



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PCT

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

03-75597

21 EXPEDIENTE N°

54 TITULO "VACUNA"

51 CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C12N 15/24 , A 61 K 39/00 , C07 K 4/47

71 SOLICITANTE GLAXO GROUP LIMITED

DOMICILIO MIDDLESEX, INGLATERRA

74 REPRESENTANTE LEGAL JOSE ANTONIO LLOREDA

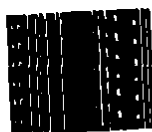
22 BOGOTA, D C 1 SEP 2003

T P 10 784
Código 231

OT

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



03 075597 00

FORMULARIO UNICO DE S
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

Enmendado: SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación: 03075597 00000000
Fecha (MD): 2003-09-01 16 47 15
011 PCT-PATENT 378 FASE NACI 411 PRESENTAC
2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

①

SOLICITUD DE



Patente de Invención



Patente de Modelo de Utilidad



Capítulo I



Capítulo II

②

SOLICITANTE
(71)

Nombre **GLAXO GROUP LIMITED**

Dirección Glaxo Wellcome House Berkeley
Avenue, Greenford Middlesex UB8 0NN
Inglaterra

Nacionalidad o Domicilio Middlesex
Inglaterra

Lugar de Constitución Inglaterra

Teléfono 3264270 Fax 6069701

E-mail jllico@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C C



NIT



C E



Otro



Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre **JOSE ANTONIO LLOREDA**

Dirección Calle 72 No 5-83 Piso 5º
Bogotá- Colombia

Teléfono 3264270 Fax 6069701

E-mail jllico@lloredacamacho.com

C C



NIT



C E



Otro



Cual _____

Número 17 159 881TP 10 784

④

INVENTOR(ES)
(72)

Nombre **ASHMAN Claire CROWE James Scott ELLIS Jonathan, Henry y LEWIS, Alan, Peter**

Dirección GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage Hertfordshire SG1 2NY
GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road Stevenage Hertfordshire SG1 2NY
GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road Stevenage Hertfordshire SG1 2NY
GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road Stevenage Hertfordshire SG1 2NY
Inglaterra

Nacionalidad o Domicilio Inglaterra

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No PCT/GB02/00900Fecha 01/03/02Publicación Internacional No WO 02/070711 A1Fecha 12/09/02

⑥

Folio 175
Título (54) **"VACUNA"**

⑦

Clasificación Internacional (51) C12N 15/24, A61K 39/00, C07K 14/47, 14/54

⑧

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI



NO



GB

03/03/01

0105380 2

⑨

Comprobante de Pago No 03 - 57 900Fecha 19-08-03

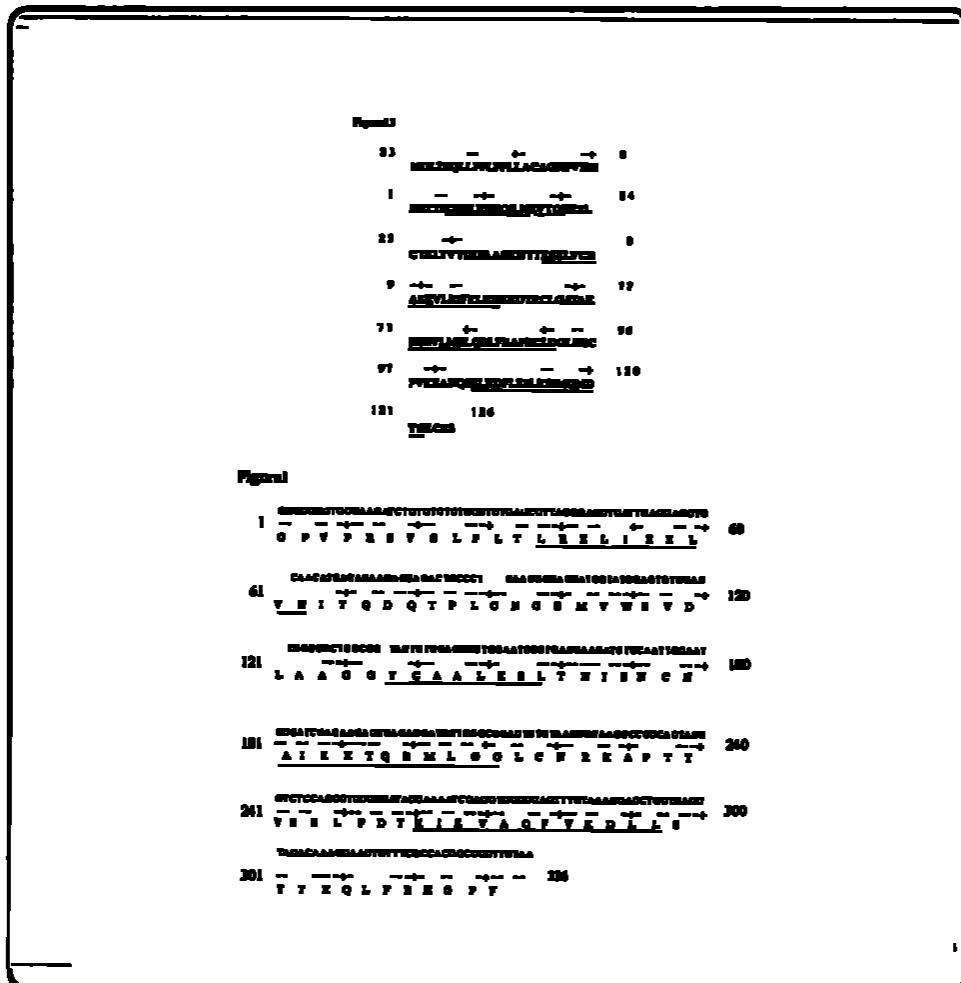
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☒ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Documento de Representación Legal
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud Internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud Internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA)
- ☒ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☒ Arte Final 12X12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☒ Otros Reporte de Búsqueda Internacional con su traducción, Publicación con su traducción, dibujos y Capítulo Reivindicatorio como fue inicialmente presentado en Fase Internacional junto con su traducción

11

FIGURA CARACTERISTICA.



12

Solicito la concesión de la patente:

NOMBRE: JOSE ANTONIO LOREDA

FIRMA:

C.C. 17.159.881 B. T.P. 30.784

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 03073397 00000000
Fecha (AND): 2003-09-01 16:47 15 Folios 168
Tramite 011 PCT-PATENT 378 FASE INCI 411 PRESENTAC
Dependencia 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 03 - 57 900
FECHA AGOSTO 19 DE 2003

***** CONSIGNACION *****

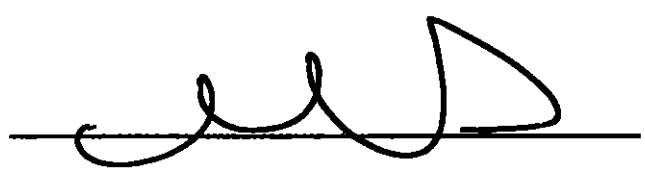
DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No PAGO	FECHA PGO	Vr PAGO
LLOREDA Y CIA S A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	17323313	19/08/2003	9 264 000 00

***** CONCEPTO *****

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL DE PATENTE DE IN	400 000 00
		TOTAL	\$ 400 000 00

SON CUATROCIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE



RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No _____

TRADUCCION OFICIAL No 425

LEGALIZACION DE UN DOCUMENTO PRESENTADO SIMULTANEAMENTE EN
INGLES Y ESPAÑOL PODER DE REPRESENTACION LEGAL OTORGADO A
JOSE ANTONIO LLORED A Y/O GUSTAVO TAMAYO Y/O ANGELA MARIA
RESTREPO Y/O ALICIA LLORED A Y/O JOSE LLORED A CAMACHO POR
GLAXO GROUP LIMITED

PODER

Firmado **Graham Brereton**

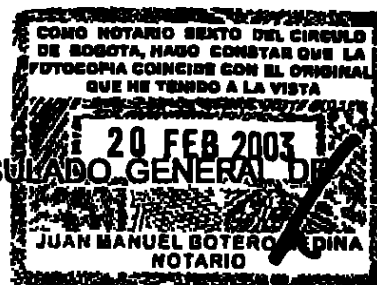
CERTIFICADO NOTARIAL EN ESPAÑOL, EXPEDIDO POR DE PINNA, DADO
EN LONDRES, EL 22 DE ENERO DE 2001

Firmado **John David Woodward**

CERTIFICACION EN ESPAÑOL No 01/0197 DEL CONSULADO GENERAL DE
COLOMBIA EN LONDRES

Fecha **Enero 24, 2001**

Firmado **JAIRO E BERRIO VILLARREAL**
Cónsul General



[Handwritten signature]
NATIA SALAS...
INSE...
RES...

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

CERTIFICA la firma y las funciones del funcionario consular Jairo Berrio, bajo el numero 311039, el dia Febrero 8 del 2001

Firmado (Firma ilegible)
Jefe de Legalizaciones
Santafé de Bogotá, D C

Kella
LAVIA SALAMARCA DE ALBEN
TRADUCTORA OFICIAL
DEL MINISTERO 1288

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
RESPONSABLE DEL CIRCULO
BOGOTA 19 A-44 ST
Bozano
JEF. DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
Katja
409576
Bozano
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES DE

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
20 FEB 2003
JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO



CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA

3RD FLOOR 15 19 GREAT TITCHFIELD STREET LONDON W1W 8HZ
TELEPHONE 020 7837 9893 TELEFAX 020 7837 9004
E-MAIL CONSULCO@CONSULCO DEMON CO UK

5

El suscrito Cónsul General de Colombia en Londres, vistos los documentos presentados ante este despacho,

CERTIFICA.

Que el Señor JOHN DAVID WOODWARD, quien autenticó el documento precedente, ejercía en la fecha las funciones de Notario Público de Londres, Reino Unido de la Gran Bretaña, y su firma se encuentra registrada en este Consulado General.

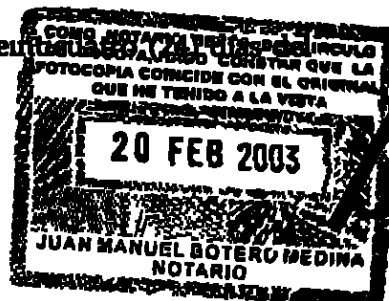
Que GLAXO GROUP LIMITED es una Sociedad debidamente constituida, organizada y existente en Inglaterra y que cumple con su objeto social de acuerdo con las leyes de este país.

Que el Señor GRAHAM GEORGE BRERETON, en su calidad de Apoderado de la mencionada Sociedad, otorga el Poder precedente y su firma ha sido autenticada por el Notario JOHN DAVID WOODWARD

El Cónsul General no asume responsabilidad por el mencionado documento

Dado en Londres, Reino Unido de la Gran Bretaña, a los veintinueve (29) días del mes de enero del año dos mil uno (2001)

Certificación No 01/0197
Derechos US\$106 00, CANCELADOS.



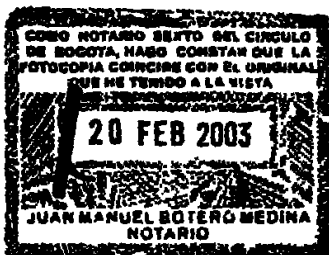

JAIRO E. BERRIO VILLARREAL
Cónsul General

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

Jairo Pardo
311039
COTA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENHA
LAS FUNCIONES 13 DEC 87 H.

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2001 FEB -8- 12:42
[Signature]
H.P. DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTÁ D.C.



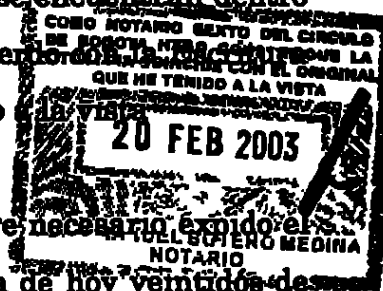
Yo, el infrascrito, JOHN DAVID WOODWARD, Notario Publico de la Ciudad de Londres, Inglaterra, por la Autoridad Real debidamente admitido y juramentado,

CERTIFICO

QUE es auténtica la firma suscrita al pie del adjunto Poder, por ser del puño y letra del Señor Don GRAHAM GEORGE BRERETON, cuya identidad me consta, Apoderado de la Sociedad inglesa denominada "GLAXO GROUP LIMITED", Sociedad legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes de Inglaterra, e inscrita en la Oficina de Registro de Sociedades bajo el número 305979, con domicilio social en Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue, Greenford, Middlesex UB6 ONN, Inglaterra, estando dicho Señor en su citado caracter debidamente autorizado para firmar documentos de esta clase en nombre y representacion de dicha Sociedad en virtud de un Poder otorgado en su favor por la referida Sociedad fechado 12 de julio de 1996, una copia del cual he tenido a la vista,

Y QUE los objetos para los cuales se otorgó dicho Poder se encuentran dentro de los objetos o actividades de la citada Sociedad, de acuerdo con la Constitutiva y los Estatutos Sociales, los cuales he tenido a la vista

Y PARA QUE CONSTE donde y como convenga y fuere necesario, expido el presente Certificado que firmo y sello en Londres, el día de hoy veintidós de enero del año dos mil uno



John David Woodward
Notary

N

NOTARY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE

Se retiran folios:

- 8 Sobre con arte final
- 9 Extracto de publicación
- 10 Ficha tematica
- 11 Ficha de autor

24 01 2003 *Nunfuent*
202052

12
8

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL		Solicitud Internacional No. PCT/GB 02/00900
A CLASIFICACION DE MATERIA IPC 7 C12N15/24 C07K14/47 C07K14/54 A61K39/00 Según la Clasificación de Patentes Internacional (CPI) o según la clasificación nacional y la CPI		
B CAMPOS BUSCADOS		
Documentación mínima buscada (sistema de clasificación segundo de símbolos de clasificación) IPC 7 C12N C07K		
Documentación buscada fuera de documentación mínima hasta donde dichos documentos se incluyan en los campos buscados		
Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y donde sea práctico, buscar términos usados) EPO-Internacional,, BIOSIS, BIOTECHNOGY ABS, CHEM ABS Dato, SEQUENCE SEARCH, EMBASE, LIFESCIENCES, MEDLINE, PAJ, SCIDEARCH, WPI Dato		
C DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Citación de documento, con indicación donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	W0 96 04306 A (SCHERING CORP) 15 de Febrero de 1996 (1996-02-15) todo el documento reivindicación 12	6-12, 21-24
X	--- MICKENZIE A N J ET AL "Comparación estructural y localización cromosomática del humano y genes de ratón iL-13" JOURNAL OF IMMUNOLOGY THE WILLIAMS AND WILKINS CO BALTIMORE, US, vol 150, No 12, 15 de Junio de 1993 (1993-06-15), páginas 5436-5444, XP002176473 ISSN 0022-1767 figura 2 --- -/--	6-16
☒ En el recuadro C se enumeran más documentos.		☒ En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes.
* Categorías especiales de documentos citados A documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera de relevancia particular E documento anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional L documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra citación u otra razón especial (según se especifica) 'O' documento que se refiere a una revelación oral uso, exhibición u otros medios 'P' documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada 'T' documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invención 'X' documento de relevancia particular la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo 'Y' documento de relevancia particular la invención reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más documentos siendo dicha combinación obvia para una persona experta en la técnica '&' documento miembro de la misma familia de patentes		
Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional 14 de Mayo de 2002		Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional 04/06/ 2002
Nombre y dirección de correo de ISA European Patent Office P B 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel No (+31 70) 340-2040 Tx 31 651 epo nl, Fax No. (+31 70) 340-3016		Funcionario autorizado Pilat, D

13
9

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/GB 02/00900

C (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	BUIJKAMP JOHANNES ET AL "El gen interleucina -13 de ganado vacuno, organización genómica, localización cromosomal, y evolución del promotor" INMUNOGENETICS, vol 49, No 10, 1999, páginas 872-878, XP002198871 ISSN 0093-7711 todo el documento	6-11, 13-18, 21-24
X	HEINZMANN A ET AL "Variantes genéticas del IL-13 señalizado y asma y atopia humana" IL-13 HUMAN MOLECULAR GENETICS, vol 9, No 4, 1 de Marzo de 2000 (2000-03-01), páginas 549-559, XP002198872 ISSN 0964-6906 todo el documento	6-8, 13-18, 21-24
X	EP 0 759 468 A (VIRBAC LAB) 26 de Febrero de 1997 (1997-02-26) reivindicaciones, figura 2	6-8, 13-18,21
Y	página 6, línea 11 - línea 15	19,20
Y	W0 96 02555 A (UNIV IOWA RES FOUND) 1 de Febrero de 1996 (1996-02-01) citado en la solicitud todo el documento	19,20
X	W0 93 10235 A (SEBALD WALTER) 27 de Mayo de 1993 (1993-05-27) reivindicaciones	6-8, 13-18,21
X	EP 0 911 401 A (BAYER AG) 28 de Abril de 1999 (1999-04-28) reivindicaciones, tablas 1,2	6-8, 13-18,21
X	W0 00 78334 A (LIM SIEW PHENG, TAN YIN HWEE (SG), INST OF MOLECUL & CELL BIOLOGY) 28 de Diciembre de 2000 (2000-12-28) todo el documento	6-8, 13-18,21
X	W0 96 04388 A (BROWNE MICHAEL JOSEPH, CHAPMAN CONRAD GERALD (GB), CLINKENBEARD HE) 15 de Febrero de 1996 (1996-02-15) reivindicaciones, ejemplos	6-8, 13-18,21
A	W0 97 40149 A (BOOTS ANNA MARIA HELENA, AKZO NOBEL VN (NL), BOS EBO SYBREN (NL), 30 de Octubre de 1997 (1997-10-30) todo el documento	6-8, 13-18,21
	-/-	

14
10

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/GB 02/00900

C (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
A	W0 99 46992 A (GREGORY RICHARD J, GENZYME CORP (US), KAPLAN JOHANNE (US)) 23 de Septiembre de 1999 (1999-09-23) página 3, línea 6 – línea 10, reivindicaciones página 8, línea 10 – línea 18 ---	6-8, 13-18
A	W0 96 26218 A (RUDY GEORGE, HONEYMAN MARGO (AU), LEW ANDREW (AU), AMRAD OPERATION) 29 de Agosto de 1996 (1996-08-29) página 2, reivindicaciones, figura 1 ---	6-8, 13-18
A	EP 1 026 238 A (UNIV CALIFORNIA) 9 de Agosto de 2000 (2000-08-09) página 3, paragrafo 9, reivindicaciones, figura 4 ---	6-8, 13-18
P,X	W0 01 34645 A (JOSHI BHARAT H, OSHIMA YASUO (US), PURI RAJ K (US), GOVERNMENT OF) 17 de Mayo de 2001 (2001-05-17) todo el documento figura 1 ---	6-18, 21-24

15
11

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/GB 02/00900

INFORMACION ADICIONAL QUE CONTINUA DE PCT/ISA/210

Continuación de la Casilla I 2

Reivindicaciones Nos 1-5

Las presentes reivindicaciones 1-5 se relacionan con un gran número de compuestos posibles. De hecho, las reivindicaciones contienen tantas variables que una falta de claridad (y/o brevedad) dentro del significado del Artículo 6 del PCT surge hasta el punto de hacer que una búsqueda significativa de las reivindicaciones sea imposible. Por consiguiente, se ha llevado a cabo la búsqueda para aquellas partes de la solicitud que parecen ser claras (y/o breves), a saber compuestos en los cuales la proteína humana o epítipo de células B se deriva de la citocina según se reivindicó en las reivindicaciones 6-8, interleucina mutada 13 según se reivindicó en las reivindicaciones 9-12 y la materia objeto según se reivindicó en las reivindicaciones 13-25 que se refieren directa o indirectamente al presente.

