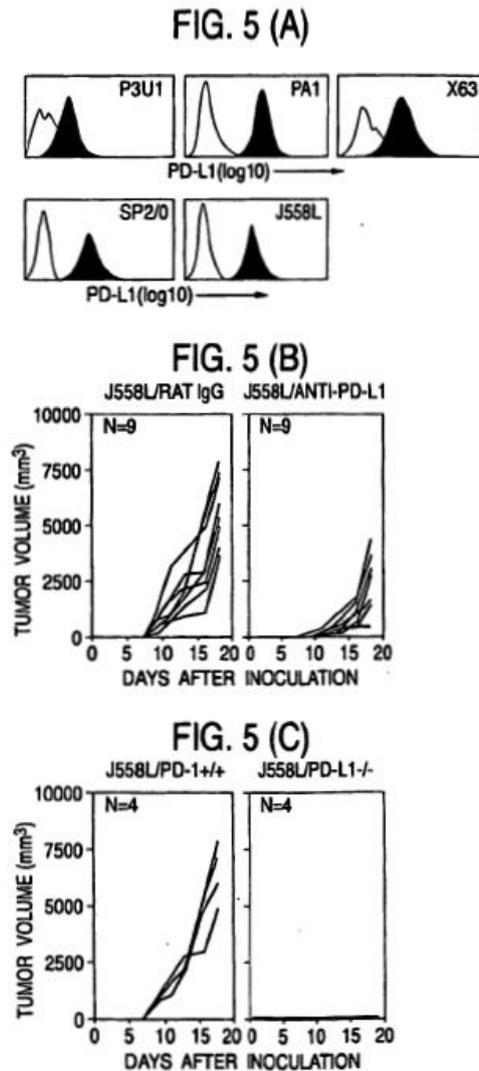
**Figura 16- Esempio 5 del brevetto EP1537878.**

Example 5

**[0102]** Tumor growth of which (n=9) anti-rat IgG or anti-PD-L1 F(ab')<sub>2</sub> IgG (0.1mg/mouse) was intraperitoneally administered to syngeneic Balb/C mice to which 2.5 × 10<sup>8</sup> of J558 myeloma cells had been hypodermically transferred on day 3,5, and 7 after the cell-transfer was evaluated. Each tumor growth in PD-1 gene homo-deficient Balb/C mice and Balb/C mice (n=4) to which J558 myeloma cells had been hypodermically transferred were compared (figure 5(B)).

**[0103]** Administration of anti-PD-L1 antibody suppressed PD-L1-expressing J558 carcinoma cells proliferation (flow cytometries of PD-L1 expression in various myeloma cell lines are shown in figure. 5(A))(figure.5(B)). The transplanted tumor cells proliferation was completely inhibited in PD-1-deficient mice to which J558 cells had been transplanted (figure. 5(c)). These results present that inhibition of PD-L1 or PD-1 is effective on cancer treatment.

Figura 17- Riporto la figura a cui si fa riferimento nell'esempio 5 di EP1537878.



Quando nella ricerca si vuole stabilire se un trattamento farmacologico è efficace, si può valutare un “*end point* primario”, o “*end-point* surrogato” (o secondario). L’*end-point* primario è il risultato terapeutico finale che viene valutato in conclusione di uno studio per stabilire se il trattamento farmacologico ha funzionato. Solitamente al principio dello studio si decide quale parametro utilizzare come *end-point* primario. Nel caso di un antitumorale, l’*end-point* primario può consistere, per esempio, nella diminuzione della massa tumorale, o un’inibizione della formazione di metastasi, o la scomparsa stessa del tumore, ecc. L’*end-point* primario per eccellenza è la diminuita mortalità.

A volte, per svariate ragioni, può essere necessario accontentarsi degli *end-point* surrogati, i quali vengono utilizzati, appunto, al posto degli *end-point* primari. Essi forniscono informazioni farmacologiche che sono correlate all'effetto che si desidera raggiungere con il trattamento farmacologico, ma non danno una dimostrazione diretta della sua efficacia.

La differenza tra la *closest prior art* ed EP1537878 consiste nell'aver confermato con un *end-point* primario un effetto terapeutico già dimostrato da *end-point* surrogati in WO'557 attraverso gli esempi 13, 4, e 5.

Per ottenere un *end-point* primario che sia significativo per dimostrare l'efficacia di un trattamento, è necessario che provenga da uno studio condotto *in vivo*. Nel caso di WO'557, l'unico esempio che dimostri l'azione dell'anticorpo anti-PD-1 *in vivo* è l'esempio 18.

Nell'esempio 18, tuttavia, è presentato un test in cui si utilizza un PD-L1 solubile<sup>89</sup> per inibire la trasmissione del segnale inibitorio di PD-1. Infatti il ligando del recettore PD-1 in forma solubile occupa il recettore, senza però innescare la trasmissione del segnale.

Il modello animale utilizzato è un modello di autoimmunità (EAE<sup>90</sup>), e il risultato dell'esperimento è un peggioramento dei sintomi autoimmunitari nel modello animale. Da ciò si deduce che PD-1 ha un'attività inibitoria sui linfociti T e il suo blocco provoca un aumento della risposta immune abnorme.

L'uso di un PD-L1 solubile provoca lo stesso effetto farmacologico che si avrebbe con un anticorpo anti-PD-1, che sta alla base dell'effetto terapeutico.

In base a queste informazioni si stabilisce che, per il trattamento antitumorale, può essere utile un aumento della risposta immune procurato nella stessa maniera, ovvero mediante l'anticorpo anti-PD-1.

---

<sup>89</sup> PD-L1 solubile: ligando di PD-1 in forma non legata alla superficie di una cellula, ma reso solubile. Esso è in grado di legare il recettore, ma non è in grado di provocarne l'attivazione. La ragione per cui non viene attivato il segnale è che l'ingombro sterico che si ha quando il ligando è presente sulla superficie della cellula e lega il recettore è diverso dall'ingombro sterico che si ha quando il ligando in forma solubile lega il recettore.

<sup>90</sup> Encefalomielite Autoimmune Sperimentale (*Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*). Si veda WO01/14557 esempio 18, paragrafo precedente.

Nel caso di uno studio sull'efficacia di un antitumorale che agisce attraverso un meccanismo di potenziamento della risposta immune contro il tumore, i risultati dimostrano che tale meccanismo abbia luogo, ma essendo stato condotto su un modello di autoimmunità, non rappresenta un *end-point* primario per il tumore, bensì surrogato.

### 3. Soluzione al problema tecnico

La soluzione proposta da EP1537878 è l'anticorpo anti-PD-1 secondo le rivendicazioni 1 e 3, o l'anticorpo umano anti-PD-1 secondo le rivendicazioni 2 e 4<sup>91</sup>, in grado di produrre un *end-point* primario *in vivo* nel trattamento dei tumori.

### 4. Il problema è stato risolto?

A questo punto, bisogna stabilire se il problema tecnico è stato veramente risolto, cioè se in EP'878 siano stati presentati dei risultati che dimostrino plausibilmente l'attività farmacologica. Gli esempi 13, 4 e 5 dovrebbero essere la prova dell'efficacia del trattamento *in vivo*.

Tuttavia, stando a quanto rivendicato in EP'878, l'anticorpo dovrebbe essere efficace nel trattamento di qualsiasi tipo di tumore, poiché nelle rivendicazioni non viene specificato alcun tipo di tumore in particolare.

Ricerche successive, tuttavia, hanno dimostrato che l'anticorpo anti-PD-1 non è attivo nel trattamento di tutti i tipi di tumore, ma solo alcuni.<sup>92</sup> Attraverso studi clinici condotti su pazienti trattati con l'anticorpo in questione, si scopre che non tutti i tipi di tumore rispondono al trattamento e che la presenza di uno dei ligandi di PD-1 sulle cellule tumorali, sebbene non sia assolutamente necessaria, sembra contribuire fortemente all'efficacia del trattamento. Non si hanno, invece, risultati sperimentali che dimostrino che l'anticorpo anti PD-1 possa essere efficace in tumori non esprimenti i ligandi di PD-1.

---

<sup>91</sup> Vedi paragrafo 4.2 "Presentazione del caso".

<sup>92</sup> S.L., Topalian, et al. "Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer" *The New England Journal of Medicine*, vol. 366, No. 26, pp. 2443-2454 (2012)

In EP1537878 stesso, si sottolinea l'importanza della presenza dei ligandi di PD-1 sulle cellule tumorali per l'efficacia della terapia anticancro, e il fatto che soltanto alcuni tipi di tumore si servano dell'interazione tra PD-1 e i suoi ligandi per indebolire la risposta immunitaria<sup>93</sup>. Infatti, nelle sperimentazioni effettuate sui modelli animali descritte in EP'878, ai topi vengono inoculate cellule di carcinoma esprimenti i ligandi PD-L1 o PD-L2 in maniera naturale o attraverso modificazione genetica.

Quando una rivendicazione comprende varie forme di realizzazione dell'invenzione, ciascuna di queste deve rappresentare una possibile soluzione al problema tecnico che ci si era proposti di risolvere. Se l'originalità dell'invenzione è correlata con un particolare effetto tecnico (terapeutico, in questo caso), non è ammissibile che alcune forme di realizzazione pur rivendicate non producano tale effetto tecnico, pertanto una mancanza di questo tipo significherebbe assenza di attività inventiva nel contenuto della rivendicazione. L'effetto tecnico innovativo in questo caso consiste nell'ottenimento di un *end-point* primario *in vivo*, e il fatto che il trattamento funzioni solo in certi casi, potrebbe essere invalidante per il requisito di attività inventiva.

5. Laddove la soluzione proposta sia in grado di risolvere il problema tecnico, detta soluzione era o non era ovvia per l'esperto del settore?

Se si ammette che il problema tecnico sia stato comunque risolto dall'invenzione, anche se non in tutte le sue forme di realizzazione, è necessario stabilire se la soluzione proposta era o non era ovvia.

Alla luce di quanto è descritto in WO01/14557, possiamo dire che al momento del deposito della priorità di EP1537878, era disponibile un insegnamento da WO'557 riguardante la teorica attività antitumorale *in vivo* di un anticorpo anti-

---

<sup>93</sup> “Si è pensato che un determinato tipo di tumore (...) potrebbe utilizzare tali molecole soppressive coniugate per intercettare l'attivazione e la proliferazione delle cellule T e indebolire la reazione immunitaria dell'ospite mediante un meccanismo diretto o indiretto (Cell (1992). Vol.71, issue7.p.1093-1102, Science (1993). Vol.259, issue5093, p.368-370.)” Si veda EP1537878, Descrizione [0009], righe 54-56.

PD-1, ma ciò non significa necessariamente che il brevetto non risponda al requisito di attività inventiva.

Per verificare se l'invenzione è inventiva o meno, è opportuno applicare il principio della *reasonable expectation of success*<sup>94</sup>.

L'esperto poteva ragionevolmente aspettarsi di risolvere il problema tecnico con successo seguendo i suggerimenti che gli vengono dati dall'arte anteriore, specialmente da WO'557?

Precedentemente il recettore PD-1 era sempre stato descritto come avente un'attività inibitoria sui linfociti T. Ai suoi ligandi, PD-L1 e PD-L2, era stata invece attribuita una doppia funzionalità: sia inibitoria, che co-stimolatoria dei linfociti T. Tale insegnamento è descritto da diversi ricercatori, per esempio Freeman (2000)<sup>95</sup>, Latchman (2001)<sup>96</sup>.

Era anche stato ipotizzato che questa doppia funzione fosse dovuta alla presenza di un secondo recettore<sup>97</sup> per i due ligandi, implicato nella stimolazione dei linfociti T.