Se llama la atención del solicitante al hecho de que las reivindicaciones, o partes de las reivindicaciones, relacionadas con invenciones respecto de las cuales no se ha establecido un reporte de búsqueda internacional no tienen que ser el sujeto de un examen preliminar internacional (Norma 66 I(e) PCT). Se le avisa al solicitante que la política de la EPO al actuar como Autoridad de Examen Preliminar Internacional normalmente es no llevar a cabo un examen preliminar en asuntos que no han examinado. Este es el caso prescindiendo de si las reivindicaciones se enmendaron o no siguiendo el recibo del reporte de búsqueda o durante cualquier procedimiento del Capítulo II.

16
12

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL
Informe sobre miembros de familia de patentes

Solicitud Internacional No
PCT/GB 02/00900

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda			Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes		Fecha de publicación
W0	9604306	A	15-02-1996	US	5696234 A	09-12-1997
				AU	3196195 A	04-03-1996
				W0	9604306 A2	15-02-1996
EP	0759468	A	26-02-1997	EP	0759468 A1	26-02-1997
				JP	9118696 A	06-05-1997
W0	9602555	A	01-02-1996	AU	713040 B2	18-11-1999
				AU	1912795 A	16-02-1996
				CA	2194761 A1	01-02-1996
				EP	1167377 A2	02-01-2002
				EP	1167378 A2	02-01-2002
				EP	1167379 A2	02-01-2002
				EP	0772619 A1	14-05-1997
				JP	10506265 T	23-06-1998
				W0	9602555 A1	01-02-1996
				US	6194388 B1	27-02-2001
				US	6207646 B1	27-03-2001
W0	9310235	A	27-05-1993	DE	4137333 A1	19-05-1993
				AT	163196 T	15-02-1998
				AU	671960 B2	19-09-1996
				AU	2928292 A	15-06-1993
				CA	2123315 A1	27-05-1993
				CZ	9401185 A3	15-12-1994
				DE	59209196 D1	19-03-1998
				DK	613499 T3	23-09-1998
				W0	9310235 A1	27-05-1993
				EP	0613499 A1	07-09-1994
				ES	2112340 T3	01-04-1998
				GR	3026600 T3	31-07-1998
				HU	66826 A2	30-01-1995
				JP	7501522 T	16-02-1995
				KR	276410 B1	15-12-2000
				NO	941681 A	06-05-1994
				SK	55494 A3	07-12-1994
				US	5723118 A	03-03-1998
EP	0911401	A	28-04-1999	EP	0911401 A1	28-04-1999
				AU	9749598 A	10-05-1999
				W0	9920765 A1	29-04-1999
				EP	1023446 A1	02-08-2000
				JP	2001520040 T	30-10-2001
				ZA	9809540 A	22-04-1999
W0	0078334	A	28-12-2000	AU	5617900 A	09-01-2001
				W0	0078334 A1	28-12-2000
W0	9604388	A	15-02-1996	AU	2140699 A	03-06-1999
				AU	3382595 A	04-03-1996
				BR	9508469 A	16-09-1997
				CA	2196200 A1	15-02-1996
				CN	1164872 A	12-11-1997
				CZ	9700256 A3	17-09-1997
				W0	9604388 A1	15-02-1996
				EP	0770135 A1	02-05-1997
				HU	76369 A2	28-08-1997
				JP	10503371 T	31-03-1998

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL
Informe sobre miembros de familia de patentes

Solicitud Internacional No
PCT/GB 02/00900

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
W0 9604388 A		NO 970374 A NZ 292124 A PL 318380 A1 US 5783181 A ZA 9506253 A	19-02-1997 28-10-1998 09-06-1997 21-07-1998 08-01-1997
W0 9740149 A	30-10-1997	US 5843449 A AU 724547 B2 AU 2386997 A BR 9708714 A CA 2251584 A1 CN 1216582 A CZ 9803333 A3 W0 9740149 A1 EP 0904369 A1 JP 2000509265 T NO 984835 A NZ 332311 A PL 329350 A1 TR 9802082 T2	01-12-1998 28-09-2000 12-11-1997 03-08-1999 30-10-1997 12-05-1999 17-03-1999 30-10-1997 31-03-1999 25-07-2000 16-12-1998 26-05-2000 29-03-1999 21-09-2000
W0 9946992 A	23-09-1999	AU 3102999 A CA 2322624 A1 EP 1071333 A1 JP 2002506618 T W0 9946992 A1	11-10-1999 23-09-1999 31-01-2001 05-03-2002 23-09-1999
W0 9626218 A	29-08-1996	AU 706774 B2 AU 4659796 A W0 9626218 A1 CA 2213301 A1 EP 0815136 A1 JP 11500719 T	24-06-1999 11-09-1996 29-08-1996 29-08-1996 07-01-1998 19-01-1999
EP 1026238 A	09-08-2000	EP 1026238 A2 AT 207537 T AU 661684 B2 AU 1516392 A CA 2070004 A1 DE 69232147 D1 DK 519469 T3 EP 0519469 A1 ES 2165350 T3 JP 7070182 A KR 262247 B1 US 5674978 A US 5475086 A US 6011139 A US 5846740 A US 5705626 A US 5998366 A	09-08-2000 15-11-2001 03-08-1995 24-12-1992 19-12-1992 29-11-2001 10-12-2001 23-12-1992 16-03-2002 14-03-1995 15-07-2000 07-10-1997 12-12-1995 04-01-2000 08-12-1998 06-01-1998 07-12-1999
W0 0134645 A	17-05-2001	AU 1599301 A W0 0134645 A2	06-06-2001 17-05-2001

17
13

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/24 C07K14/47 C07K14/54 A61K39/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, BIOTECHNOLOGY ABS, CHEM ABS Data, SEQUENCE SEARCH, EMBASE, LIFESCIENCES, MEDLINE, PAJ SCISEARCH, MPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 04306 A (SCHERING CORP) 15 February 1996 (1996-02-15) the whole document claim 12	6-18, 21-24
X	MCKENZIE A N J ET AL "Structural comparison and chromosomal localization of the human and mouse IL-13 genes" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO BALTIMORE, US, vol 150, no 12, 15 June 1993 (1993-06-15), pages 5436-5444, XP002176473 ISSN 0022-1767 figure 2	6-16
-/-		
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
Special categories of cited documents A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance E* earlier document but published on or after the international filing date L* document which may throw doubt on priority claims or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (see specification) O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to underscore the principle or theory underlying the invention X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art Z* document number of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 14 May 2002		Date of mailing of the international search report 04/06/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 1201 NL - 3720 HV Bilthoven Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 051 ops nl, Fax: (+31-70) 340-0010		Authorized officer Pilat, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/GB 02/00900

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Character of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BUITKAMP JOHANNES ET AL "The cattle interleukin-13 gene Genomic organization, chromosomal location, and evolution of the promoter " IMMUNOGENETICS, vol 49, no 10, 1999, pages 872-878, XP002198871 ISSN 0093-7711 the whole document	6-11, 13-18, 21-24
X	HEINZMANN A ET AL "Genetic variants of IL-13 signalling and human asthma and atopy " HUMAN MOLECULAR GENETICS, vol 9, no 4, 1 March 2000 (2000-03-01), pages 549-559, XP002198872 ISSN 0964-6906 the whole document	6-8, 13-18, 21-24
X	EP 0 759 468 A (VIRBAC LAB) 26 February 1997 (1997-02-26) claims, figure 2	6-8, 13-18,21
Y	page 6, line 11 - line 15	19,20
Y	WO 96 02555 A (UNIV IOWA RES FOUND) 1 February 1996 (1996-02-01) cited in the application the whole document	19,20
X	WO 93 10235 A (SEBALD WALTER) 27 May 1993 (1993-05-27) claims	6-8, 13-18,21
X	EP 0 911 401 A (BAYER AG) 28 April 1999 (1999-04-28) claims, tables 1,2	6-8, 13-18,21
X	WO 00 78334 A (LIN SIEM PHENG ,TAN YIN HWEI (SG), INST OF MOLECUL & CELL BIOLOGY) 28 December 2000 (2000-12-28) the whole document	6-8, 13-18,21
X	WO 96 04388 A (BROWNE MICHAEL JOSEPH ,CHAPMAN CONRAD GERALD (GB), CLINKENBEARD HE) 15 February 1996 (1996-02-15) claims, examples	6-8, 13-18,21
A	WO 97 40149 A (BOOTS ANNA MARIA HELENA ,AKZO NOBEL NV (NL), BOS EBO SYBREN (NL),) 30 October 1997 (1997-10-30) the whole document	6-8, 13-18,21
	-/-	

Form PCT/GB/912 (continuation of international sheet) (July 1999)

20
16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/GB 02/00900

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99 46992 A (GREGORY RICHARD J , GENZYME CORP (US), KAPLAN JOHANNE (US)) 23 September 1999 (1999-09-23) page 3, line 6 - line 10, claims page 8, line 10 - line 18	6-8, 13-18
A	WO 96 26218 A (RUDY GEORGE , HONEYMAN MARGO (AU), LEW ANDREW (AU), AMRAD OPERATION) 29 August 1996 (1996-08-29) page 2, claims, figure 1	6-8, 13-18
A	EP 1 026 238 A (UNIV CALIFORNIA) 9 August 2000 (2000-08-09) page 3, paragraph 9, claims, figure 4	6-8, 13-18
P,X	WO 01 34645 A (JOSHI BHARAT H , OSHIMA YASUO (US), PURI RAJ K (US), GOVERNMENT OF) 17 May 2001 (2001-05-17) the whole document figure 1	6-18, 21-24

Form PCT/GBAR10 (continuation of annex sheet) (July 1999)

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I 2

Claims Nos 1-5

Present claims 1-5 relate to an extremely large number of possible compounds. In fact, the claims contain so many variables that a lack of clarity (and/or conciseness) within the meaning of Article 6 PCT arises to such an extent as to render a meaningful search of the claims impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the application which do appear to be clear (and/or concise), namely compounds wherein the human protein or B cell epitope is derived from cytokine as claimed in claims 6-8, mutated interleukin 13 as claimed in claims 9-12 and subject-matter as claimed in claims 13-25 referring directly or indirectly thereto.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66 I(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/GB 02/00900

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9604306	A	15-02-1996	US 5696234 A AU 3196195 A WO 9604306 A2	09-12-1997 04-03-1996 15-02-1996
EP 0759468	A	26-02-1997	EP 0759468 A1 JP 9118696 A	26-02-1997 06-05-1997
WO 9602555	A	01-02-1996	AU 713040 B2 AU 1912795 A CA 2194761 A1 EP 1167377 A2 EP 1167378 A2 EP 1167379 A2 EP 0772619 A1 JP 10506265 T WO 9602555 A1 US 6194388 B1 US 6207646 B1	18-11-1999 16-02-1996 01-02-1996 02-01-2002 02-01-2002 02-01-2002 14-05-1997 23-06-1998 01-02-1996 27-02-2001 27-03-2001
WO 9310235	A	27-05-1993	DE 4137333 A1 AT 163196 T AU 671960 B2 AU 2928292 A CA 2123315 A1 CZ 9401185 A3 DE 59209196 D1 DK 613499 T3 WO 9310235 A1 EP 0613499 A1 ES 2112340 T3 GR 3026600 T3 HU 66826 A2 JP 7501522 T KR 276410 B1 NO 941681 A SK 55494 A3 US 5723118 A	19-05-1993 15-02-1998 19-09-1996 15-06-1993 27-05-1993 15-12-1994 19-03-1998 23-09-1998 27-05-1993 07-09-1994 01-04-1998 31-07-1998 30-01-1995 16-02-1995 15-12-2000 06-05-1994 07-12-1994 03-03-1998
EP 0911401	A	28-04-1999	EP 0911401 A1 AU 9749598 A WO 9920765 A1 EP 1023446 A1 JP 2001520040 T ZA 9809540 A	28-04-1999 10-05-1999 29-04-1999 02-08-2000 30-10-2001 22-04-1999
WO 0078334	A	28-12-2000	AU 5617900 A WO 0078334 A1	09-01-2001 28-12-2000
WO 9604388	A	15-02-1996	AU 2140699 A AU 3382595 A BR 9508469 A CA 2196200 A1 CN 1164872 A CZ 9700256 A3 WO 9604388 A1 EP 0770135 A1 HU 76369 A2 JP 10503371 T	03-06-1999 04-03-1996 16-09-1997 15-02-1996 12-11-1997 17-09-1997 15-02-1996 02-05-1997 28-08-1997 31-03-1998

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1999)

22
18

23
4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/GB 02/00900

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9604388	A	NO 970374 A	19-02-1997
		NZ 292124 A	28-10-1998
		PL 318380 A1	09-06-1997
		US 5783181 A	21-07-1998
		ZA 9506253 A	08-01-1997
WO 9740149	A 30-10-1997	US 5843449 A	01-12-1998
		AU 724547 B2	28-09-2000
		AU 2386997 A	12-11-1997
		BR 9708714 A	03-08-1999
		CA 2251584 A1	30-10-1997
		CN 1216582 A	12-05-1999
		CZ 9803333 A3	17-03-1999
		WO 9740149 A1	30-10-1997
		EP 0904369 A1	31-03-1999
		JP 2000509265 T	25-07-2000
		NO 984835 A	16-12-1998
		NZ 332311 A	26-05-2000
		PL 329350 A1	29-03-1999
		TR 9802082 T2	21-09-2000
WO 9946992	A 23-09-1999	AU 3102999 A	11-10-1999
		CA 2322624 A1	23-09-1999
		EP 1071333 A1	31-01-2001
		JP 2002506618 T	05-03-2002
		WO 9946992 A1	23-09-1999
WO 9626218	A 29-08-1996	AU 706774 B2	24-06-1999
		AU 4659796 A	11-09-1996
		WO 9626218 A1	29-08-1996
		CA 2213301 A1	29-08-1996
		EP 0815136 A1	07-01-1998
		JP 11500719 T	19-01-1999
EP 1026238	A 09-08-2000	EP 1026238 A2	09-08-2000
		AT 207537 T	15-11-2001
		AU 661684 B2	03-08-1995
		AU 1516392 A	24-12-1992
		CA 2070004 A1	19-12-1992
		DE 69232147 D1	29-11-2001
		DK 519469 T3	10-12-2001
		EP 0519469 A1	23-12-1992
		ES 2165350 T3	16-03-2002
		JP 7070182 A	14-03-1995
		KR 262247 B1	15-07-2000
		US 5674978 A	07-10-1997
		US 5475086 A	12-12-1995
		US 6011139 A	04-01-2000
		US 5846740 A	08-12-1998
		US 5705626 A	06-01-1998
		US 5998366 A	07-12-1999
WO 0134645	A 17-05-2001	AU 1599301 A	06-06-2001
		WO 0134645 A2	17-05-2001

Form PCT/GB/A/210 (patent family search) (July 1999)

5

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación

12 de Septiembre de 2002 (12 09 2002)

(10) Número de Publicación Internacional

PCT WO 02/070711 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷ C12N 15/24,
C07K 14/47, 14/54, A61K 39/00

(74)Agentes DALTON, Marcus, J W, GlaxoSmithKline, Corporate
Intellectual Property (CN9 25,1), 980 Great West Road,
Brentford, Middlesex TW8 9GS (GB).

(21) Número de Solicitud Internacional PCT/GB02/00900

(22) Fecha de Registro Internacional 1 de Marzo de 2002
(01 03 2002)

(81) Estados Designados (nacionales). AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CQ, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,
OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(25) Idioma de registro: INGLES

(26) Idioma de Publicación INGLES

(30) Información de Prioridad
0105360 2 3 de Marzo de 2001 (03 03.2001) GB

(84) Estados Designados (regionales) patente ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente
euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) patente
europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE, TR) patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71)Solicitante (para todos los estados designados, excepto
Estados Unidos de América) GLAXO GROUP LIMITED
[GB/GB] Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue,
Greenford, Middlesex UB6 0NN (GB)

(72) Inventores e

Publicado

— con reports de búsqueda internacional

(75) Inventores/Solicitantes (para los Estados Unidos de
América únicamente) ASHMAN, Claire [GB/GB],
GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage, Hertfordshire
SG1 2NY (GB) CROWE, James, Scott [GB/GB],
GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage, Hertfordshire
SG1 2NY (GB) ELLIS, Jonathan, Henry [GB/GB],
GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage, Hertfordshire
SG1 2NY (GB) LEWIS, Alan, Peter [GB/GB],
GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage, Hertfordshire
SG1 2NY (GB).

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase a
"Las Notas Gulas sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen
al comienzo de cada emisión regular de la Gaceta PCT

(54) Título "VACUNA"

Figura 1

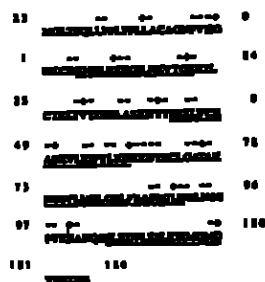
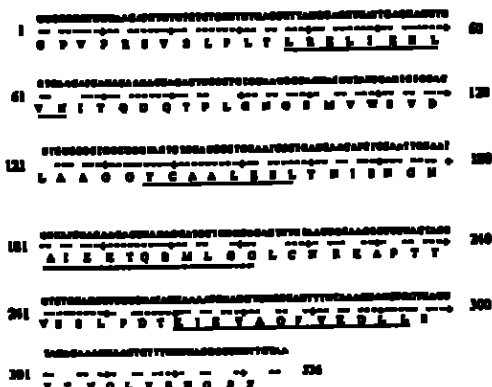


Figura 1



(57) Resumen La presente invención se refiere a un
polipéptido aislado, útil en la inmunización contra auto-
antígenos. En particular, la invención se refiere a una auto-
proteína que es capaz de elevar auto-anticuerpos cuando se
administra *in vivo*. La invención se refiere particularmente a
la conversión de citocinas humanas inmunogénicas en
humanas. La invención se refiere además a composiciones
farmacéuticas que comprenden tales compuestos y sus usos en
la medicina y los métodos para su producción.



GM HR, HU ID, IL, IN IS JP KE, KG KP KR KZ, LC,
LK, LR, LS, LT LU LV MA, MD, MG MK, MN MW
MX MZ, NO, NZ, OM PH PL, PT RO, RU SD, SE, SG,
SI SK, SL, TJ TM TN TR TT TZ, UA UG US, UZ,
VN YU ZA, ZM, ZW

GB, GR IL, IT I U MC NL, PT SE, TR) OAPI patent
(BF BJ CF CG CI CM GA, GN GQ, GW ML, MR,
NR, SN TD, TG).

Published

— with international search report

(84) Designated States (regional) ARIPO patent (GH GM
KE, LS, MW MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM ZW),
Eurasian patent (AM AZ, BY KG KZ, MD, RU TJ TM),
European patent (AT BE, CH CY DE, DK ES FI FR

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

**CAPITULO REIVINDICATORIO COMO FUE
INICIALMENTE PRESENTADO EN FASE
INTERNACIONAL JUNTO CON SU TRADUCCION**

27
13

Claims

- 1 An isolated protein which is at least 30% but less than 100% identical to a human protein which polypeptide
- 5 (a) contains at least one mutation which is characteristic of an analogous non-human protein,
(b) is capable of raising antibodies in human
(c) is sufficiently structurally similar to the human protein that the antibodies bind to both the human protein and the polypeptide
- 10 and
wherein the protein is not an antibody
- 2 A protein having B-cell epitopes from a mammalian self-antigen and a mutation that gives rise to a sequence of an analogous protein of a second
- 15 mammalian species such that the protein is able to raise in the species from which the B-cell epitopes derived, an immune response that recognises the natural protein from which the B-cell epitopes are derived
- 3 A protein having B-cell epitopes of a self-protein which are grafted, by
- 20 substitution, into a frame work of an analogous protein from a second mammalian species such that the protein is able to raise in the species in which the B-cell epitopes are derived, an immune response that recognises the natural protein from which the B-cell epitopes are derived
- 25 4 A protein as claimed in any of claims 1 to 3 comprising conserved surface region introduced into the non-surface exposed region, said mutation giving rise to a sequence of an analogous protein such that the protein is able to raise an immune response to the self protein in the species from which the self-protein is derived
- 30 5 A protein as claimed in any one of claims 1 to 4 wherein the immune response is a neutralising antibody response

28
24!

6 A protein as claimed in any of claims 1 to 5 wherein the human protein, or B-cell epitope is derived from a cytokine

5 7 A cytokine as claimed in claim 6, which is a 4-helical cytokine

8 A cytokine as claimed in claim 7 which is IL-4 or IL-13

9 A mutated human - IL-13 having one or more of the following substitutions or
10 a substitution involving a conservative substitution thereof

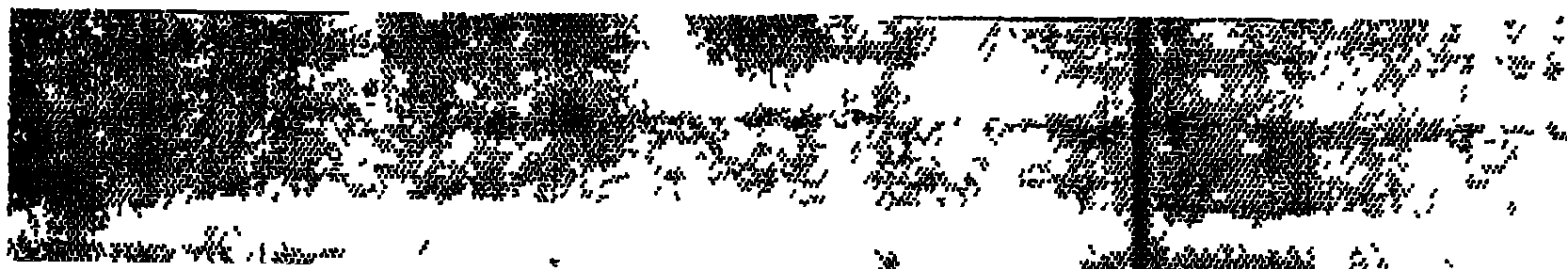
R	→	K	at	position	30
V	→	S	at	position	37
Y	→	F	at	position	63
15 A	→	V	at	position	65
E	→	D	at	position	68
E	→	Y	at	position	80
K	→	R	at	position	81
M	→	I	at	position	85
20 G	→	H	at	position	87
Q	→	H	at	position	113
V	→	I	at	position	115
D	→	K	at	position	117

25 10 A mutated human IL-13 as claimed in claim 9 having a plurality of substitutions as set forth in claim 9

11 A mutated human IL-13 as claimed in any of claim 9 or 10 having one or more of the following sequences

30

L K E L I E E L S N



1825

PATENTE	☒	MODELO DE UTILIDAD	☐	DISEÑO INDUSTRIAL	☐
SOLICITANTES RAZON SOCIAL O APELLIDOS Y NOMBRES		<u>GLAXO GROUP LIMITED</u>			
SOLICITUD INTERNACIONAL NO		<u>PCT/GB02/00900</u>			
DOMICILIO		<u>GREENFORD, MIDDLESEX, INGLATERRA</u>			
Representante Legal		<u>JOSE ANTONIO LLOREDA</u>			
TITULO		<u>"VACUNA UTIL PARA LA INMUNIZACIÓN CONTRA AUTO-PROTEINAS. PARTICULARMENTE CITOQUINAS"</u>			
		<u>CLASIFICACION C12N 15/24</u>			
EXPEDIENTE No	<u>03-075 597</u>	FECHA DE SOLICITUD	<u>01-09-2003</u>	ROLLO MICROFILM	
CERTIFICADO No		FECHA DE CONCESION		VIGENCIA DESDE	HASTA
PRORROGA		CAMBIO DE NOMBRE			
TRASPASO A					
INVENTORES	<u>ASHMAN, Claire, CROWE, James, Scott, ELLIS, Jonathan, Henry y LEWIS, Alan, Peter</u>				
OTROS					

29
26

53

F C V A L D S L

A I Y R T Q R I L H G

5

K I E V A H F I T K L L

or a variant of said sequence comprising one or more conservative substitutions

10 12 A mutated human IL-13 as shown in figure 9

13 A polynucleotide encoding a protein of claim 1 to 12

14 A polynucleotide of claim 13 which is a DNA and is operably linked to a
15 promoter

15 A vector comprising a polynucleotide of claim 13 or 14

16 A host transformed with a polynucleotide of claim 13 or 14 or vector of claim
20 15

17 A pharmaceutical composition comprising , a protein, polynucleotide, vector
as claimed in any of claims 1 to 15 with a pharmaceutically acceptable carrier or
excipient

25

18 A pharmaceutical composition as claimed in claim 17 additionally comprising
an adjuvant.

19 A pharmaceutical composition as claimed in claim 18 comprising a protein as
30 set forth in any of claims 1 to 12 and an immunostimulatory oligonucleotide.



20
27

54

20 A pharmaceutical composition as claimed in claim 19 wherein the immunostimulatory oligonucleotide is selected from the group

OLIGO 1 (SEQ ID NO 1) TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826)

5 OLIGO 2 (SEQ ID NO 2) TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758)

OLIGO 3 (SEQ ID NO 3) ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG

OLIGO 4 (SEQ ID NO 4) TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006)

OLIGO 5 (SEQ ID NO 5) TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668)

10 21 A protein, polynucleotide, vector, host or composition as claimed in any of claims 1 to 20 for use in medicine

22 Use of a protein as claimed in any of claim 1 to 12 in the manufacture of a medicament for the treatment of IL-13 mediated diseases

15 23 Use as claimed in claim 22 for the treatment of asthma

24 A method for the treatment of prophylaxis of IL-13 mediated disease comprising the administration of a safe and effective amount of composition
20 according to any of claims 17-20 to a patient in need thereof

25 A method for the preparation of a protein according to any of claims 1 to 12 which method comprises

- 25 1 Identification of one or more regions of a self, typically human, protein against which an antibody response is desired
- 2 Identification of the amino-acid sequence of the self protein
- 3 Identification of the amino-acid sequence of an analogous protein
- construction by recombinant DNA techniques of a chimaeric molecule containing
30 at least one target region identified in step 1, whose amino-acid sequence is taken from the sequence identified in step 2, and



31
28

55

sufficient amino-acids from the sequence(s) identified in step 3 to enable the resulting protein to fold into a shape similar to that of the self protein such that the mutated protein can raise an immune response that recognises the self protein

5

10

15

20

25

30



BA
A

REIVINDICACIONES

- 1** Una proteína aislada la cual es al menos 30% pero menos de 100% idéntica a una proteína humana cuyo polipeptido
 - (a) Contiene al menos una mutación que es característica de una proteína análoga no humana,
 - (b) Es capaz de generar anticuerpos en humanos
 - (c) Es suficientemente similar en su estructura a la proteína humana que los anticuerpos se unen a la proteína humana y al polipeptidoy
en donde la proteína no es un anticuerpo
- 2** Una proteína que tiene epítopes de células B de un auto-antígeno de mamífero y una mutación que da origen a una secuencia de una proteína análoga de una segunda especie mamífera tal que la proteína es capaz de originar en la especie de la cual deriva los epítopes de células B, una inmunorespuesta que reconoce la proteína natural de la cual son derivados los epítopes de células B
- 3** Una proteína que tiene epítopes de célula B de una auto-proteína los cuales son injertados, por sustitución, en una estructura de una proteína análoga de una segunda especie mamífera, tal que la proteína es capaz de originar en la especie de la cual se derivan los epítopes de células B, una

inmunorespuesta que reconoce la proteína natural de la que se derivan los epítopos de células B

- 4 Una proteína como se reivindicó en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende una región de superficie conservada introducida en la región de superficie no expuesta, dicha mutación da origen a una secuencia de una proteína análoga tal que la proteína es capaz de originar una inmunorespuesta a la auto-proteína en la especie de la cual es derivada la auto-proteína
5. Una proteína como se reivindicó en alguna de las reivindicaciones 1 a 4 en donde la inmunorespuesta es una respuesta neutralizante de anticuerpos
6. Una proteína como se reivindicó en alguna de las reivindicaciones 1 a 5 en donde la proteína humana, o el epítopo de células B se derivan de una citocina
- 7 Una citocina como se reivindicó en la reivindicación 6, la cual es una citocina 4-helicoidal
- 8 Una citocina como se reivindicó en la reivindicación 7, la cual es IL-4 o IL-13

9 IL-13 humana mutada que tiene uno o más de las siguientes sustituciones o una sustitución que comprende una sustitución conservadora de la misma

R	→	K	en posición	30
V	→	S	en posición	37
Y	→	F	en posición	63
A	→	V	en posición	65
E	→	D	en posición	68
E	→	Y	en posición	80
K	→	R	en posición	81
M	→	I	en posición	85
G	→	H	en posición	87
Q	→	H	en posición	113
V	→	I	en posición	115
D	→	K	en posición	117

10 IL-13 humana mutada como se reivindicó en la reivindicación 9, que tiene una pluralidad de sustituciones como las de la reivindicación 9

11 IL-13 humana mutada como se reivindicó en cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, que tiene una o más de las siguientes secuencias

L K E L I E E L S N

35
30

FCVALDSL
AIYRTQRILHG
KIEVAHFITKLL

o una variante de dicha secuencia que comprende una o mas de las sustituciones conservadoras

12 IL-13 humana mutada como se muestra en la figura 9

13 Un polinucleótido que codifica una proteína de las reivindicaciones 1 a 12

14 Un polinucleótido de la reivindicación 13 que es un ADN y está unido de manera operativa a un promotor

15 Un vector que comprende un polinucleótido de la reivindicación 13 o 14

16 Un huésped transformado con un polinucleótido de la reivindicación 13 o 14 o un vector de la reivindicación 15

17 Una composición farmacéutica que comprende una proteína, un polinucleótido, un vector como se reivindicó en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 con un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable

18. Una composición farmacéutica como se reivindicó en la reivindicación 17 que adicionalmente comprende un adyuvante

19. Una composición farmacéutica como se reivindicó en la reivindicación 18 que comprende una proteína como cualquiera de las de las reivindicaciones 1 a 12 y un oligonucleótido inmunoestimulador

20. Una composición farmacéutica como se reivindicó en la reivindicación 19 en donde el oligonucleótido inmunoestimulador es seleccionado del grupo

OLIGO 1 (SEC ID NO 1) TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826)

OLIGO 2 (SEC ID NO 2) TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758)

OLIGO 3 (SEC ID NO 3) ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC
ACG

OLIGO 4 (SEC ID NO 4) TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006)

OLIGO 5 (SEC ID NO 5) TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668)

21. Una proteína, un polinucleótido, un vector, un huésped o una composición como se reivindicó en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 para usar en medicina

27
34

- 22** Uso de una proteína como se reivindicó en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades mediadas por IL-13
- 23** Uso como se reivindicó en la reivindicación 22 para el tratamiento del asma
- 24** Un método para el tratamiento de la profilaxis de las enfermedades mediadas por IL-13 que comprende la administración de una cantidad segura y efectiva de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20 a un paciente que necesite la misma
- 25** Un método para la preparación de una proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, dicho método comprende
- 1** Identificación de una o más regiones de una auto-proteína, típicamente humana contra la cual se desee una respuesta de un anticuerpo
 - 2** Identificación de la secuencia de aminoácidos de la auto-proteína
 - 3** Identificación de la secuencia de aminoácidos de una construcción de proteína análoga por medio de técnicas de ADN recombinantes de una molécula quimérica que contenga al menos una región objetivo identificada en el

paso 1, cuya secuencia de aminoácidos se toma de la secuencia identificada en el paso 2, y suficientes aminoácidos de la secuencia(s) identificada en el paso 3 para permitir que la proteína resultante se doble en forma semejante a la de la auto-proteína tal que la proteína mutada pueda originar una inmunorespuesta que reconozca a la auto-proteína

29
30

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES
PCT
REPORTE DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL
(PCT Artículo 36 y Regla 70)