Si pensava che PD-1 e il secondo recettore formassero una coppia di recettori "controregolatori", simile a CD28/CTLA4<sup>98</sup>, cioè una coppia di recettori affini allo stesso ligando, in cui l'attivazione di uno provoca la trasmissione di un segnale inibitorio (CTLA4), mentre l'attivazione dell'altro produce un segnale stimolante (CD28).

---

<sup>94</sup> Si veda Capitolo III, Paragrafo 3.3

<sup>95</sup> Freeman, G. J. et al. Engagement of the PD-1 immunohinibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* 192, 1027-1034 (2000)

<sup>96</sup> Y., Latchman, Y., Iwai, J., Brown, V., Boussiotis, B., Carreno, H., Nishimura, T., Okazaki, T., Honjo, A., Sharpe, G., Freeman, "PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation." *Nature Immunology* 2, 261-268, (2001)

<sup>97</sup> H., Dong, H., Tamura, F., Hirano, J., Lu, G., Zhu, K., Tamada, E., Celis, L., Chen, Tumor associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nature Medicine* 8, 793-800, (2002)

<sup>98</sup> CTLA4 e CD28 sono proteine di membrana espresse sulla superficie dei linfociti T, e funzionano da recettori per i ligandi della famiglia B-7 espressi sulla superficie delle APC. Il legame con un loro ligando attiva la trasmissione di segnali che, insieme ai segnali mediati dal recettore TCR, provocano l'aumento (CD28) o l'inibizione (CTLA4) della risposta immune mediata dai linfociti T.

Si era a conoscenza del fatto che molti tumori esprimessero sulla loro superficie i ligandi di PD-1 per sfuggire ai meccanismi di difesa immunitaria dell'organismo, per questo motivo il blocco dell'interazione ligando-recettore è stato visto come un possibile target farmacologico per ottenere un aumento della risposta immunitaria contro le cellule tumorali attraverso la *up-regulation* della proliferazione delle cellule T<sup>99</sup>.

Per quanto riguarda il recettore CTLA4, avente un'attività inibitoria presumibilmente analoga a PD-1, erano stati condotti degli studi che dimostravano che, in primo luogo, la somministrazione di un anticorpo anti-CTLA4 in un modello animale di autoimmunità (EAE) provocava un peggioramento della sintomatologia, confermando il fatto che la funzione di CTLA4 fosse quella di inibire la risposta immune mediata dai linfociti T. In secondo luogo, che l'iniezione di anticorpi anti-CTLA4 portava al rigetto del tumore esprime il ligando di CTLA4 (B7) che era stato trapiantato nei topi<sup>100</sup>.

Dal momento che PD-1 era visto come analogo di CTLA4 per la sua attività inibitoria, potrebbe essere stato logico aspettarsi che gli esperimenti condotti su PD-1 avrebbero avuto lo stesso successo di quelli fatti su CTLA4.

Gli esperimenti su CTLA4 precedentemente descritti sono simili a quelli riportati negli esempi 17 e 18 di WO01/14557, nei quali si studia PD-1, invece che CTLA4.

Al fine di trovare un modo per contrastare i meccanismi di immunoevasione tumorale, gli esempi 17 e 18 forniscono un *end-point* secondario, che dimostra l'*up-regulation* della proliferazione dei linfociti T attraverso l'inibizione dell'interazione tra PD-1 e i suoi ligandi. Il fatto che esistesse questo tipo di meccanismo e che esso fosse coinvolto nell'inibizione della crescita tumorale, era ben noto dalle ricerche condotte su CTLA4, recettore analogo a PD-1.

---

<sup>99</sup> Y., Latchman, Y., Iwai, J., Brown, V., Boussiotis, B., Carreno, H., Nishimura, T., Okazaki, T., Honjo, A., Sharpe, G., Freeman, PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature Immunology* 2, 261-268, (2001)

<sup>100</sup> P., James, J. P., Allison, V. E., Andrea, K., Eugene, S., Timothy, F., Barbara, G., Norman, CTLA4 Blockade in Tumor Immunotherapy, *Principle and Practice of the Biologic Therapy of Cancer*, ( third edition ), Steven A. Rosenberg, M.D., Ph.D., Cap. 25, 890-895, (2000)

Inoltre, nella descrizione dell'invenzione di WO'557 troviamo un'affermazione che esplicitamente attribuisce a un anticorpo anti PD-1 una possibile utilità per potenziare la risposta immune:

“Ad esempio (...) un agente che inibisce l'interazione di B7-4<sup>101</sup> con un recettore inibitorio o un agente che inibisce la trasduzione di un segnale inibitorio tramite PD-1, ad es. un anticorpo non attivante contro PD-1, è terapeuticamente utile in situazioni in cui la regolazione incrementante dell'anticorpo e delle risposte cellulo-mediate (...) sarebbe benefica”<sup>102</sup>.

In considerazione del contenuto di WO'557 e di quanto dimostrato dagli studi su CTLA4 precedentemente menzionati, e dal momento che PD-1 era visto come analogo di CTLA4, si potrebbe concludere che l'esperto del settore avrebbe potuto avere una ragionevole aspettativa che un anticorpo anti-PD1 avrebbe esercitato una efficace attività antitumorale *in vivo*, almeno rispetto a quei tumori che esprimono sulla loro superficie il ligando PD-L1 o PD-L2.

Questo specifico punto è fortemente dibattuto di fronte a molti tribunali e corti di Paesi europei, investiti/e del compito di valutare la validità di EP'878.

### **3.6.2 H. Dong et al. (Giugno 2002) come *closest prior art*.**

#### 1. Determinazione della *closest prior art*

In alternativa a WO'557, l'articolo pubblicato da Dong et al. (2002)<sup>103</sup> potrebbe essere considerato come la tecnica anteriore più rilevante, poiché fornisce dati sperimentali *in vivo* che dimostrano che un anticorpo monoclonale contro PD-L1, quindi contro il ligando e non contro il recettore, inibisce la crescita di cellule

---

<sup>101</sup> B7-4= PD-L1

<sup>102</sup> WO01/14557, pag. 82, righe 19-23.