Referencia Solicitantes o agentes PG4355	SI SE REQUIERE ACCION POSTERIOR	Ver Notificación de Transmisión de Informe de Examen Preliminar Internacional (Formato PCT/IPEA/416)																								
Solicitud Internacional No PCT/GB02/00900	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 01/03/2002)	Fecha de prioridad (día/mes/año) 03/03/2001																								
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC , C12N15/24																										
Solicitante GLAXO GROUP LIMITED																										
1 Este informe de examen preliminar internacional ha sido preparado por esta Autoridad Examinadora Preliminar Internacional y se transmite al solicitante de conformidad con el Artículo 36 2 Este REPORTE consta de un total de <u>13</u> páginas, incluyendo la carátula ☒ Este reporte también está acompañado de ANEXOS, es decir, páginas de descripción, reivindicaciones y/o dibujos que han sido modificados y son la base de este informe y/o páginas que contienen rectificaciones hechas ante esta Autoridad (ver Regla 70 16 y la Sección 607 de las Instrucciones Administrativas de conformidad con el PCT) Estos anexos constan de un total 6 de páginas																										
3 Este informe contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems <table style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 5%;">I</td> <td style="width: 5%;">☒</td> <td>Bases del reporte</td> </tr> <tr> <td>II</td> <td>☐</td> <td>Prioridad</td> </tr> <tr> <td>III</td> <td>☒</td> <td>No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad Industrial</td> </tr> <tr> <td>IV</td> <td>☐</td> <td>Falta de unidad de invención</td> </tr> <tr> <td>V</td> <td>☒</td> <td>Afirmación razonada de conformidad con el Artículo 35(2) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial, citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación</td> </tr> <tr> <td>VI</td> <td>☐</td> <td>Ciertos documentos citados</td> </tr> <tr> <td>VII</td> <td>☐</td> <td>Ciertos defectos en la solicitud internacional</td> </tr> <tr> <td>VIII</td> <td>☐</td> <td>Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional</td> </tr> </table>			I	☒	Bases del reporte	II	☐	Prioridad	III	☒	No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad Industrial	IV	☐	Falta de unidad de invención	V	☒	Afirmación razonada de conformidad con el Artículo 35(2) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial, citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación	VI	☐	Ciertos documentos citados	VII	☐	Ciertos defectos en la solicitud internacional	VIII	☐	Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional
I	☒	Bases del reporte																								
II	☐	Prioridad																								
III	☒	No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad Industrial																								
IV	☐	Falta de unidad de invención																								
V	☒	Afirmación razonada de conformidad con el Artículo 35(2) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial, citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación																								
VI	☐	Ciertos documentos citados																								
VII	☐	Ciertos defectos en la solicitud internacional																								
VIII	☐	Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional																								
Fecha de presentación de la demanda 09/09/2002	Fecha de terminación de este reporte 04 06 2003																									
Nombre y dirección de correo de la autoridad internacional de examen preliminar European Patent Office D-80298 Munich Tel No +49 89 2399-0 Tx 523656 epmu d Fax No +49 89 2399 - 4465	Funcionario autorizado Pilat, D Teléfono No +49 89 2399 8668																									

40
37

I Bases del Reporte

- 1 Respecto a los elementos de la solicitud internacional (Carátulas de remplazo que han sido suministradas a la oficina receptora en respuesta a una invitación bajo el artículo 14 están referenciados en este reporte como "presentados originalmente" y no están anexos a este reporte dado que no contienen modificaciones (Reglas 70 16 y 70 17)

Descripción, Páginas

1-50 como se presentaron originalmente

Reivindicaciones, No

1-34 como se recibieron el 14/04/2003 con la carta de 28/03/2003

Dibujos, Hojas.

1/13-13/13 como se presentaron originalmente

Listado de Secuencia de la Descripción, páginas

1-7 como se presentaron originalmente

- 2 Respecto al idioma, todos los elementos marcados anteriormente estuvieron disponibles o fueron suministrados a esta Autoridad en el idioma en el cual la solicitud internacional fue presentada, a menos que se indique lo contrario bajo este ítem

Estos elementos estuvieron disponibles o fueron suministrados a esta Autoridad en el idioma, el cual es

- ☐ el idioma de una traducción suministrada para una búsqueda internacional (según la Regla 23 1 (b))
☐ el idioma de una publicación de la solicitud internacional (según la Regla 48 3 (b))
☐ el idioma de la traducción suministrada para el examen preliminar internacional (según las Reglas 55 2 y/o 55.3)

- 3 Respecto al nucleótido y/o secuencia amino ácida revelado en la solicitud internacional, se llevó a cabo el examen preliminar internacional según el listado de secuencia

- ☒ contenido en la solicitud internacional en forma escrita
☒ registrado junto con la solicitud internacional en forma legible por computador
☐ proporcionado subsiguientemente a esta Autoridad en forma escrita
☐ proporcionado subsiguientemente a esta Autoridad en forma legible por computador
☐ Se ha proporcionado la afirmación respecto a la cual el listado de secuencia escrito proporcionado subsiguientemente no va más allá de la revelación en la solicitud internacional según se presentó
☐ Se ha proporcionado la afirmación respecto a la cual la información presentada en forma legible por computador es idéntica al listado de secuencia escrita

44
38

4 Las modificaciones han resultado en la cancelación de:

- ☐ la descripción, páginas
☐ las reivindicaciones, Nos
☐ los dibujos, Hojas

☐ los dibujos, páginas

- 5 ☒ Este reporte ha sido establecido como si (algunas) de las modificaciones no se hubiesen hecho, ya que se ha considerado que van más allá de la revelación según se presentó, como se indicó en Casilla Suplementaria (Regla 70 2 (c))

(Cualquier hoja de remplazo que contenga tales modificaciones debe ser referida bajo el ítem 1 y anexada a este reporte)

6 Observaciones adicionales, si son necesarias

III. No establecimiento de opinión respecto a la novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial

- 1 La cuestión de si la invención reivindicada parece ser novedosa, involucrar nivel inventivo (no ser obvio), o ser industrialmente aplicable no se ha examinado en relación con:

- ☐ toda la solicitud internacional
☒ las reivindicaciones Nos 1-5, 29

porque

- ☒ dicha solicitud internacional, o dichas reivindicaciones Nos 29 se relaciona con el siguiente asunto/materia que no requiere examen preliminar Internacional (*especifique*)

ver hoja anexa

- ☐ la descripción, reivindicaciones o dibujos (*indican elementos particulares a continuación*) o dichas reivindicaciones Nos son tan imprecisas que no pudo formarse una opinión significativa (*especifique*)

- ☐ las reivindicaciones o dichas reivindicaciones Nos 1-4 y 6-18 (cada parte) están sustentadas tan inadecuadamente por la descripción que no pudo formarse una opinión significativa

- ☒ no se ha establecido un informe de búsqueda internacional para dichas reivindicaciones Nos 1-5

- 2 Un examen internacional significativo no puede llevarse a cabo debido a la falla del nucleótido y/o listado de secuencia amino ácida para cumplir con el estándar preparado en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas

- ☐ el formulario escrito no ha sido proporcionado o no cumple con el estándar
☐ la forma legible por computador no ha sido proporcionado o no cumple con el estándar

V Afirmación razonada bajo el Artículo 35(2) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial, citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación

42
39

REPORTE DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL

1 Afirmación

Novedad (N)	Sí	Reivindicaciones 18
	No	Reivindicaciones 6-9, 14-17, 19-23, 27-29
Nivel inventivo (IS)	Sí	Reivindicaciones 18
	No	Reivindicaciones 24, 25, 34
Aplicabilidad industrial (IA)	Sí	Reivindicaciones 6-9, 14-25, 27, 28, 30, 34
	No	Reivindicaciones

2 Citaciones y explicaciones

Ver hoja separada

Se hace referencia a los siguiente documentos

- D1 WO 96 04306 A (SCHERING CORP) 15 de Febrero de 1996 (1996-02-15)
- D2 MCKENZIE A N J ET AL 'Comparación estructural y localización cromosomal del humano y el ratón IL-13 genes' JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO BALTIMORE, US, vol 150, no 12, 15 de Junio DE 1993 (1993-06-15), PAGINAS 5436-5444, XP002176473 ISSN 0022-1767
- D3 BUITKAMP JAHANNES ET AL 'La interleucina de ganado vacuno-13 genes Organización genómica, localización cromosomal, y evolución del promotor' INMUNOGENETICS, vol 49, no 10, 1999, PAGINAS 872-878, XP002198871 ISSN 0093-7711
- D4 HEINZMANN A ET AL 'Variantes genéticas de IL-13señalizado y asma y atopia humana' HUMAN MOLECULAR GENETICS, vol 9, no 4, 1 de Marzo de 2000 (2000-03-01), paginas 549-559, XP002198872 ISSN 0964-6906
- D5 EP-A-0 759 468 (VIRBAC LAB) 26 de Febrero de 1997 (1997-02-26)
- D6 WO 96 02555 A (UNIV IOWA RES FOUND) 1 de Febrero de 1996 (1996-02-01) citado en la solicitud
- D7 WO 93 10235 A (SEBALD WALTER) 27 de Mayo de 1993 (1993-05-27)
- D8 EP-A-0 911 401 (BAYER AG) 28 de Abril de 1999 (1999-04-28)
- D10 WO 96 04388 A (BROWNE MICHAEL JOSEPH, CHAPMAN CONRAD GERARD (GB), CLINKENBEARD HE) 15 de Febrero de 1996 (1996-02-15)
- D12 WO 99 46992 A (GREGORY RICHARD J, GENZYME CORP (US), KAPLAN JOHANNE (US)) 23 de Septiembre de 1999 (1999-09-23)

Los documentos D13 a D15 no fueron citados en el reporte de búsqueda internacional Copias de los documento son anexadas aquí

- D13 DALUM I et al "Anticuerpos terapeuticos producidos por la inmunización contra alfa-TNF" Nature Biotechnology vol 17, Julio de 1999, p 666-669 XP000910155, citado en la solicitud
- D14 WO 98 46642
- D15 Maecker H T et al "La vacunación con DNA de fusión alergenico IL-18 protege contra y reversa la hiperactividad establecida de las vías respiratorias en un modelo de asma murino", The Journal of Immunology 15 Enero de 2001, vol 166, p 959-965, XP002943717

44
41

Ad Sección II Prioridad

1 Prioridad (Artículo 8 del PCT)

La fecha de prioridad para la materia objeto reivindicada en las reivindicaciones 14-17, 24, 25 parece no ser válida, en cuanto a que estos aspectos no son revelados de manera directa y no ambigua en el documento de la prioridad presentado

No hay descripción de un IL-13 humano mutado que tiene uno o más de los sustituyente tales como los listados en la reivindicación 14 o que tiene uno o más de las siguientes secuencias como se listan en la reivindicación 17 No hay ninguna base en el documento de la prioridad para los oligonucleótidos inmunoestimuladores como se enuncia en las reivindicaciones 24 y 25 En consecuencia, los documentos citados en el reporte de búsqueda como documentos "P" son el arte anterior relevante para estas reivindicaciones

Ad Sección III No establecimiento de opinión

2 Artículo 34 (4)(a)(i) y Regla 67 1 (iv) del PCT

- 2 1 Las reivindicaciones originales 1-5 no fueron buscadas, porque dichas reivindicaciones cubren un número extremadamente grande de posibles compuestos tal que es imposible efectuar una búsqueda significativa de estas reivindicaciones En consecuencia, no será emitida una opinión concerniente a dichas reivindicaciones 1-5

Para la evaluación de la presente reivindicación 29 en la cuestión de si ella es aplicable industrialmente, no existe un criterio unificado en los Estados Contratantes del PCT La patentabilidad también puede ser dependiente de la formulación de las reivindicaciones La EPO, por ejemplo, no reconoce como materia objeto industrialmente aplicable las reivindicaciones de uso de un compuesto en un tratamiento médico, pero puede permitir, sin embargo, reivindicaciones de compuestos conocidos para su primer uso en tratamientos médicos y el uso de tales compuestos para la manufactura de un medicamento para un nuevo tratamiento médico

La reivindicación 29 se refiere a la materia objeto que considerada esta Autoridad es cubierta por lo provisto en la Regla 67 1 (iv) del PCT En consecuencia, no será formulada una opinión con respecto a la aplicación industrial de la materia objeto de esta reivindicación (Artículo 34(4)(a)(i) del PCT)

2 2 Modificaciones (Artículo 34(2)(b) del PCT)

Aunque ninguna reivindicación 1 a 5 fue buscada, las reivindicaciones dependientes 6-9, para las cuales se ha llevado a cabo la búsqueda, se refieren a estas reivindicaciones. Por lo tanto, las reivindicaciones 1-4 necesitaron ser evaluadas según el Artículo 34 (2) del PCT.

- 2 2a La reivindicación 4 modificada, presentada con la comunicación fechada el 28 3 03, introduce materia objeto la cual amplía el contenido de la solicitud presentada. La nueva reivindicación 4 caracteriza el uso de un producto que se caracteriza por una combinación específica de características, las cuales no se revelan de forma directa y no ambigua en la solicitud presentada. Esta combinación de características es el resultado de una selección específica entre posibles alternativas reveladas para cada característica las cuales nunca fueron reveladas en combinación en la presente solicitud. De este modo, la reivindicación 4 contraviene el Artículo 34 (2) del PCT.

La misma objeción basada en la misma razón es válida para el producto reivindicado en las reivindicaciones 10 a 13 y 26, 31-32.

- 2 2b Ninguna base se pudo encontrar para la reivindicación 33. De esta manera, esta reivindicación contraviene el Artículo 34 (2) del PCT.

- 2 2c Las restantes modificaciones parecen cumplir con el Artículo 34(2)(b) del PCT y así parecen admisibles.

Entonces las nuevas reivindicaciones 4, 10-13, 26, 31-33 van más allá de la presente revelación como se ha presentado, este reporte de examen preliminar internacional ha sido llevado a cabo como si estas reivindicaciones no hubieran sido presentadas.

Ad Sección V Declaraciones razonadas según la Regla 66.2(a)(II), citas y explicaciones soportando tales declaraciones

3 Novedad (Artículo 33(2) del PCT)

3.1 Comentarios preliminares

Los productos definidos en términos de procesos para su preparación (conocidas como reivindicaciones de "producto por proceso") tienen que ser interpretados en un sentido absoluto, por ejemplo independientemente del proceso, y son admisibles únicamente si el producto por sí mismo cumple los requerimientos establecidos en el PCT (e.g. Artículo 33 (1), Artículo 6, del PCT). Adicionalmente, un producto producido por un proceso particular (recombinación) no da necesariamente un producto novedoso e inventivo a menos que dicho proceso le confiera características novedosas e inventivas al producto reivindicado. Lo mismo es válido para productos químicos los cuales son caracterizados por medio de un proceso de conexión de dos componentes independientes.

Hasta ahora, ninguno de los procesos ha sido obtenido por medios recombinantes y ningún proceso ha sido obtenido por un proceso químico confiriendo al producto reivindicado tales características que distingan dicho producto de los productos del estado del arte.

El uso de una proteína interleucina recombinante química en la manufactura de una vacuna "para tratar" como se reivindicó en la reivindicación 9 refiriéndose de nuevo a la reivindicación 1 no puede ser distinguido del uso de IL-13 mutada para la manufactura de un medicamento "para el tratamiento" de asma. Las diferencias entre estos usos se encuentran solamente en el mecanismo de acción en que actúa la composición, por ejemplo, por la competición por los receptores comunes o dando una inmunorespuesta. La simple explicación de un efecto obtenido cuando se usa una composición conocida (solamente identificada por su uso propuesto) no puede conferir novedad a un proceso conocido, si dicha persona experta ya está enterada de la ocurrencia de su efecto deseado en el "tratamiento del asma".

- 3.2 Las nuevas reivindicaciones 6-8 han sido modificadas alegando referirse a un segundo formato médico. Sin embargo, en el presente caso, la redacción aceptada y reconocida es la siguiente: "El uso del producto X para la manufactura de una vacuna para tratar la enfermedad Y" no se ha seguido. De hecho, la ruptura de la tolerancia de las células B no es considerada como una aplicación terapéutica, sino que describe solamente un mecanismo de acción fundamental. Así, para poder cumplir con un segundo formato médico, las reivindicaciones 1-3 fallan en la aplicación terapéutica necesaria.

Estas reivindicaciones se refieren, por consiguiente, a el uso de un producto X para la manufactura de una vacuna, por ejemplo, una composición capaz de producir una inmunorespuesta.

47
44

Entonces, D1 divulga la disposición de una composición para generar los anticuerpos para los propósitos del diagnóstico, dicha enseñanza anticipa la materia objeto de las reivindicaciones 6-8 (véase D1 p 19)

- 3 3 En cuanto a las reivindicaciones 10-13, 26, 31-32 nuevamente presentadas contravienen el Artículo 34 (b) del PCT (véase el punto 2 2), no se consideran presentadas La nueva reivindicación 14 por lo tanto se considera una reivindicación independiente

A la luz de las conclusiones hechas en el punto 3 1 y 3 3, la materia objeto reivindicada en las nuevas reivindicaciones 14 a 17 carecen de novedad sobre las siguientes enseñanzas del estado del arte

- 3 3a La identidad del 57% de las partes de la IL-13 de ratón se superpone a la IL-13 humana en 131 aminoácidos El polipéptido IL-13 de ratón también puede ser considerado como un IL-13 humano mutado El polipéptido contiene al menos una mutación la cual es característica de una proteína análoga no humana, esto es polipéptido de ratón, y es capaz de originar anticuerpos en humanos Dicho polipéptido IL-13 de ratón, esto es IL-13 humano mutado, es estructuralmente similar a la proteína IL-13 humana tanto que los anticuerpos se enlazan a la proteína humana IL-13 y a dicho polipéptido IL-13 de ratón (por ejemplo, epítopes LKELIEEL o PLCNGSMVWS o DTKIEVA)
- 3 3b El IL-13 de ratón tiene epítopes de célula B de un auto-antígeno humano (por ejemplo, LRELIEEL) y una mutación que da origen a una secuencia de una proteína análoga de un ratón LKELIEEL tal que la proteína es capaz de originar en un humano una inmunorespuesta que reconoce el IL-13 humano natural
- 3 3c El IL-13 de ratón tiene epítopes de célula B de un auto-proteína humana IL-13 la cual es injertado por sustitución, dentro de una estructura de IL-13 de ratón (e.g. PLCNGSMVWS o DTKIEVA) y una mutación que da origen a una secuencia de una proteína análoga de un ratón tal que la proteína es capaz de originar en un humano una inmunorespuesta que reconoce la IL-13 humana
- 3 3d La formulaciones terapéuticas pueden ser administradas en cualquier formulación de dosis convencional (ver D1, p 25 líneas 16-17)

En consecuencia, las reivindicaciones 6-8, 14-17, 19, 27, 29 carecen de novedad sobre el P600 de ratón revelado en D1 (ver D1 reivindicaciones 11-16, 17)

48
45

- 3 4 Se requiere que el solicitante note que el contenido de D2 (ver Fig. 2, 4), D3 (ver Fig. 2 e g. epitopes RELIEELSN, FCAALESL, KIEVAQFLKDLL y Tabla 1 ganado vacuno/humano) también anticipa una o más de las reivindicaciones 14-17, 19-23 de la presente solicitud
- 3 5 D4 describe variantes genéticas de IL-13 Gln110Arg humana la cual esta implicada con el asma (ver el resumen) En el estudio de caso-control en sujetos Británicos, la Gln110 se asocio significativamente con el asma, en especial con el asma crónica persistente En un segundo estudio de caso-control de sujetos Japoneses, la Gln110 se asocio con asma topica y no topica En vista del contenido de D4, las presentes reivindicaciones 14-17 carecen de novedad
- 3 6 D5 describe interleucina-4 felina y formas mutantes de la misma Estas son usadas para el tratamiento de una variedad de enfermedades Esta enseñanza se anticipa, a las presentes reivindicaciones 14-17, 19-23, por las mismas razones como se desarrollo en el punto 3 3 anterior (ver D5, reivindicaciones 5, 6, 7, 8, 12, 13, 15, 16)
- 3 7 D7 describe muteinas hIL-4 y vectores (ver reivindicaciones 2-6) De forma similar, D8, D9 describen hIL-4 mutantes y D7, además, el uso en terapia del hIL-4 (ver todas las reivindicaciones) Ellas anticipan las presentes reivindicaciones 14-17, 19-22
- 3 8 D10 describe una proteína soluble que tiene actividad antagonista de IL-4 y/o IL-13 que comprende una mutante IL-4 o variantes fusionadas a un dominio constante de inmunoglobulina humana o fragmentos del mismo (ver el resumen) Sin embargo puede esperarse un antagonismo del efecto de IL-4 en linfocitos B o T para tener efectos benéficos en enfermedades alérgicas tales como asma extrínseca IL-13 ha sido recientemente identificada y sus porciones similares en muchas de las propiedades biológicas de IL-4

Las mutantes adecuadas de IL-4 son aquellas en donde al menos uno de los aminoácidos, que aparecen incluidos naturalmente en la IL-4 nativa en cualquiera de las posiciones 120 a 128, es reemplazado por un aminoácido diferente (ver p 1 líneas 10-13, líneas 18-20, p 2 línea 41 a p 3 línea 3, reivindicaciones 1, 2) Las proteínas fusionadas también son generadas en D10 (ver ejemplo 1 IL4Y124D/IgG1 o ejemplo 2 IL4Y124D/IgG4)

49
46

El uso de una IL-4 y/o IL-13 mutada en la manufactura de un medicamento para el uso en el tratamiento de condiciones que resultan de acciones indeseables de IL-4 y/o IL-13 como se reivindicó en la reivindicación 19 en D10, la cual incluye enfermedades alérgicas mediadas por IgE, tales como asma extrínseca, anticipa la presente reivindicación 9 (ver también el ítem 3 1) En vista de esta enseñanza, las presentes reivindicaciones 6-9, 14-17, 19-23, y 27-29 carecen de novedad

3 9 Ninguno de los documentos citados en el reporte de búsqueda internacional revela una IL-13 humana mutada como se muestra en la figura 9 De esta manera la reivindicación 18 parece novedosa

4 Nivel Inventivo (Artículo 33 (3) del PCT)

4 1 Las reivindicaciones las cuales se refieren a vectores, composiciones farmacéuticas, anfitriones, y métodos para preparar proteínas son bien conocidos en el arte La combinación de estos conocimientos aplicados con cualquier secuencia de aminoácidos conocida u obvia o una secuencia nucleotida (ver punto 3 anterior) como se reivindica en las reivindicaciones 24-25, 30, 34 habría sido considerada por la persona experta de acuerdo con las circunstancias En consecuencia, estas reivindicaciones carecen de nivel inventivo

4 2 El documento D13 citado en la presente solicitud como un antecedente se considera que representa el más relevante estado de la técnica Este describe la inserción de una clase simple de epítopo restringido II MHC en TNF-alfa Esta construcción produce una inmunorespuesta

La diferencia entre D13 y la presente reivindicación 18 es que esta se refiere a una IL-13 mutada la cual provee una multiplicidad de potenciales epítopos de célula T, los cuales retiene la misma conformación de dicha proteína nativa

El problema resuelto por la presente invención puede ser estimado como el obtener una proteína la cual es adecuada para ser usada como inmunógeno efectivo en poblaciones complejas de razas mezcladas para el tratamiento de alergias

Sin embargo, ninguno de los documentos citados en el reporte de búsqueda internacional, tomado solo en combinación con otro cualquiera, parece sugerir la solución del problema identificado arriba, diseñar una proteína quimérica como se reivindica en la reivindicación 18 En consecuencia, la reivindicación 18 parece involucrar un nivel inventivo La misma conclusión puede ser tomada de D14 o D15

4 3 La adición de un oligonucleotido inmunoestimulador en una composición farmacéutica es una mera elección que la persona experta podría haber tomado sin actividad inventiva, basado en el contenido de D6, el cual describe oligonucleotidos inmunoestimuladores que contienen dinucleotidos CpG no metilados usados para estimular una inmunorepuesta en un sujeto (ver el resumen) Las reivindicaciones 24, 25 carecen consecuentemente de nivel inventivo

4 4 D12 describe como materia objeto un método para inducir una inmunorepuesta a un auto-antígeno nativo que comprende administrar a un sujeto una cantidad efectiva de un heteroanálogo o el antígeno alterado correspondiente al auto-antígeno nativo y según las condiciones que inducen una inmunorepuesta a el auto-antígeno nativo

La simple identificación de epitopes por medio de comparación de secuencias entre proteínas análogas (e g auto y análogas) y el subsecuente uso de estos epitopes análogos con el propósito de obtener una inmunorepuesta contra un auto-antígeno teniendo integrados estos epitopes relacionados es trivial Por lo tanto, la reivindicación 25 es obvia

5 Comentarios

Claridad (Artículo 6 del PCT)

Se enfatiza que una citocina o un epitope de célula B de ratón pueden también ser derivados de citocina o epitope de célula B humana El origen primario humano de un producto, i e "siendo derivado de" cubre productos que son de origen humano y que han sido mutados para cubrir últimamente el producto de ratón del estado de la técnica

Se ha notado que la redacción de las reivindicaciones 1-3 incluye vacunas que producen una respuesta a enfermedades auto-inmunes

Se resalta que un primer uso médico puede ser permutado solamente si un producto conocido no ha sido aún empleado en terapia

En la nueva reivindicación 27, no se ha proporcionado aplicación terapéutica La expresión enfermedad mediada por IL-13 se remonta esencialmente a la identificación de un mecanismo de acción que no hace claro el alcance de la protección reivindicada Más aún, no es claro en que grado ha sido involucrado la IL-13

Adicionalmente, se resalta que una proteína análoga no tiene una definición única en el estado de la técnica. Se establecen análogos de proteína en longitud, en actividad, en peso o composición de aminoácidos etc. Por consiguiente, esto hace que el alcance de la protección de las reivindicaciones que emplean tal redacción sea oscuro.

NOTA:

**EL CAPITULO REIVINDICATORIO ANEXO A LA
VERSION EN INGLES DEL REPORTE DE EXAMEN
PRELIMINAR INTERNACIONAL, ES EL CAPITULO
REIVINDICATORIO QUE SE ACOMPAÑA EN LA
PRESENTE SOLICITUD**

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

Corporate IP
Received BRENTFORD

- 6 JUN 2003

53
30

To

Dalton, Marcus J W
GLAXOSMITHKLINE
Corporate Intellectual Property
CN925 1
980 Great West Road
Brentford
Middlesex TW8 9GS
GRANDE BRETAGNE

PCT RE	ADMIN
IPM N/A	ON
ATTY CHECKED/FILE	LE

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 71.1)

Date of mailing
(day/month/year) 04 06 2003

Applicant's or agent's reference
PG4355

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No
PCT/GB02/00900

International filing date (day/month/year)
01/03/2002

Priority date (day/month/year)
03/03/2001

Applicant
GLAXO GROUP LIMITED et al

- 1 The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary examination report and its annexes if any established on the international application
- 2 A copy of the report and its annexes if any is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices
- 3 Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices

4 REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301)

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

For the purpose of deciding whether the claimed invention is patentable or not, the elected Offices may apply criteria additional to or different from the criteria on which the international preliminary examination report is based (see Articles 27(5), 33(5)). Additional criteria may include e.g. exemptions from patentability and the requirements of enabling disclosure and of clarity and support of claims.

Name and mailing address of the IPEA/

 European Patent Office
D-80298 Munich
Tel +49 89 2369 0 Tlx 523658 epmu d
Fax +49 89 2369 4465

Authorized officer

Brandt, M
Tel +49 89 2369-2926



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PG4355	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No PCT/GB02/00900	International filing date (day/month/year) 01/03/2002	Priority date (day/month/year) 03/03/2001
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N15/24		
Applicant GLAXO GROUP LIMITED et al		

- 1 This International preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36
- 2 This REPORT consists of a total of 13 sheets including this cover sheet
 - ☒ This report is also accompanied by ANNEXES i.e. sheets of the description claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT)

These annexes consist of a total of 6 sheets

3. This report contains indications relating to the following items.

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty inventive step or industrial applicability citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 09/09/2002	Date of completion of this report 04.06.2003
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2369 0 Tx 523656 epmu d Fax. +49 89 2369 4465	Authorized officer Pilat, D Telephone No. +49 89 2369 6666 

Form PCT/IPEA/409 (cover sheet) (January 1994)

88
52

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No PCT/GB02/00900

I Basis of the report

- 1 With regard to the elements of the international application (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rules 70 16 and 70 17))*)

Description, pages

1 50 as originally filed

Claims, No

1 34 as received on 14/04/2003 with letter of 28/03/2003

Drawings, sheets

1/13 13/13 as originally filed

Sequence listing part of the description, pages

1 7 as originally filed

- 2 With regard to the language all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed unless otherwise indicated under this item

These elements were available or furnished to this Authority in the following language which is

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of the international search (under Rule 23 1(b))
☐ the language of publication of the international application (under Rule 48 3(b))
☐ the language of a translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55 2 and/or 55 3)

- 3 With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing

- ☒ contained in the international application in written form
☒ filed together with the international application in computer readable form
☐ furnished subsequently to this Authority in written form
☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form
☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished
☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished

4. The amendments have resulted in the cancellation of

56
53

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No PCT/GB02/00900

- ☐ the description pages
- ☐ the claims Nos
- ☐ the drawings sheets

- 5 ☒ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70 2(c))

(Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report)
see separate sheet

- 6 Additional observations if necessary

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

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

☐ the entire international application

☒ claims Nos 1 5 29

because

☒ the said international application or the said claims Nos 29 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*)
see separate sheet

☐ the description claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*)

☐ the claims or said claims Nos are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed

☒ no international search report has been established for the said claims Nos 1-5

- 2 A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions

☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard

☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard

V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability, citations and explanations supporting such statement

54
54

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No **PCT/GB02/00900**

1 Statement

Novelty (N)	Yes	Claims	18
	No	Claims	6 9 14-17 19 23 27-29
Inventive step (IS)	Yes	Claims	18
	No	Claims	24 25 34
Industrial applicability (IA)	Yes	Claims	6 9 14 25 27 28,30,34
	No	Claims	

**2 Citations and explanations
see separate sheet**

Reference is made to the following documents

- D1 WO 96 04306 A (SCHERING CORP) 15 February 1996 (1996-02-15)
- D2 MCKENZIE A N J ET AL 'Structural comparison and chromosomal localization of the human and mouse IL-13 genes' JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO BALTIMORE, US, vol 150 no 12 15 June 1993 (1993-06-15) pages 5436-5444, XP002176473 ISSN 0022-1767
- D3 BUITKAMP JOHANNES ET AL 'The cattle interleukin-13 gene Genomic organization, chromosomal location, and evolution of the promoter' IMMUNOGENETICS, vol 49, no 10, 1999, pages 872-878, XP002198871 ISSN 0093-7711
- D4 HEINZMANN A ET AL 'Genetic variants of IL-13 signalling and human asthma and atopy' HUMAN MOLECULAR GENETICS, vol 9, no 4, 1 March 2000 (2000-03-01), pages 549-559, XP002198872 ISSN 0964-6906
- D5 EP-A-0 759 468 (VIRBAC LAB) 26 February 1997 (1997-02-26)
- D6 WO 96 02555 A (UNIV IOWA RES FOUND) 1 February 1996 (1996-02-01) cited in the application
- D7 WO 93 10235 A (SEBALD WALTER) 27 May 1993 (1993-05-27)
- D8 EP-A-0 911 401 (BAYER AG) 28 April 1999 (1999-04-28)
- D10 WO 96 04388 A (BROWNE MICHAEL JOSEPH, CHAPMAN CONRAD GERALD (GB), CLINKENBEARD HE) 15 February 1996 (1996-02-15)
- D12 WO 99 46992 A (GREGORY RICHARD J, GENZYME CORP (US), KAPLAN JOHANNE (US)) 23 September 1999 (1999-09-23)

The documents D13 to D15 were not cited in the international search report
Copies of the documents are appended hereto

- D13 DALUM I et al "Therapeutic antibodies elicited by immunization against TNF-alpha" Nature Biotechnology vol 17, July 1999, p 666-669 XP000910155, cited in the application
- D14 WO98 46642
- D15 Maecker H T et al "Vaccination with allergen-IL-18 fusion DNA protects against and reverses established, airways hyperactivity in a murine asthma model", The Journal of Immunology 15 January 2001, vol 166, p 959-965,

89
56

XP002943717

Ad Section II Priority

1 Priority (Article 8 PCT)

The priority date for the claimed subject-matter of claims 14-17,24,25 appears to be invalid, insofar as these aspects are not directly and unambiguously disclosed in the priority document filed

There is no description of a mutated human IL-13 having one or more of the substitutions as listed in claim 14 or having one or more of the following sequence as listed in claim 17 There is neither a basis in the priority document for immunostimulatory oligonucleotides as recited in claims 24 and 25 As a consequence, the documents cited in the search report as "P" documents is relevant prior art for these claims

Ad Section III Non-establishment of opinion

2 Article 34 (4)(a) (i) and Rule 67 1 (iv) PCT

- 2 1 Original claims 1-5 were not searched, because said claims covered an extremely large number of possible compounds such as to render a meaningful search of these claims impossible As a consequence, no opinion will be issued concerning said claim 1-5

For the assessment of the present claim 29 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment

Claims 29 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67 1(iv) PCT Consequently, no opinion will be formulated

with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims
(Article 34(4)(a)(i) PCT)

2 2 Amendments (Article 34(2)(b) PCT)

Although claim 1-5 were not searched, dependent claims 6-9, for which a
searched has been carried out refers to these claims As such, claims 1-4 needed
to be assessed with regard to Article 34 (2) PCT

2 2a Amended claim 4, filed with the letter dated 28 3 03, introduces subject-matter
which extends beyond the content of the application as filed New claim 4
characterizes the use of a product characterized by a specific combination of
features, which was not directly and unambiguously disclosed in the application as
filed This combination of features is the result of a specific selection among
possible alternatives disclosed for each and every feature which was never
disclosed in combination in the present application Thus, claim 4 contravenes
Article 34 (2) PCT

The same objection based on the same rationale is valid for the product claimed
in claims 10 to 13 and 26, 31-32

2 2b No basis could either be found for claim 33 Thus, this claim contravenes Article
34 (2) PCT

2 2c The remaining amendments appear to comply with Article 34(2)(b) PCT and thus
seems admissible

Since new claims 4, 10-13, 26, 31-33 go beyond the present disclosure as filed,
this international preliminary examination report has been carried as if these
claims had not been filed

**Ad Section V Reasoned statement under Rule 66 2(a)(ii), citations and
explanations supporting such statement**

3 Novelty (Article 33 (2) PCT)

51
58

3 1 Preliminary comments

Products defined in terms of processes for their preparation (known as "product-by-process" claims) have to be interpreted in an absolute sense, ie independently of the process, and are admissible only if the products themselves fulfil the requirements set forth in the PCT (e g Article 33 (1), Article 6, PCT). Further, a product produced by a particular process (recombinant) does not necessarily render the product novel and inventive unless said process confers novel and inventive features to the product claimed. The same is valid for chimeric products which are characterized by means of a process of linking two independent components.