<sup>103</sup> H., Dong, H., Tamura, F., Hirano, J., Lu, G., Zhu, K., Tamada, E., Celis, L., Chen, Tumor associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. Nature Medicine 8, 793-800, (2002)

cancerose esprimenti PD-L1<sup>104</sup> attraverso il blocco dell'interazione tra PD-1 e PD-L1.

## 2. Individuazione del problema tecnico

Se tale pubblicazione rappresentasse la *closest prior art*, l'unica differenza rispetto a EP1537878 risiederebbe nel fatto che in quest'ultimo viene rivendicato un anticorpo anti PD-1 (recettore), anziché anti-PD-L1 (ligando).

Nella domanda di brevetto originale, che poi ha prodotto EP1537878, erano presenti ben 34 rivendicazioni, che poi si sono ridotte a 4 nel brevetto concesso. In queste rivendicazioni sono indicati come agenti inibitori dell'interazione tra PD-1 e PD-L1/PD-L2 i seguenti composti: anticorpo anti-PD-1, anticorpo anti-PD-L1, PD-1 solubile e PD-L1 solubile<sup>105</sup>.

Si potrebbe dedurre da ciò che non era riconosciuta alcuna differenza tra l'uso dell'anticorpo anti-PD-1 e dell'anticorpo anti-PD-L1. Essi sono considerati come aventi lo stesso effetto farmacologico, quindi l'uso di uno sarebbe equivalente all'uso dell'altro, e non sarebbe associato all'ottenimento di alcun effetto particolare.

Di conseguenza, il problema tecnico, inteso come differenza tra l'invenzione e la *closest prior art*, in questo caso consiste nell'ottenimento di un'alternativa all'anticorpo anti-PD-L1 per l'immunopotenziamento nella terapia antitumorale.

## 3. Soluzione al problema tecnico

La soluzione proposta da EP'878 è l'anticorpo diretto contro il recettore PD-1, come riportato nelle rivendicazioni 1 e 3<sup>106</sup>.

## 4. Il problema è stato risolto?

---

<sup>104</sup> Si veda paragrafo 3.5, Dong et al. (2002), Figura 13.

<sup>105</sup> Rivendicazione numero 8, domanda PCT WO2004/004771.

<sup>106</sup> Rivendicazioni di EP1537878: si veda paragrafo 3.2

Occorre dimostrare che l'anticorpo anti-PD-1, usato come alternativa all'anticorpo anti-PD-L1, abbia la stessa azione farmacologica. I seguenti esempi servono a tale scopo.

L'esempio 4 di EP'878<sup>107</sup> dimostra che, bloccando l'interazione tra PD-1 e PD-L1 per rimozione del gene che codifica per PD-1, si ottiene un'inibizione della crescita tumorale.

Nell'esempio 13<sup>108</sup>, attraverso una sperimentazione *in vivo*, viene provata l'efficacia di un anticorpo anti-PD-1 per la soppressione delle metastasi tumorali del modello animale, nel quale erano state precedentemente inoculate cellule di melanoma.

Pertanto, l'anticorpo anti-PD1 usato per l'immunopotenziamento nella terapia antitumorale, sembrerebbe una valida alternativa all'anticorpo anti-PD-L1.

#### 5.La soluzione era o non era ovvia per l'esperto?

Esistevano dei suggerimenti nello stato della tecnica che avrebbero portato alla scelta di un anticorpo anti recettore PD-1 come soluzione alternativa all'anticorpo anti ligando PD-L1?

La risposta sembrerebbe positiva, poiché i suggerimenti erano numerosi.

Va premesso che era chiaramente dimostrato il ruolo inibitorio di PD-1 sui linfociti T.

Inoltre, era già stato ipotizzato da Latchman (2001) che il blocco dell'interazione PD-1/PD-L poteva essere una buona strategia nel trattamento antitumorale, come riportato in figura 18. Era nota l'esistenza dei due ligandi, PD-L1 e PD-L2, da Latchman<sup>109</sup>.

---

<sup>107</sup> Si veda figura 14, paragrafo 3.6

<sup>108</sup> Si veda figura 6, paragrafo 3.2

<sup>109</sup> Y., Latchman, Y., Iwai, J., Brown, V., Boussiotis, B., Carreno, H., Nishimura, T., Okazaki, T., Honjo, A., Sharpe, G., Freeman, PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature Immunology* 2, 261-268, (2001) pag. 266, right hand column, bottom.

**Figura 18- Parte del testo dell'articolo in cui Latchman (2001) ipotizzò che il blocco dell'interazione tra PD-1 e PD-L poteva essere una possibile strategia terapeutica per stimolare l'immunità antitumorale.**

pathogenesis of human autoimmune disease. Because PD-L1 and PD-L2 can inhibit effector T cell proliferation and cytokine production, the PD-L-PD-1 pathway may be an attractive therapeutic target. Blocking the PD-1 pathway may enhance anti-tumor immunity, whereas stimulating this pathway may be useful for down-regulating ongoing immune responses in transplant rejection and autoimmune and allergic diseases.

Fonte: Latchman, Y., Iwai, Y., Brown, J., Boussiotis, V., Carreno, B., Nishimura, H., Okazaki, T., Honjo, T., Sharpe, A., Freeman, G., PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature Immunology* 2, 261-268, pag. 266 (sottolineature aggiunte)

Era anche stato provato che fosse più efficace, al fine di ostacolare il segnale inibitorio di PD-1, l'utilizzo di una miscela di anticorpi anti PD-L1 e anti-PD-L2, invece che l'utilizzo di un anticorpo diretto contro uno solo dei due ligandi<sup>110</sup>, cosa che dimostra l'attività complementare dei due ligandi. Era quindi prevedibile che un solo anticorpo contro un solo ligando non avrebbe potuto eliminare completamente il segnale inibitorio di PD-1, pertanto un'ovvia soluzione al problema tecnico di fornire un anticorpo alternativo per il trattamento del cancro, a questo punto, sarebbe potuta essere quella di scegliere un anticorpo diretto contro il recettore PD-1.

In questo modo si blocca in maniera più efficace il segnale inibitorio di PD-1, e l'effetto è ottenuto utilizzando un solo anticorpo. Oltretutto, in tale maniera non si interferirebbe con il presunto segnale co-stimolatorio dovuto all'interazione dei ligandi con un secondo recettore teorico, a cui era stata attribuita una funzione stimolatoria sui linfociti T.

Inoltre, in WO'557, esempio 17, l'anticorpo anti-PD-1 era risultato efficace nell'inibire la formazione del complesso ligando-recettore in un test *in vitro*. Nello stesso brevetto vengono anche descritti metodi per produrre un anticorpo anti PD-1 umano o umanizzato<sup>111</sup>.

---

<sup>110</sup> Brevetto internazionale WO02/00730 (Data di pubblicazione: 03.01.2002)

<sup>111</sup> WO01/14557, Esempi 9 e 10.

Ciò potrebbe suggerire come soluzione per risolvere il problema tecnico di fornire un anticorpo alternativo, quella di produrre un anticorpo che si leghi al recettore PD-1.

Per capire se l'invenzione di EP'878 sia dotata di attività inventiva, bisognerebbe stabilire se, alla luce degli insegnamenti dello stato della tecnica, l'esperto avesse una motivazione valida per passare dall'uso di un anticorpo anti-ligando, all'uso di un anticorpo anti-recettore, e se, così facendo, avrebbe potuto ragionevolmente aspettarsi un risultato positivo per la risoluzione del problema tecnico.

Quindi, si potrebbe concludere che l'invenzione rivendicata non soddisfi il requisito di attività inventiva rispetto a quanto già precedentemente descritto. Il punto è oggetto di discussione di fronte a molti tribunali e corti in vari Stati europei.

### **3.6.3 Documenti utilizzabili per contestare l'attività inventiva, nel caso un cui la priorità non fosse considerata valida.**

Nel paragrafo 4.3 è stata messa in discussione la validità della priorità di EP1537878. Se la priorità non fosse considerata valida, un ulteriore documento pubblicato nel settembre 2002 entrerebbe a far parte dello stato della tecnica e potrebbe essere pregiudizievole per l'attività inventiva del brevetto. Si tratta della seguente pubblicazione: Iwai, Y., Ishida, M., Tanaka, Y., Okazaki, T., Honjo, T., Minato, N., "*Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade.*" PNAS 99, 12293-12297, (Settembre 2002).

Nello studio di Iwai si descrive un possibile ruolo del *pathway* PD-1/PD-L1 nell'immunità tumorale e si ipotizza che il blocco di tale interazione possa rappresentare una valida strategia antitumorale. A supporto di ciò, viene riportata una sperimentazione *in vivo* in cui la somministrazione di un anticorpo anti-PD-L1 provoca una diminuzione della crescita tumorale nel modello animale. Ciò è

evidenziato nella figura 19, in cui sono riportati il titolo e l'abstract del suddetto articolo.

Anche in questo caso, come nello studio di Dong già discusso precedentemente, viene utilizzato un anticorpo diretto contro il ligando, e non contro il recettore. Tuttavia Iwai, a differenza di Dong, afferma esplicitamente che il potenziamento della risposta immune per il trattamento antitumorale sia dovuto al blocco dell'interazione PD-1/PD-L, senza lasciare dubbi a riguardo. A questo punto, di fronte al problema di trovare un anticorpo alternativo per inibire tale interazione, una soluzione adottabile da parte dell'esperto potrebbe essere quella di utilizzare un anticorpo diretto contro PD-1. Se tale soluzione dovesse essere giudicata ovvia, ciò renderebbe l'invenzione di EP1537878 priva di inventività.

Figura 19- Titolo e abstract dell'articolo di Iwai (Settembre 2002).

## Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade

Yoshiko Iwai\*<sup>†</sup>, Masayoshi Ishida\*\*<sup>‡§</sup>, Yoshimasa Tanaka\*<sup>§</sup>, Taku Okazaki\*, Tasuku Honjo\*, and Nagahiro Minato\*<sup>¶</sup>

\*Department of Medical Chemistry, Graduate School of Medicine, <sup>§</sup>Precursory Research for Embryonic Science and Technology (PRESTO), Japan Science and Technology Corporation, and <sup>†</sup>Department of Immunology and Cell Biology, Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Kyoto 606-8501, Japan

Contributed by Tasuku Honjo, August 1, 2002

PD-1 is a receptor of the Ig superfamily that negatively regulates T cell antigen receptor signaling by interacting with the specific ligands (PD-L) and is suggested to play a role in the maintenance of self-tolerance. In the present study, we examined possible roles of the PD-1/PD-L system in tumor immunity. Transgenic expression of PD-L1, one of the PD-Ls, in P815 tumor cells rendered them less susceptible to the specific T cell antigen receptor-mediated lysis by cytotoxic T cells *in vitro*, and markedly enhanced their tumorigenesis and invasiveness *in vivo* in the syngeneic hosts as compared with the parental tumor cells that lacked endogenous PD-L. Both effects could be reversed by anti-PD-L1 Ab. Survey of murine tumor lines revealed that all of the myeloma cell lines examined naturally expressed PD-L1. Growth of the myeloma cells in normal syngeneic mice was inhibited significantly albeit transiently by the administration of anti-PD-L1 Ab *in vivo* and was suppressed completely in the syngeneic PD-1-deficient mice. These results suggest that the expression of PD-L1 can serve as a potent mechanism for potentially immunogenic tumors to escape from host immune responses and that blockade of interaction between PD-1 and PD-L may provide a promising strategy for specific tumor immunotherapy.

CTLA-4 was indicated to augment the specific tumor immunity and to induce significant inhibition of tumors *in vivo* in a number of experimental murine models (13).