At present, neither the process of being obtained by recombinant means nor the process of being obtained by a chimeric process confers to the claimed product features which distinguish said product from prior art products.

The use of a chimeric recombinant interleukin protein in the manufacture of a vaccine "for treating" as claimed in claim 9 referring back to claim 1 cannot be distinguished from the use of mutated IL-13 for the manufacture of a medicament "for the treatment" of asthma. The difference between these uses lies solely in the mechanism of action the composition acts, ie either by competition for common receptors or by eliciting an immune response. The mere explanation of an effect obtained when using a known composition (only identified by its intended use) cannot confer novelty to a known process, if said skilled person is already aware of the occurrence of its desired effect "treatment of asthma".

- 3 2 New claims 6-8 have been amended to allegedly refer to a second medical format. However, in the present case, the accepted and recognized wording is the following: "use of product X for the manufacture of a vaccine for treating disease Y" has not been followed. Indeed, breaking B-cell tolerance is not considered as a therapeutic application, but describes only an underlying mechanism of action. Thus, in order to comply with a second medical format, claims 1-3 are missing the necessary therapeutic application. These claims refer, accordingly, to the use of product X for the manufacture of a vaccine, ie a composition capable to elicit an immune response.

68
41

Since D1 discloses the provision of a composition for generating antibodies for diagnostic purposes, said teaching anticipates the subject-matter of claims 6-8 (see D1 p 19)

- 3 3 Insofar as the newly submitted claims 10-13, 26, 31-32 ~~contravene Article 34 (b)~~ PCT (see point 2 2), they are not considered to be filed. New claim 14 is therefore considered to be an independent claim

780

In the light of the conclusion drawn in points 3 1 and 3 3, the subject-matter claimed in new claim 14 to 17 lack novelty over the following prior art teaching

- 3 3a Mouse IL-13 shares 57% identity in 131 aa overlap to human IL-13. Mouse IL-13 polypeptide may also be considered as a human mutated IL-13. The polypeptide contains at least one mutation which is characteristic of an analogous non-human protein, i.e. mouse polypeptide, and is capable of raising antibodies in human. Said mouse IL-13 polypeptide, i.e. mutated human IL-13, is structurally similar to the human IL-13 protein so that antibodies bind both the human IL-13 protein and said mouse IL-13 polypeptide (e.g. epitopes LKELIEEL or PLCNGSMVWS or DTKIEVA).
- 3 3b Mouse IL-13 has B cell epitopes from a human self-antigen (e.g. LRELIEEL) and a mutation that gives rise to a sequence of an analogous protein of a mouse LKELIEEL such that the protein is able to raise in human an immune response that recognizes the natural human IL-13.
- 3 3c Mouse IL-13 has B cell epitopes of a human IL-13 self-protein which is grafted by substitution, into a framework of a mouse IL-13 (e.g. PLCNGSMVWS or DTKIEVA) and a mutation that gives rise to a sequence of an analogous protein of a mouse such that the protein is able to raise in human an immune response that recognizes human IL-13.
- 3 3d Therapeutic formulations may be administered in any conventional dosage formulation (see D1, p 25 lines 16-17).

Consequently, claims 6-8, 14-17, 19, 27, 29 lack novelty over mouse P600

63
60

disclosed in D1 (see D1 claims 11-16,17)

- 3 4 The applicant is requested to note that the content of D2 (see Fig 2, 4), D3 (see Fig 2 e.g. epitopes RELIEELSN, FCAALESL, KIEVAQFLKDLL and Table 1 cattle/human) anticipates one or more of the claims 14-17, 19-23 of the present application as well
- 3 5 D4 describes genetic variants of human IL-13 Gln110Arg which is involved in asthma (see abstract) In case-control study of British subjects, the Gln110 significantly associated with asthma, especially chronic unremitting asthma In a second case-control study of Japanese subjects, Gln110 associated with atopic and also non-atopic asthma In view of the content of D4, present claims 14-17 lack novelty
- 3 6 D5 describes feline interleukin-4 and mutant forms thereof These are used for therapeutical treatments of a variety of diseases This teaching anticipates, for the same reasons as developed in point 3 3 above, present claims 14-17, 19-23, (see D5 claims 5 6 7 8,12,13,15,16)
- 3 7 D7 describes hIL-4 muteins and vectors (see claims 2-6) Similarly, D8, D9 describes hIL-4 mutants and D7, moreover, hIL-4 for use in therapy (see all claims) They anticipate present claims 14-17, 19-22
- 3 8 D10 describes a soluble protein having IL-4 and/or IL-13 antagonist activity comprising an IL-4 mutant or variant fused to a human immunoglobulin constant domain or fragment thereof (see abstract) Antagonism of the effect of IL-4 on T or B-lymphocytes can therefore be expected to have beneficial effects on allergic diseases such as extrinsic asthma IL-13 has been recently identified and shares similarity in many of the biological properties of IL-4
Suitable IL-4 mutants are those wherein at least one amino acid, naturally occurring in wild-type IL-4 at any one of position 120 to 128 inclusive, is replaced by a different natural amino acid (see p 1 lines 10-13, lines 18-20, p 2 line 41 to p 3 line 3, claims 1,2) Fusion proteins are also generated in D10 (see example 1 IL4Y124D/IgG1 or example 2 IL4Y124D/IgG4)
The use of a mutated IL-4 and/or IL-13 in the manufacture of a medicament for

the use in the treatment of conditions resulting from undesirable actions of IL-4 and/or IL-13 as claimed in D10 claim 19, which embraces IgE mediated allergic diseases, such as extrinsic asthma, anticipates present claim 9 (see also item 3 1) In view of this teaching, present claims 6-9, 14-17, 19-23, and 27-29 lack novelty

- 3 9 None of the document cited in the international search report discloses a mutated human IL-13 as shown in Figure 9 Thus claim 18 seems novel

4 Inventive step (Article 33 (3) PCT)

- 4 1 Claims which refer to vectors, pharmaceutical compositions, hosts, and methods for preparing a proteins are well known in the art The combination of these known applications with either a known or obvious amino acid sequence or a nucleotide sequence (see points 3 above) as claimed in claims 24-25, 30, 34 would have been considered by the skilled person in accordance with circumstances As a consequence, these claims lack an inventive step

- 4 2 Document D13 cited in the present application as background art is considered to represent the most relevant state of the art It described the insertion of a single class II MHC-restricted epitope in TNF-alpha This construct elicited an immune response

The difference between D13 and present claim 18 is that it relates to a mutated IL-13 which provides a multiplicity of potential T cell epitopes, which retains the same conformation as said native protein

The problem to be solved by the present invention may therefore be regarded as to obtain a protein which is suitable to be used as effective immunogens in complex outbred populations for treating allergies

However, none of the document cited in the international search report, taken alone or in any combination, seems to suggest to solve the problem identified above, to design a chimeric protein as claimed in claim 18 Accordingly, claim 18 seems to involve an inventive step The same conclusion may be drawn starting from D14 or D15

- 4 3 The addition of an immunostimulatory oligonucleotide in pharmaceutical

compositions is a mere choice the skilled person would have envisaged without inventive activity, based on the content of D6, which describes immunomodulatory oligonucleotides containing unmethylated CpG dinucleotides used for stimulating an immune response in a subject (see abstract) Claims 24,25 lack accordingly an inventive step

- 4 4 D12 describes a method of inducing an immune response to a native self-antigen in a subject-matter comprising administering to the subject an effective amount of a heterologous or altered antigen corresponding to the native self-antigen and under the conditions that induce an immune response to the native self-antigen The mere identification of epitopes by means of sequence comparisons between analogous (e g self and analogous) proteins and the subsequent use of these analogous epitopes for the purpose of obtaining an immune response against a self antigen having integrated these foreign related epitopes is trivial Thus, claim 25 is obvious

5 Remarks

Clarity (Article 6 PCT)

It is emphasized that a mouse cytokine or B-cell epitope may also be derived from human cytokine or B-cell epitope The human primary origin of a product, i e "being derived from" covers product that are of human origin and have been mutated to ultimately encompass prior art mouse product

It has been noticed that the wording of the claims 1-3 includes vaccine which are eliciting auto-immune diseases

It is underlined that a first medical use may be allowable only if a known product has not yet been used in therapy

In new claim 27, no therapeutic application has been provided The expression IL-13 mediated disease amount essentially to the identification of a mechanism of action which is renders the scope of protection claimed unclear It is not even clear to what extent IL-13 has to be involved

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No PCT/GB02/00900

~~63~~
63

It is in addition stressed that an analogous protein does not have a unique definition in the art. Is said protein analogous in length, in activity, in weight or amino acid composition etc. Accordingly it renders the scope of protection of claims using such a wording obscure.

64

Claims (as amended 28/03/03)

1 Use of a chimaeric recombinant protein having B-cell epitopes from a self-protein of a first mammalian species and a mutation that gives rise to a sequence of an analogous protein of a mammalian species which is different from said first mammalian species, such that the protein is able to raise an immune response that recognises the natural protein from which the B-cell epitopes are derived in the first mammalian species, in the manufacture of a vaccine for breaking B-cell tolerance and thereby raising an immune response against said self protein in said first mammalian species

2 Use of a chimaeric recombinant protein having B-cell epitopes of a self-protein of a first mammalian species which are grafted, by substitution, into a framework of an analogous protein from a second mammalian species such that the protein is able to raise in the species in which the B-cell epitopes are derived, an immune response that recognises the natural protein from which the B-cell epitopes are derived, in the manufacture of a vaccine for breaking B-cell tolerance and thereby raising an immune response against said self protein in said first mammalian species

3 Use as claimed in any of claims 1 or 2, the protein comprising conserved surface region, and a mutation introduced into the non-surface exposed region, said mutation giving rise to a sequence of an analogous protein such that the protein is able to raise an immune response to the self protein in the species from which the self-protein is derived, in the manufacture of a vaccine for breaking B-cell tolerance and thereby raising an immune response against said self protein in said first mammalian species

4 Use as claimed in any one of claims 1 to 3 wherein the protein is a human protein and the amino acid sequence thereof is mutated to give rise to a sequence of more than 5 contiguous amino acids from an analogous non-human protein, and also wherein said mutation replaces more than one amino acid of the native human

58
65

amino acid sequence in each non-surface exposed region of the human protein and is not present in residues which are surface residues in the native folded active protein in aqueous solution under physiological conditions

5 Use as claimed in any one of claims 1 to 4 wherein the immune response is a neutralising antibody response

6 Use as claimed in any of claims 1 to 5 wherein the protein, or B-cell epitope is derived from a human cytokine

7 Use as claimed in claim 6, wherein the human cytokine is a 4-helical cytokine

8 Use as claimed in claim 7 wherein the human cytokine is IL-4 or IL-13

9 Use as claimed in claim 8 wherein the human cytokine is IL-13 and the vaccine is for the treatment of asthma

10 A recombinant chimaeric protein comprising the amino acid sequence of a human protein wherein the amino acid sequence has been mutated to give rise to a sequence of more than 5 contiguous amino acids from an analogous non-human protein, and also wherein more than one amino acid of the native human sequence is replaced in each non-surface exposed region of the human protein and not in residues which are surface residues in native folded active protein in aqueous solution under physiological conditions

11 A recombinant protein as claimed in claim 10 wherein the human protein amino acid sequence has been mutated to substitute the non-surface exposed regions of the human protein with the equivalent sequences from an analogous non-human protein whilst conserving the surface exposed B cell epitopes

12 A recombinant protein as claimed in claim 10 or 11, wherein the human protein is IL-4

13 A recombinant protein as claimed in claim 10 or 11 wherein the human protein is IL-13

14 A recombinant mutated human – IL-13 as claimed in claim 13, having one or more of the following substitutions or a substitution involving a conservative substitution thereof

R	→	K	at	position	30
V	→	S	at	position	37
Y	→	F	at	position	63
A	→	V	at	position	65
E	→	D	at	position	68
E	→	Y	at	position	80
K	→	R	at	position	81
M	→	I	at	position	85
G	→	H	at	position	87
Q	→	H	at	position	113
V	→	I	at	position	115
D	→	K	at	position	117

15 A mutated human IL-13 as claimed in claim 14 having a plurality of the listed substitutions

16 A recombinant mutated human as claimed in claim 14, comprising all of the listed substitutions or a substitution involving a conservative substitution thereof

17 A mutated human IL-13 as claimed in claim 12, having one or more of the following sequences

L K E L I E E L S N

67/10

F C V A L D S L

A I Y R T Q R I L H G

K I E V A H F I T K L L

or a variant of said sequence comprising one or more conservative substitutions

18 A mutated human IL-13 as claimed in claim 17 having the sequence shown in figure 9

19 A polynucleotide encoding a protein of claims 10 to 18

20 A polynucleotide of claim 19 which is a DNA and is operably linked to a promoter

21 A vector comprising a polynucleotide of claim 19 or 20

22 A host transformed with a polynucleotide of claim 19 or 20 or vector of claim 21

23 A vaccine composition comprising , a protein, polynucleotide, or vector as claimed in any of claims 10 to 22 with a pharmaceutically acceptable carrier or excipient, for use in medicine

24 A vaccine composition as claimed in claim 23 further comprising an immunostimulatory oligonucleotide

25 A vaccine composition as claimed in claim 24 wherein the immunostimulatory oligonucleotide is selected from the group

OLIGO 1(SEQ ID NO 1) TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826)

AMENDED SHEET

68 21

OLIGO 2 (SEQ ID NO 2) TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758)

OLIGO 3 (SEQ ID NO 3) ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG

OLIGO 4 (SEQ ID NO 4) TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006)

OLIGO 5 (SEQ ID NO 5) TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668)

26 Use of a protein as claimed in claims 10 or 11 in the manufacture of a vaccine for breaking B-cell tolerance and thereby raising an immune response against said self antigen in a human

27 Use of a protein as claimed in any of claims 12 to 18 in the manufacture of a medicament for the treatment of IL-13 mediated diseases

28 Use as claimed in claim 27 for the treatment of asthma

29 A method for the treatment of prophylaxis of IL-13 mediated disease comprising the administration of a safe and effective amount of composition according to claim 21 to a patient in need thereof

30 A method for the preparation of a protein according to any of claims 10 to 11 which method comprises

1 Identification of one or more regions of a self, typically human, protein against which an antibody response is desired

2 Identification of the amino-acid sequence of the self protein

3 Identification of the amino-acid sequence of an analogous protein

construction by recombinant DNA techniques of a chimaeric molecule containing at least one target region identified in step 1, whose amino-acid sequence is taken from the sequence identified in step 2, and

sufficient amino-acids from the sequence(s) identified in step 3 to enable the resulting protein to fold into a shape similar to that of the self protein such that the mutated protein can raise an immune response that recognises the self protein

61-22

31 A method for producing a self protein vaccine for breaking B-cell tolerance and raising an immune response against a self antigen in a human comprising (a) taking a human protein, and (b) mutating the human protein amino acid sequence to give rise to a sequence of more than 5 contiguous amino acids from an analogous non-human protein, and also wherein more than one amino acid of the native human sequence is replaced in each non-surface exposed region of the human protein and not in residues which are surface residues in native folded active protein in aqueous solution under physiological conditions

32 A method for producing a self protein vaccine as claimed in claim 31, comprising (a) taking a human protein, and (b) substituting non-surface exposed amino acids with the equivalent amino acids from an analogous protein from a non-human mammalian species whilst conserving the surface exposed B-cell epitopes

33 A method for producing a self vaccine comprising the manufacture of a chimaeric recombinant protein comprising conserved surface regions of a human protein, and a mutation introduced into a non-surface exposed region, said mutation giving rise to a sequence of an analogous protein such that the protein is able to raise an immune response to the human protein in a human, and formulating said chimaeric recombinant antigen into a vaccine formulation

34 Use of a polynucleotide, or vector comprising said polynucleotide, encoding the chimaeric recombinant protein described in any one of claims 1 to 3, in the manufacture of a vaccine for breaking B-cell tolerance

AMENDED SHEET

VACUNA

RESUMEN – OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un polipéptido aislado, útil en la inmunización contra auto-antígenos. En particular, la invención se refiere a una auto-proteína que es capaz de elevar auto-anticuerpos cuando se administra *in vivo*. La invención se refiere particularmente a la conversión de citocinas humanas inmunogénicas en humanas. La invención se refiere además a composiciones farmacéuticas que comprenden tales compuestos y sus usos en la medicina y los métodos para su producción.