Unlike B7 molecules, PD-1 ligands (PD-Ls) are expressed on various nonlymphoid tissues in mouse such as heart, lung, liver, and kidney (5, 6). It is speculated that PD-Ls expressed on these vital tissues may function in part as "veto" molecules against the potentially autoreactive effector T cells (14). In this report, we explored the possibility for involvement of PD-1/PD-L system in tumor immunity by using experimental tumor models. We indicate that PD-L1 on inherently immunogenic tumor cells confers a potent escaping mechanism from the host T cell immunity and raise a possibility that blockade of PD-1-PD-L interaction may provide an effective approach for specific tumor immunotherapy.

### Materials and Methods

**Mice.** BALB/c, BALB/c nu/nu, DBA/2, and C57BL/6 (B6) mice were purchased from Japan Clea, Hamamatsu, Japan. PD-1-deficient mice that had been backcrossed with B6 or

Fonte: Iwai, Y., Ishida, M., Tanaka, Y., Okazaki, T., Honjo, T., Minato, N., Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. PNAS 99, 12293-12297, (2002), pag. 12293 (sottolineature aggiunte)

Infine, il brevetto WO02/079499, pubblicato il 10.10.2002, come già spiegato nel paragrafo riguardante la novità, è la continuazione di WO01/14557. In WO'499,

come in WO'557, sono presenti le prove sperimentali *in vitro* e *in vivo* che dimostrano l'*end-point* secondario per l'immunopotenziamento nella terapia antitumorale<sup>112</sup>. Oltre a ciò, WO'499 offre un insegnamento addizionale: viene esplicitamente affermato che un anticorpo anti PD-1 potrebbe essere utile per indurre un aumento della risposta immune nel trattamento di un individuo avente, o a rischio di, tumore<sup>113</sup>.

Se la prima priorità di EP1537878 non fosse considerata valida, WO02/079499 sarebbe pertanto compreso nello stato della tecnica ai sensi dell'art. 54 (2) EPC, e il suo insegnamento sarebbe compromettente per il requisito di attività inventiva di EP1537878.

---

<sup>112</sup> Si veda paragrafo 3.5

<sup>113</sup> Si veda figura 11, paragrafo 3.5

## **Conclusione**

Lo scopo della mia tesi è stato quello di illustrare le difficoltà che si incontrano nella valutazione di brevettabilità e di validità di brevetti farmaceutici. Attraverso il lavoro svolto, ho potuto constatare in che modo le conoscenze scientifiche specifiche di un determinato settore, in questo caso farmacologico e immunologico, possano trovare una collocazione e rilevanza in un ambito di natura legale, ovvero quello brevettistico.

Per esaminare i requisiti di brevettabilità di EP'878, in primo luogo è stato necessario un approfondimento degli argomenti di immunologia, che mi hanno permesso di comprendere i tanti aspetti scientifici riportati nel brevetto, in particolar modo di comprendere il lavoro sperimentale ivi descritto, i risultati di questo lavoro e soprattutto l'interpretazione farmacologica/terapeutica di tali risultati.

Su questa fase "tecnica" si è inserita la valutazione "legale" della sussistenza dei requisiti di brevettabilità stabiliti dalla legge.

Ciò rappresenta una conferma del fatto che il lavoro in ambito brevettuale implica varie sovrapposte e approfondite competenze, vale a dire: legale, scientifica e non ultima linguistica; a maggior ragione, in settori delicati come quello farmaceutico e biotecnologico.

Come sopra discusso, nello studio ma me seguito si è presentata la necessità di valutare i seguenti aspetti: la validità della priorità del brevetto in oggetto, la novità, l'inventività e la sufficienza di descrizione delle applicazioni terapeutiche degli anticorpi anti -PD-1 oggetto di protezione brevettuale.

Ebbene, per queste valutazioni è stato necessario capire chi era l'esperto del settore (un immunologo, un oncologo, un team di vari specialisti), quale era il suo bagaglio di conoscenze scientifiche, come risultanti dalla documentazione

rintracciabile in letteratura, alla data di priorità del brevetto (2002), come l'esperto avrebbe letto gli insegnamenti scientifici ed interpretato i risultati sperimentali *in vitro* e su modello animale già presenti nell'arte anteriore. Solo calandosi in quel contesto tecnico si potrà dare successiva risposta "legale" ai vari quesiti sulla validità del brevetto.

Su questo brevetto già esistono varie cause di fronte ad organi giudicanti nazionali ed internazionali con alcuni giudizi preliminari e contraddittori (EPO, Tribunale inglese, Tribunale francese), ma una parola definitiva sulla validità o invalidità del brevetto non è stata ancora pronunciata, pertanto non mi è possibile affermare con certezza quale sarà l'esito della controversia, ed ogni valutazione conclusiva è rimandata ad una data futura.

Resta pertanto il rammarico di non aver avuto a disposizione per la mia tesi un periodo sufficientemente lungo per testimoniare una parola finale.

Tuttavia, quello che posso da subito concludere, senza ombra di dubbio, è che la professione del consulente brevettuale non è affatto un'attività confinata nel settore meramente "amministrativo", come molti potrebbero ritenere, ma al contrario è un'attività che pone il professionista a contatto con la ricerca scientifica più avanzata, i cui risultati vengono poi calati dal consulente nel contesto dalla giurisprudenza più avanzata sul tema della proprietà industriale.