VACUNA

La presente invención se refiere a un polipéptido aislado, útil en la inmunización contra auto-antígenos. En particular, la invención se refiere a una auto-proteína que es capaz de elevar los auto-anticuerpos cuando se administra *in vivo*. La invención se refiere particularmente a la conversión de citocinas humanas inmunogénicas en humanas. La invención se refiere además a composiciones farmacéuticas que comprenden tales compuestos y su uso en la medicina y a los métodos para su producción.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El asma es una enfermedad crónica del pulmón originada por inflamación de las vías aéreas inferiores y se caracteriza por recurrentes problemas de respiración. Las vías aéreas de los pacientes son sensibles y se dilatan o inflaman hasta cierto grado todo el tiempo, incluso cuando no existen síntomas. La inflamación da como resultado el angostamiento de las vías aéreas y reduce el flujo de aire hacia el interior y exterior de los pulmones, haciendo difícil la respiración y conduciendo al jadeo, tensión del pecho y tos. El asma se activa por super-sensibilidad hacia alérgenos (por ejemplo, ácaros de polvo, pólenes, moho), irritantes (por ejemplo, humo, emanaciones, olores fuertes), infecciones respiratorias, ejercicio y clima seco. Los activadores irritan las vías aéreas y el revestimiento de las vías aéreas se dilata para volverse incluso más inflamado, el moco obstruye entonces la vía aérea y los músculos

72/28

alrededor de las vías aéreas se tensan hasta que la respiración se vuelve difícil y estresante y aparecen los síntomas de asma

COPD es un término amplio para describir enfermedades del tracto respiratorio, que muestra síntomas similares al asma y se trata con los mismos fármacos. COPD se caracteriza por una obstrucción del flujo de aire crónica, progresiva y enormemente irreversible. La contribución del individuo al curso de la enfermedad se desconoce, pero el fumar cigarrillos se piensa que origina el 90% de los casos. Los síntomas incluyen tos, bronquitis crónica, quedarse sin aliento e infecciones respiratorias. Finalmente, la enfermedad conduce a una severa discapacidad y a la muerte.

Como resultado de diversos problemas asociados con la producción, administración y tolerancia de anticuerpos monoclonales, existe un interés incrementado sobre métodos para la instrucción al propio sistema inmune del paciente a generar anticuerpos endógenos de la especificidad adecuada por medio de vacunación. Sin embargo, los mamíferos generalmente no tienen anticuerpos de título elevado contra auto-proteínas presentes en suero, ya que el sistema inmune contiene mecanismos homeostáticos para prevenir su formación. La importancia de estos mecanismos de tolerancia se ilustra por enfermedades como la miastenia grave, en la cual los auto-anticuerpos dirigidos al receptor de acetilcolina nicotínica del músculo esquelético originan debilidad y fatiga (Drachman, 1994, *N Engl J Med* 330: 1797-1810). Por consiguiente, existe una necesidad de un enfoque de vacuna que sea capaz de proporcionar mecanismos de tolerancia a anticuerpos sin inducir patologías mediadas

por auto-anticuerpos

Se han diseñado varias técnicas con el propósito de romper la tolerancia a células B sin inducir necesariamente toxicidad auto-inmune no aceptable Sin embargo, todas tienen desventajas significativas

- 5 Una técnica involucra la degradación química ya sea de la auto-proteína (o péptidos derivados de ésta) hacia una proteína vehículo altamente inmunogénica, tal como hemocianina de limpeto clave (Anticuerpos "A Laboratory Manual" Harlow, E y Lane D, 1988 Cold Spring Harbor Press) Este enfoque es una variante del sistema vehículo
- 10 de hapteno ampliamente utilizado para elevar los anticuerpos hasta objetivos escasamente inmunogénicos, tales como compuestos químicos de bajo peso molecular Sin embargo, el proceso de conjugación química puede destruir epítopos potencialmente valioso y gran parte de la respuesta de anticuerpos evocada se dirige a la proteína vehículo
- 15 Además, este enfoque es únicamente aplicable a la vacunación de proteínas y no es compatible con inmunógenos de ácido nucleico

- Una variante en la técnica de proteína vehículo involucra la construcción de un gen que codifica una proteína de fusión que comprende tanto la proteína vehículo (por ejemplo, proteína de núcleo de hepatitis B)
- 20 como también una auto-proteína (el antígeno de núcleo de virus de hepatitis B como un vehículo para péptidos inmunogénicos, Biological Chemistry, 380 (3) 277-83, 1999) El gen de fusión puede administrarse directamente como parte de una vacuna de ácido nucleico De manera alternativa, puede expresarse en una célula huésped adecuada *in vitro*,
- 25 purificarse el producto genético y suministrarse entonces como una vacuna

convencional, con o sin un adyuvante Sin embargo, la fusión de una proteína vehículo grande con la auto-proteína puede constreñir o distorsionar la conformación de la auto-proteína, reduciendo su eficiencia al evocar anticuerpos trans-reactivos con la molécula nativa También, como los sistemas de vehículo degradados, tradicionales, la mayor parte de la respuesta de los anticuerpos se dirige a la parte de vehículo de la fusión Las respuestas anti-vehículo pueden limitar la eficacia de las administraciones de refuerzo, subsecuentes, de la vacuna o incrementar la oportunidad de reacciones alérgicas o anafiláticas

10 Un enfoque más refinado se ha descrito por Dalum y colegas en donde una sola clase II de epítipo restringido por MHC se inserta en la molécula objetivo Demostraron el uso de este método para inducir anticuerpos hacia ubiquitina (Dalum *et al* , 1996, *J Immunol* 157 4796-4804, Dalum *et al* , 1997, *Mol Immunol* 34 1113-1120) y la citosina TNF
15 (Dalum *et al* , 1999, *Nature Biotech* 17 666-669) Como resultado, toda la ayuda de células T debe surgir ya sea a partir de este epítipo único o a partir de secuencias de unión Aunque este enfoque puede funcionar bien en sujetos que poseen el alelo de clase II de MHC, adecuado, para los cuales se diseñó la vacuna, o incluso aquellos lo suficientemente
20 afortunados para tener moléculas de clase II capaces de unir epítopos de unión, en cualquier población de multiplicación por razas normal, tal como aquella típica de los humanos, habrá una porción significativa de la población para quienes no funcionará la vacuna Adicionalmente, ya que el epítipo insertado es típicamente proveniente de una proteína bastante
25 no relacionada, tal como ovalbumina o lisozima, es probable que la

7578

secuencia adicional interfiera hasta cierto grado con el doblado de la proteína objetivo, previniendo la adopción de una conformación completamente nativa de la proteína objetivo

En contraste con todo lo anterior, la presente invención proporciona una multiplicidad de epítopos de célula T potenciales, retiene aún la molécula objetivo en una conformación cercana a la forma nativa. Estas propiedades permiten que las vacunas de la presente invención sean inmunogénicas eficaces en poblaciones de multiplicación por razas complejas, tales como aquellas compuestas de pacientes humanos. Estas propiedades se logran mediante la conversión de una mutación en una auto-proteína para producir una secuencia en ese punto que puede encontrarse en una proteína análoga.

Varios documentos recientes han definido un papel crítico para la citosina Th2 IL-13 al manejar patología en el modelo de ovalbumina de asma alérgico (Wills-Karp *et al* , 1998, Gruning *et al* , 1998). En este trabajo, los ratones previamente sensibilizados a ovalbumina se inyectaron con un receptor IL-3 soluble que se une y neutraliza IL-13. La hiper-capacidad de respuesta de la vía aérea al problema de acetilcolina se extirpó por completo en el grupo tratado. El análisis histológico reveló que los ratones tratados habían revertido la metaplasia celular de glóbulo observada en los controles. En los experimentos complementarios, los niveles de IL-13 en el pulmón se elevaron por sobre-expresión en un ratón transgénico o por instalación de proteína en la tráquea en ratones de tipo silvestre. En ambos parámetros, se observaron la hiper-capacidad de respuesta de la vía aérea, la invasión eosinófila y la producción

7699

incrementada de moco (Zhu *et al* , 1999) Estos datos muestran que la actividad de IL-13 es tanto necesaria como suficiente para producir varias de las principales características clínicas y patológicas del asma alérgico en un modelo bien validado

5 Por consiguiente, una vacuna capaz de dirigir una respuesta neutralizante a IL-13 constituiría una terapia útil para el tratamiento de asma alérgico en humanos También tendría aplicación en el tratamiento de ciertos desórdenes relacionados con infección por helmintos (Brombacher, 2000) y enfermedades donde la producción de IL-13 se
10 implica en fibrosis (Chiaramonte *et al*, 1999), tal como enfermedad pulmonar obstructiva crónica La presente invención se dirige a esta necesidad

Los conceptos y principios de la invención se establecen así con respecto a IL-13, pero pueden aplicarse a cualquier proteína de
15 mamífero que tiene una proteína análoga en una segunda especie

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un polipéptido aislado que es al menos 30% pero menos de 100% idéntico a una proteína humana,
20 cuyo polipéptido

- (a) contiene al menos una mutación que es característica de una proteína análoga no humana, y
- (b) es capaz de elevar anticuerpos en humanos y
- (c) es suficientemente similar de manera estructural a la
25 proteína humana para que los anticuerpos se unan tanto a la proteína

7/80

humana como al polipéptido, y

(d) en donde el polipéptido no es un anticuerpo

Por lo tanto, la invención proporciona en una modalidad, una proteína que tiene epítopos de célula B provenientes de un auto-antígeno
5 mamífero y una mutación que dan lugar a una secuencia de una proteína análoga de una segunda especie mamífera, de tal manera que la proteína es capaz de elevarse en las especies de las cuales se derivan los epítopos de célula B, una respuesta inmune que reconoce la proteína nativa de la cual se derivan los epítopos de célula B

10 Preferentemente, la secuencia de la proteína análoga es de más de 5, más preferentemente más de 8 amino ácidos contiguos. Por lo tanto, la proteína de la presente invención contiene una secuencia que es idéntica a la secuencia análoga para al menos 5, preferentemente al menos 8 amino ácidos consecutivos. En una modalidad alternativa, una
15 proteína se proporciona teniendo epítopos de célula B de una auto-proteína, los cuales se injertan por substitución, en una estructura de una proteína análoga de una segunda especie mamífera de tal manera que la proteína es capaz de elevarse en las especies de las cuales los epítopos de célula B derivan una respuesta inmune que reconoce la proteína natural
20 de las cuales se deriva los epítopos de célula B

Se apreciará que la proteína de la presente invención no son un anticuerpo

La respuesta inmune provocada es preferentemente una respuesta de anticuerpo, más preferentemente una respuesta de
25 anticuerpo neutralizante

2881

En general, la mutación se introduce preferentemente en la región expuesta no superficial de la molécula, de tal manera que se conservan las regiones expuestas superficiales. Las regiones expuestas superficiales son accesibles al sistema inmune y, en consecuencia, con frecuencia contienen epítopes de célula B. De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona una proteína que comprenden regiones expuestas superficiales, conservadas, de una auto-proteína y una mutación introducida en la región expuesta no superficial, dando lugar dicha mutación a una secuencia de una proteína análoga de tal manera que la proteína es capaz de provocar una respuesta inmune a la auto-proteína que se origina en la especie de la cual se deriva la auto-proteína.

La auto-proteína es preferentemente una proteína humana, pero puede ser una proteína de cualquier mamífero en la cual se desee elevar una respuesta auto-inmune. La respuesta inmune es preferentemente específica a la proteína nativa y al inmunogen de la invención. Es decir, tiene trans-reactividad mínima o capacidad neutralizadora con respecto a otras auto-proteínas.

El auto-antígeno es preferentemente una citosina, más preferentemente una citosina helicoidal 4, más preferentemente IL-4 o IL-3, más preferentemente IL-13. Por lo tanto, en una modalidad preferida de la presente invención, se proporciona una proteína quimérica que comprende epítopes de célula B proveniente de IL-13 Humana presentada en una estructura ósea IL-13 murino. Tal construcción es capaz de provocar una respuesta de anticuerpo anti-IL-13 específica en humanos. Tal construcción se muestra en la figura 9 (seq ID No 21 y 22). De

manera similar, una construcción IL-4 que comprende regiones IL-superficiales humanas y estructura de trabajo murino, se presenta en la figura 13 (Seq ID No 25)

La invención también proporciona

- 5 - un vector de expresión que comprende un polinucleótido de la invención y el cual es capaz de expresar un polipéptido de la invención,
- una célula huésped que comprende un vector de expresión de la invención,
- 10 - un método para producir un polipéptido de la invención, cuyo método comprende el mantenimiento de una célula huésped de la invención bajo condiciones adecuadas para la obtención de la expresión del polipéptido y el aislamiento de dicho polipéptido,
- una composición de vacuna que comprende un
- 15 polipéptido o polinucleótido de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable

En otro aspecto, la invención proporciona un método para el diseño y preparación de un polipéptido de acuerdo a la invención, cuyo método comprende

- 20 1 identificación de una o más regiones de una auto-proteína, típicamente humana, contra la cual se desea una respuesta de anticuerpo
- 2 identificación de la secuencia amino-ácida de la auto-proteína,
- 25 3 identificación de la secuencia amino ácida de una

construcción de proteína análoga mediante técnicas recombinantes de ADN de una molécula quimérica que contiene al menos una región objetiva identificada en la etapa 1, cuya secuencia amino ácida se toma de la secuencia identificada en la etapa 2, y

5 suficientes amino ácidos de la(s) secuencia(s) identificada(s) en la etapa 3 para permitir que la proteína resultante se doble en una forma similar a la de la auto-proteína de tal manera que la proteína mutada puede provocar una respuesta inmune que reconoce la auto-proteína

10

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

GST = glutathione S-transferasa, rmIL-13 = IL-13 de ratón recombinante, rhIL-13 = IL-13 humano recombinante, cIL-13 = IL-13 quimérico

15 Figura 1 Secuencia de construcción de vacuna IL-13, quimérica, de ratón Los símbolos amino ácidos subrayados denotan IL-13 humano de secuencia, los símbolos no modificados son de IL-13 murino

Figura 2 Análisis de GST cIL-13 por 4-20% Tris-glicina gel de SDS-PAGE (Novex), teñido para proteína total con Azul Coomassie

Figura 3 Análisis de manchado Western de GST-cIL-13

20 Figura 4 Análisis ELISA de cIL-13 e interacción de GST-cIL-13 con anticuerpo policlonal de anti-mIL-13, anticuerpo policlonal de anti-hIL-13 y anticuerpo policlonal de anti-GST

Figura 5 Análisis de ELISA de la interacción de cIL-13 y GST-cIL-13 con los receptores de mIL-13, mIL-13R α 1 Y mIL-13R α 2

25 Figura 6 Manchado Western de anti-fosfo-STAT6 de lisatos

4184

A549

Figura 7 Respuestas de anticuerpo inducidas por inmunización con GST-cIL-13 (ratón F5) o cIL-13 (Ratón E5)

Figura 8 Análisis de manchado Western de anti-fosfo-STAT6 de lisatos A549

Figura 9 Vacuna quimérica de IL-13 para utilizarse en humanos Los símbolos amino ácidos subrayados denotan la secuencia encontrada en IL-13 murino, los símbolos no modificados son de IL-13 humano

Figura 10 Los perfiles de anticuerpo de IL-13 de anti-ratón siguen la administración de cIL-13 en combinación con diversos adyuvantes

Figura 11 Capacidad de neutralización de suero de ratones después de la administración de cIL-13

Figura 12 cIL-13 alternativo para utilizarse como un inmunogen de ratón

Figura 13 IL-4 quimérico para utilizarse en vacuna de anti IL-4 humano

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

A través de toda esta especificación y las reivindicaciones anexas, a menos que el contexto lo requiera de otro modo, las palabras "comprende" e "incluye" o variaciones tales como "que comprende", "comprender", "que incluye", "incluir", etc , deben considerarse de manera inclusiva, es decir, el uso de estas palabras implicará la posible inclusión

de enteros o elementos no citados específicamente

Según se describe en la presente, la presente invención se refiere a polipéptidos aislados y polinucleótidos aislados. En el contexto de esta invención, el término "aislado" se intenta que comuniquen que el polipéptido o polinucleótido no se encuentra en su estado nativo, ya que se ha purificado al menos hasta cierto grado o se ha producido de manera sintética, por ejemplo, mediante métodos recombinantes o síntesis mecánica. Por consiguiente, el término "aislado" incluye la posibilidad de que los polipéptidos o polinucleótidos se encuentren en combinación con otro material biológico o no biológico, tal como células, suspensiones de células o fragmentos de células, proteínas, péptidos, vectores de expresión, solventes orgánicos o inorgánicos u otros materiales donde sea adecuado, pero excluye la situación donde el polinucleótido se encuentra en un estado según se encuentra en la naturaleza.

Una ventaja de la invención es que el polipéptido de la invención contiene regiones de, por ejemplo, la auto-proteína humana contra la cual se desea una respuesta de anticuerpo, en asociación con regiones características de una proteína análoga, las cuales son lo suficientemente diferentes de la proteína humana para proporcionar excelente ayuda de células T, pero aún se encuentran optimizadas por evolución para doblarse en una forma altamente similar a la proteína humana. Esto permite que se eleven los anticuerpos que reconocen el auto-antígeno. Típicamente, la respuesta inmune provocada incluye la elevación de una respuesta de anticuerpo neutralizante.

La proteína humana de acuerdo a la invención puede ser una

proteína de longitud completa codificada por el genoma humano o un dominio o sub-unidad de una proteína de longitud completa, codificada por el genoma humano. Cuando se desea elevar anticuerpos neutralizantes contra un dominio funcional del auto-antígeno – o puede prepararse un dominio de enlace a receptor de un antígeno quimérico que involucra solamente estas regiones. Por lo tanto, se conserva la región expuesta de tal dominio o los epítopes de célula B de tal dominio y la mutación de una proteína análoga se introduce en el epítope sin célula B o dominios expuestos superficiales.