## BIBLIOGRAFIA

- Agata, Y., Kawasaki, A., Nishimura, H., Ishida, Y., Tsubata, T., Yagita, H., Honjo, T., "Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes" *International Immunology*, Vol. 8, No. 5, pp. 765-772 (1996)
- Dong, H., Tamura, H., Hirano, F., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., Celis, E., Chen, L., Tumor associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nature Medicine* 8, 793-800, (2002)
- Freeman, G. J. et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* 192, 1027-1034 (2000)
- Galli, C., Gambino, A.M., "*Codice commentato della proprietà industriale*", UTET-Unione Tipografico-Editrice Torinese, 2011
- Iwai, Y., Ishida, M., Tanaka, Y., Okazaki, T., Honjo, T., Minato, N., Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *PNAS* 99, 12293-12297, (2002)
- James, P., Allison, J. P., Andrea, V. E., Eugene, K., Timothy, S., Barbara, F., Norman, G., CTLA4 Blockade in Tumor Immunotherapy, *Principle and Practice of the Biologic Therapy of Cancer*, (third edition), Steven A. Rosenberg, M.D., Ph.D., Cap. 25, 890-895, (2000)
- Latchman, Y., Iwai, Y., Brown, J., Boussiotis, V., Carreno, B., Nishimura, H., Okazaki, T., Honjo, T., Sharpe, A., Freeman, G., PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature Immunology* 2, 261-268, (2001)
- M. Ghiotto et al., *International Immunology*, Vol.22, No. 8, pp. 651-660 (2010)
- Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N. & Honjo, Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 11, 141-151 (1999)
- Nishimura, H., Minato, N., Nakano, T., Honjo, T., Immunological studies on PD-1-deficient mice: implication of PD-1 as a negative regulator for B cell responses. *Int. Immunology* 10, 1563-1572, (1998)
- P. Rampinelli, lezioni di *Socioeconomia e brevettistica farmaceutiche*, Cap.1, Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie, Università di Bologna, Bologna, A.A. 2014-2015

The European Patent Office “*European Patent Convention*” ( fourteenth edition ) 2010.

The European Patent Office “*Guidelines for Examination in the European Patent Office*” ( edition June 2012 ).

Topalian, S.L., et al. “Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer” *The New England Journal of Medicine*, vol. 366, No. 26, pp. 2443-2454 (2012)

Vanzetti, A., “*Codice della proprietà Industriale*” Giuffrè Editore, 2013

Visser, D., “ *The annotated European Patent Convention* ” ( seventeenth revised edition ) H. Tel, Publisher , 2010.

Zimmer, F.J., Zeman, S.M., Hammer, J., Goldbach, K., Allekotte, B., “*Protecting and Enforcing Life Science Inventions in Europe*” (second edition), C.H. Beck oHG, 2015

## **BANCHE DATI**

ESPACENET – European Patent Office  
< [www.epo.org/ searching/free/espacenet.html](http://www.epo.org/searching/free/espacenet.html) >

UIBM - Ufficio Italiano brevetti e marchi  
< [www.uibm.gov/ depositi nazionali- e- banche dati/.it](http://www.uibm.gov/depositi_nazionali_e_banche_dati.it) >

USPTO – United States Patent and Trademark Office  
< [www.uspto.gov/ search for patent.html](http://www.uspto.gov/search_for_patent.html)>

## Ringraziamenti

Prima di tutti, vorrei ringraziare la prof.ssa Rampinelli, per avermi trasmesso l'interesse per una materia per me completamente nuova, stimolando la mia curiosità a riguardo, per essere stata presente e per avermi seguita e aiutata durante la preparazione della tesi.

Vorrei ringraziare il dott. Claudio Germinario, senza il quale non sarebbe stato possibile realizzare questo lavoro, per il tempo che mi ha dedicato, per aver colto e alimentato il mio interesse, e per i suoi preziosi consigli. Sono estremamente grata per tutto ciò che ho avuto la possibilità di imparare sotto la sua guida, e che custodirò con orgoglio.

Ringrazio tantissimo Paolo, che con pazienza mi ha saputo dare le dritte giuste per venirne a capo, quando annegavo tra le Convenzioni Europee e i Codici della Proprietà Industriale.

Grazie Valentina, Giuseppe, Sara, Roberto, Stefano e tutto il personale della SIB.

Grazie a Bea e Fede, le mie migliori compagne di tirocinio, e grazie a tutti farmacisti del Sant'Orsola. Cercherò di portare con me tutti gli insegnamenti che ho ricevuto da ognuno di voi.

Ringrazio con tutto il cuore la mia famiglia.

Grazie ai miei fratelli, le mie persone preferite in assoluto. Grazie Elena, per l'energia e la gioia che mi porti. Nonostante tu sia dall'altra parte del mondo adesso (pensando intensamente a me, mi auguro!!), riesci a essermi vicina sempre. Mia sorella, mia anima, mio sangue.

Grazie al mio fratellino (ino?) Luca per la tua forza, per la serenità con cui mi fai guardare le cose e perché mi fai ricca.

Grazie ai miei genitori, per aver sempre creduto in me. Grazie mamma perché mi accompagni in ogni momento, bello o brutto che sia. Mi ascolti, mi sproni, mi

insegni. Mi rendi cosciente della mia fortuna. Mi aiuti a non perdere di vista il cuore.

Grazie papà per avermi sempre sostenuta. Il tuo aiuto e la tua pazienza sono stati fondamentali, in generale e soprattutto negli ultimi mesi. Spero di diventare brava almeno quanto te!

Grazie ai miei cuginetti bellissimi, Antonio e Martina, vi meritate il meglio!

Grazie zio Michi, per le risate che riesci sempre a strapparmi. Sei il matto numero uno, in questa famiglia di matti.

Grazie nonna Angela, che mi insegni ad essere fiera di me e a tirare fuori gli artigli quando è il momento. Grazie nonno Tonino per le tue storie, le tue canzoni, le chiacchierate. So che sei fiero di me, nonostante tutta questa “ferraglia”.

Grazie Enri, il cugino più carico del mondo!

Un immenso grazie alla mia Famiglia Bolognese per aver reso questi anni davvero incredibili. Senza di voi non avrei avuto la forza di affrontare certi esami!

Enrico, che ci hai campati come una mamma, per le mille serate passate a suonare e cantare, perché riesci sempre a sdrammatizzare con la tua ironia, e per avermi compresa negli scleri dello studio e dell’insonnia. Capone, per le innumerevoli chiacchierate, per la spensieratezza, per le tue idee bizzarre, le tue metafore improbabili e per il tuo modo di prenderti cura di ciò che ti sta a cuore. Giulia, perché, con la vitalità di un uragano, mi hai fatto passare momenti divertenti da morire, e perché mi hai insegnato a riconoscere i “piombi” e allontanarli (o almeno ci sto lavorando), e per la sensibilità di cui sei capace. Laura, perché porti sempre allegria, e anche un po’ di ordine, tra questi sbandati, e per la determinazione e positività con cui affronti le cose. Massi, per le infinite risate, per i tuoi consigli, la tua gentilezza e tuo entusiasmo.

Grazie Matteo, Alex, Prof, Alessandro, Roberto, Claudia, Novella.

Ringrazio anche mi querida Familia Erasmus per l’anno indimenticabile passato insieme, e tutto ciò che abbiamo condiviso. Vedersi è sempre più difficile, ma quando succede è sempre come se il tempo non fosse passato! Grazie Giulia, Marzia, Miche, Kuman, Benni, Nour, Daniel, Patrizi.

Sexy e mamma Marzia, la vostra amicizia è per me uno dei regali più belli dell'Erasmus. Grazie per avermi ascoltata e incoraggiata quando ne avevo bisogno. So di poter contare sempre su di voi e sulla vostra carica! Grazie anche per le serate passate a ripetere farmacologia...!

Benni!! Grazie per la tua positività e il tuo entusiasmo! Chissà cosa ci aspetta... :)

Grazie Aurora per le serate pazzesche, i festival, e i viaggi indimenticabili!

...Farmacologia!

Riesci sempre a farmi ridere delle assurdità del mondo e della gente!

*“Las piedras rodando se encuentran,  
y tu y yo algún día nos habremos que encontrar.*

*Mientras tanto cuidate, y que te bendiga Diós.*

*No hagas nada malo que no hiciera yo.”*

Grazie alle mie amiche di sempre! L'amicizia, se è vera, resiste a qualsiasi cosa...vero Saruz? Grazie per esserci sempre, grazie per l'allegria e l'ottimismo.

Grazie Desa perché sei sempre pronta ad ascoltarmi e darmi consigli sinceri e maturi. Grazie per le patatine di notte, le torte, i narghilè, ecc. ecc.

Grazie Debby (F.) per tutte le esperienze che abbiamo vissuto insieme. Con te sono cresciuta davvero! Sei fortissima!!

Grazie Debby (L.) perché ogni volta che torno a casa mi proponi mille cose e cerchi di fare in modo che stare a Merano sia un po' meno noioso! Perché sei sempre pronta a fare cose cose pазze, ma allo stesso tempo hai i piedi per terra e la testa sulle spalle.

Grazie Angi e Hajar per la vostra inesauribile caricanza!! Siete sempre a mille!!

Grazie Piccola Amica Nera per la tua forza, la tua dolcezza e la tua voglia di goderti le cose belle.

Un grazie va anche a Nicol! Grazie “vecchia” per essere stata la migliore compagna di banco che potessi avere! E grazie per avermi mostrato come si vive nella bellissima Capitale.

Grazie tottolo, quando per misteriose coincidenze astrali ci troviamo entrambi nella nostra terra natale, è sempre bello vederti!

Vic!!! Grazie per tutto! Non so come avrei fatto senza di te, senza le nostre chiacchierate, cene, pranzi, serate, passeggiate, fare niente, portami in ospedale, aggiustami il pc, come devo fare, dove devo andare, ti vengo a prendere, ti chiamo, ti aspetto, sei sveglio?, reggaeton!, tortellini, pollame...insomma, troppe cose! Grazie.

*Asi que agarra tu maleta, el bulto, los motetes*

*El equipaje, tu valija, la mochila con todos tus juguetes*

*y dame la mano y vamos a darle la vuelta al mundo!*

Grazie alle mie coinquiline Stefania e Martina, su cui posso sempre contare.

Ultimamente tra i nostri vagabondaggi ci vediamo poco, ma è sempre bello per me tornare a casa!

E grazie Giulio, il migliore padrone di casa di sempre!

Grazie alle mie fantastiche coinquiline romane: Rosa Maria, Ele, Marilina, Daniela. La mia esperienza romana non sarebbe stata la stessa senza di voi! E grazie alla mia personal shopper Rosa Maria!

Ringrazio il team Stefani e tutte le persone con cui ho condiviso la mia grande passione, che senza dubbio mi ha aiutata ad andare "Sempre Avanti", fino alla fine, tenendo alta la guardia, nonostante la stanchezza e il dolore.

Grazie Richi, Rocco, le bestioline, Jack, Dome, Ari, e tutti quanti.

Grazie al team superamento, che mi ha accolta come a casa! Antonio, Marco, Lucrezia, Gaia, Carlotta, Flavia, Davide, Andrea, Elena, Alessia, Susanna, e tutti quanti. Siete davvero una squadra, altro che sport individuale! PS: Viva le Arrogants!

Grazie Dilo, compagno di viaggio. Leo, per il buonumore che mi metti. Ferro e Iko, sempre carichissimi!

Grazie Batman, sempre pronto a salvarmi!

Mazzy, per tutti i nostri martedì! Dopo tutti ringraziamenti sui cd, finalmente posso ringraziarti anche io.

Pappa, per le lunghe chiacchierate e le belle serate insieme.

Richi, per le consulenze filosofiche, psicologiche, ecc.

Chicco, che bello ritrovarti in giro per il mondo!

Piero, perché hai sempre mille idee, anche se tutti te le bocciano, e per avermi incoraggiato nei momenti giusti.

Anit, l'uomo che fa mille cose! Lorenzo, compagno di brevettistica! Cogni, che sei uno dei pochi a chiamarmi ancora Fetu. Chema, perché...ci sei!!

Grazie a tutti i membri della Sevenaus!!

Dome, perché cammina cammina, ci ritroviamo in capo al mondo. O forse ci fermiamo al Boteco, va bene uguale.

Grazie Frunz e Robi, i miei più cari e vecchi amici, quelli che non te li vuoi scollare mai.