10 El término "proteína" se intenta que incluya, por ejemplo, secuencias más cortas de residuos amino ácidos que pueden referirse como péptidos, tal como neuropéptidos. La proteína humana será típicamente el sujeto de la modificación post-traslacional, tal como la glicosilación, disociación proteolítica, fosforilación, y otras muy conocidas por aquellos expertos en el campo. La proteína humana es preferentemente una citosina, una hormona, factor de crecimiento o una proteína extracelular, más preferentemente una citosina 4-helicoidal, más preferentemente IL-13. Las citocinas incluyen, por ejemplo, IL1, IL2, IL3, IL-4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12, IL13, IL14, IL15, IL16, IL17, IL18, IL20, IL21, IL25, TNF, TGF, GMCSF, MCSF y OSM. Las citocinas 4-helicoidales incluyen IL2, IL3, IL-4, IL5, IL13, GMCSF y MCSF. Las hormonas incluyen, por ejemplo, hormona de luteinización (LH), hormona estimuladora de folículo (FSH), gonadotropina crónica (CG), VGH, Ghrelin, agutí, proteína relacionada con agutí y neuropéptido Y. Los factores de crecimiento incluyen, por ejemplo, VEGF. Las proteínas

15

20

25

extracelulares Incluyen, por ejemplo, APP o amiloide-B

Una proteína análoga es una que es ortóloga o paróloga a la auto-proteína, por ejemplo, proteína humana, en donde una proteína ortóloga puede rastrearse por descendencia hacia un ancestro común de los diferentes organismos y, por consiguiente, es probable llevar a cabo funciones conservadas similares en los diferentes organismos. Por lo tanto, un gen ortólogo significa genes que son de secuencia tan similar que se han originado de un solo gen ancestral y por lo tanto son un gen equivalente en una especie diferente y han evolucionado a partir de un ancestro común por especificación. En particular, la proteína ortóloga en humanos es una molécula estructuralmente equivalente en un mamífero no humano. Una proteína paróloga es una que aparece en más de una copia en un organismo dado mediante un evento de duplicación (Venter, Science, 1336, vol 292, 2001), es decir, una secuencia homóloga (que comparten ancestros evolucionarios comunes) que se han diversificado mediante duplicación genética. Preferentemente, la proteína análoga es un ortólogo. Una proteína ortóloga tendrá típicamente el mismo nombre que la proteína humana y típicamente llevará a cabo la misma función, por ejemplo, IL-13 murino es el ortólogo de IL-13 humano. La proteína análoga es típicamente mamífera o característica de las aves, por ejemplo, bovina, ovina, de roedores, tal como murino, porcina, de simios, felina, canina o humana. Preferentemente, la proteína análoga es murino. Por lo tanto, en el contexto de la presente invención, IL-13 murino es una proteína análoga (y ortóloga) a IL-13 humano. De manera similar, IL-4 de simio es una proteína análoga (y ortóloga) a IL-4 humano.

El polipéptido de la invención preferentemente comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o más mutaciones características de una proteína análoga. Más preferentemente, el polipéptido comprende al menos tres mutaciones. Cada mutación puede ser característica de la misma o de diferentes proteínas análogas. Por lo tanto, una primer mutación podría ser característica de un análogo murino y una segunda mutación podría ser característica de un análogo de simios. De acuerdo a una característica, el polipéptido comprende al menos tres mutaciones, donde cada mutación es característica de un análogo diferente. Sin embargo, preferentemente, cada mutación es característica del mismo análogo. Una mutación es un cambio en la secuencia amino ácida de la proteína e incluye, por ejemplo, omisiones, inserciones y substituciones. Preferentemente, la mutación es una substitución. Preferentemente, más de un amino ácido se reemplaza en cada región expuesta no superficial.

Una mutación que es característica de una proteína análoga es una que da como resultado la secuencia de la proteína humana que es de identidad más cercana a la secuencia de la proteína análoga después de que se ha hecho la mutación a la proteína humana. Por ejemplo, cuando la secuencia humana es ProProArgVal y el análogo murino tiene la secuencia ProProTyrVal, una mutación característica de la proteína análoga es substituir Arg por Tyr. Preferentemente, la mutación no se hace en residuos que son residuos superficiales en proteína activa, doblada, nativa, en solución acuosa bajo condiciones fisiológicas. Estos residuos superficiales, particularmente aquellos que forman estructuras en bucle, son con frecuencia epítopes de célula B y se prefiere que se

86.14

conserven todas esas regiones Las mutaciones así introducidas tienen la función de fraccionar la tolerancia de la auto-proteína y ser inmunogénicas en las especies de las que se deriva la proteína no mutada

En una modalidad, los polipéptidos de la invención son al menos 30% y menos de 100% idénticos a una proteína humana, preferentemente sobre la longitud total de la proteína humana Preferentemente, los polipéptidos son al menos 40%, por ejemplo al menos 50% idénticos a la proteína humana Más preferentemente, los polipéptidos son al menos 60%, por ejemplo, al menos 70% idénticos a la proteína humana Más preferentemente, los polipéptidos son al menos 85% idénticos a la proteína humana, por ejemplo, aproximadamente 90% idénticos Tales proteínas son capaces de provocar una respuesta inmune en humanos que reconocen la proteína humana

Por ejemplo, el Paquete UWGCG proporciona el programa BESTFIT que puede utilizarse para calcular homología (por ejemplo, usarse en sus parámetros por omisión) (Devereux *et al* (1984) *Nucleic Acids Research* 12, p387-395) Los algoritmos PILEUP y BLAST pueden utilizarse para calcular secuencias de homología o revestimiento (típicamente en sus parámetros por omisión), por ejemplo, como se describe en Altschul (1993) *J Mol Evol* 36 290-300, Altschul *et al* (1990) *J Mol Biol* 215 403-10

El software para llevar a cabo el análisis de BLAST se encuentra públicamente disponible a través del Centro Nacional de Información de Biotecnología (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) Este algoritmo involucra primero la identificación de un par de secuencia de alto

8740

puntaje (HSPs) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta que ya sea igual o satisfaga alguna T de puntuación de umbral de valor positivo cuando se alinee con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos T es referida como el umbral de puntuación de la palabra circundante (Altschul *et al.*, 1990) Estos golpes de palabra circundante inicial actúa como semilla para iniciar búsquedas a fin de encontrar HSPs que los contengan Los golpes de palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia siempre y cuando pueda incrementarse la puntuación de alineación acumulativa Las extensiones para los golpes de palabra en cada dirección se detienen cuando la puntuación de alineación acumulativa cae por la cantidad X de su máximo nivel logrado, la puntuación acumulativa se dirige a cero o por debajo, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos de puntuación negativa, o se llega al final de cualquier secuencia Los parámetros de algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación El programa BLAST utiliza como omisiones una longitud de palabra (W) de 11, las alineaciones de matriz de puntuación BLOSUM62 (ver Henikoff (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89 10915-10919) (B) de 50, la expectación (E) de 10, M = 5, N = 4 y una comparación de ambos filamentos, cuando el programa está siendo utilizado en polinucleótidos

El algoritmo BLAST lleva a cabo un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias, ver, por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) *Proc Natls Acad Sci USA* 90 5873-5787 Una medición de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad en suma ínfima

88
911

(P(N)) que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual ocurriría una igualdad entre dos secuencias nucleótidas o amino ácidas por oportunidad. Por ejemplo, una secuencia se considera similar a otra secuencia si la probabilidad en suma ínfima en comparación de la primer
5 secuencia con la segunda secuencia es de menos de aproximadamente 1, preferentemente menos de aproximadamente 0.1, más preferentemente menos de aproximadamente 0.01, y más preferentemente menos de aproximadamente 0.001.

El diseño exitoso de un polipéptido de acuerdo a la presente
10 invención puede verificarse por ejemplo demostrando que, cuando se expresa en una célula huésped adecuada, el polipéptido adopta una conformación lo suficientemente similar a la de la auto-proteína que generan los anticuerpos que son trans-reactivos con la auto-proteína nativa. Esto puede mostrarse mediante el uso de técnicas inmunológicas,
15 tal como enlace de anticuerpos monoclonales o policlonales en ELISA o mediante técnicas físico-químicas tales como dicroísmo circular o mediante técnicas cristalográficas tales como cristalografía de rayos X o mediante modelado por computadora, o mediante otros numerosos enfoques muy conocidos por aquellos expertos en la materia.

20 La confirmación adicional de un diseño exitoso puede obtenerse mediante la administración del polipéptido resultante en un auto-contexto en un régimen de vacuna adecuado y mediante la observación de que se inducen anticuerpos capaces de enlazar la proteína. Este enlace puede determinarse a través del uso de técnicas ELISA que
25 emplean proteína nativa purificada o recombinante, o a través de

81. 92

bloensayos que examinan el efecto de la proteína sobre una célula o tejido sensibles Una determinación particularmente favorecida es observar un fenómeno causalmente relacionado con la actividad de la proteína en el huésped intacto y determinar si la presencia de anticuerpos inducidos por los métodos de la invención modulan el fenómeno Por lo tanto, una proteína de la presente invención será capaz de provocar anticuerpos hacia el antígeno nativo en las especies de las cuales se deriva la proteína nativa

El polipéptido de la invención puede modificarse adicionalmente por mutación, por ejemplo, sustitución, inserción u omisión de amino ácidos con objeto de agregar propiedades deseables (tales como la adición de un identificador de secuencia que facilita la purificación o incrementa la inmunogenicidad) o retirar propiedades indeseables (tales como una actividad agonística no deseada en un receptor) o dominios de trans-membrana En particular, la presente invención contempla específicamente socios de fusión que facilitan la purificación tal como identificadores de poli histidina o socios de expresión GST que mejoran la expresión

En una modalidad preferida, se proporciona un IL-13 humano que tiene una o más de las siguientes mutaciones o una sustitución conservadora de la misma, característica de IL-13 de ratón La siguiente numeración se refiere a IL-13 expresada con su secuencia de señal en *E coli*

- R → K en posición 30
- V → S en posición 37

90.95

	Y	→	F	en	posición	63
	A	→	V	en	posición	65
	E	→	D	en	posición	68
	E	→	Y	en	posición	80
5	K	→	R	en	posición	81
	M	→	I	en	posición	85
	G	→	H	en	posición	87
	Q	→	H	en	posición	113
	V	→	I	en	posición	115
10	D	→	K	en	posición	117

Más preferentemente, el IL-13 humano comprende al menos, preferentemente al menos 3, 4, 5, 6 o más de las mutaciones anteriores o una sustitución conservadora de las mismas. Se prefiere que se presenten las doce mutaciones.

15 Una "sustitución conservadora" es una en la cual un amino ácido se substituye por otro amino ácido que tiene propiedades similares, de tal manera que un experto en la materia de química de péptidos esperaría que permanezcan substancialmente sin cambios la estructura secundaria y naturaleza hidropática del polipéptido.

20 Por ejemplo, ciertos amino ácidos pueden substituirse por otros amino ácidos en una estructura de proteína sin pérdida apreciable de capacidad de enlace interactivo con estructuras tales como, por ejemplo, regiones de enlace a antígeno de anticuerpos o sitios de enlace sobre moléculas de sustrato. Ya que son la capacidad y naturaleza interactivas

de una proteína lo que definen la actividad funcional biológica de esa proteína, ciertas substituciones de secuencia amino ácida pueden hacerse en una secuencia de proteína y, por supuesto, su secuencia codificadora de ADN sobresaliente y, no obstante, obtener una proteína con
5 propiedades similares Se contempla así que pueden hacerse diversos cambios en las secuencias péptidas de las composiciones expuestas o las secuencias de ADN correspondientes que codifican dichos péptidos sin pérdida apreciable de su utilidad o actividad biológica

Al hacer tales cambios, puede considerarse el índice
10 hidropático de amino ácidos La importancia del índice amino ácido hidropático en el otorgamiento de función biológica interactiva sobre una proteína se entiende generalmente en la materia (Kyte y Doolittle, 1982, incorporado en la presente para referencia) Se acepta que el carácter hidropático del amino ácido contribuye a la estructura secundaria de la
15 proteína resultante, lo cual a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, substratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos y lo similar A cada amino ácido se ha asignado un índice hidropático sobre la base de su capacidad hidrofóbica y características de carga (Kyte y Doolittle, 1982) Estos valores son
20 isoleucina (+4.5), valina (+4.2), leucina (+3.8), fenilalanina (+2.8), cisteína/cistina (+2.5), metionina (+1.9), alanina (+1.8), glicina (-0.4), treonina (-0.7), serina (-0.8), triptofano (-0.9), tirosina (-1.3), prolina (-1.6), histidina (-3.2), glutamato (-3.5), glutamina (-3.5), aspartato (-3.5), asparagina (-3.5), lisina (-3.9), y arginina (-4.5)

25 Se sabe en la materia que ciertos amino ácidos pueden

substituirse por otros amino ácidos que tienen un índice o puntuación hidropática similar y dar como resultado aún una proteína con actividad biológica similar, es decir, obtener aún una proteína equivalente funcionalmente biológica. Al hacer tales cambios, se prefiere la

5 substitución de amino ácidos cuyos índices hidropáticos se encuentran dentro de ± 2 , se prefieren particularmente aquellos dentro de ± 1 , y se prefieren incluso más particularmente aquellos dentro de ± 0.5 . También se entiende en la materia que la substitución de amino ácidos similares puede hacerse eficazmente sobre la base de capacidad hidrofílica. La

10 Patente de E U No 4,554,101 (específicamente incorporada en la presente para referencia en su totalidad), declara que la mayor capacidad hidrofílica promedio local de una proteína, según se ordena por la capacidad hidrofílica de sus amino ácidos adyacentes, se correlaciona con una propiedad biológica de la proteína.

15 Según se detalla en la Patente de E U No 4,554,101, los siguientes valores de capacidad hidrofílica se han asignado a residuos amino ácidos: arginina (+3.0), lisina (+3.0), aspartato (+3.0 $\pm$ 1), glutamato (+3.0 $\pm$ 1), serina (+0.3), asparagina (+0.2), glutamina (+0.2), glicina (0), treonina (-0.4), prolina (-0.5 $\pm$ 1), alanina (-0.5), histidina (-0.5), cisteína (-

20 1.0), metionina (-1.3), valina (-1.5), leucina (-1.8), isoleucina (-1.8), tirosina (-2.3), fenilalanina (-2.5), triptofano (-3.4). Se entiende que un amino ácido puede substituirse por otro que tiene un valor de capacidad hidrofílica similar y obtener aún una proteína biológicamente equivalente y, en particular, inmunológicamente equivalente. En tales cambios, se

25 prefiere la substitución de amino ácidos cuyos valores de capacidad

43 g/f

hidrofílica se encuentran dentro de ± 2 , se prefieren particularmente aquellos dentro de ± 1 , y se prefieren incluso más particularmente aquellos dentro de ± 0.5

Como se perfiló arriba, las substituciones amino ácidas generalmente se basan, por consiguiente, en la similitud relativa de los substitutos de cadena lateral amino ácida, por ejemplo, su capacidad hidrofóbica, capacidad hidrofílica, carga, tamaño y lo similar. Las substituciones ejemplificativas que toman en consideración varias de las características anteriores son muy conocidas por aquellos expertos en la materia e incluyen arginina y lisina, glutamato y aspartato, serina y treonina, glutamina y asparagina, y valina, leucina e isoleucina. Estas son substituciones conservadoras preferidas.

Las substituciones amino ácidas pueden hacerse además sobre la base de similitud en polaridad, carga, solubilidad, capacidad hidrofóbica, capacidad hidrofílica y/o la naturaleza anfipática de los residuos. Por ejemplo, los amino ácidos cargados negativamente incluyen ácido aspártico y ácido glutámico, los amino ácidos cargados positivamente incluyen lisina y arginina, y amino ácidos con grupos superiores polares sin carga que tienen valores similares de capacidad hidrofílica incluyen leucina, isoleucina y valina, glicina y alanina, asparagina y glutamina, y serina, treonina, fenilalanina y tirosina. Otros grupos de amino ácidos que pueden representar cambios conservadores incluyen (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr, (2) cys, ser, tyr, thr, (3) val, ile, leu, met, ala, phe, (4) lys, arg, his, y (5) phe, tyr, trp, his.

En una modalidad preferida, el IL-13 mutado de la presente

9497

Invención comprende una o más de las siguientes secuencias o una variante de las mismas que comprende una substitución conservadora

- | | | |
|---|--------------------------|---------------|
| | L K E L I E E L S N, | (SEQ ID No 1) |
| | F C V A L D S L, | (SEQ ID No 2) |
| 5 | A I Y R T Q R I L H G, | (SEQ ID No 3) |
| | K I E V A H F I T K L L, | (SEQ ID No 4) |

El polipéptido de la invención se codifica por polinucleótidos de la invención. Una persona experta en la materia será fácilmente capaz de determinar la secuencia del polinucleótido que codifica el polipéptido mediante la aplicación del código genético. Una vez que se ha determinado la secuencia de ácido nucleico requerida, el polinucleótido con la secuencia deseada puede producirse según se describe en los ejemplos. Una persona experta en la materia será fácilmente capaz de adaptar cualquier parámetro necesario, tal como cargas de inicio y condiciones de PCR. También se entenderá por una persona experta en la materia que, debido a la degeneración del código genético, existe potencialmente más de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la invención.

El polinucleótido de la invención es típicamente ARN, por ejemplo, mRNA o ADN, por ejemplo, ADN genómico, cADN o ADN sintético. Preferentemente, el polinucleótido es ADN. Particularmente, preferentemente es cADN.

La presente invención proporciona además un vector de expresión, el cual es una construcción de ácido nucleico, que comprende el polinucleótido de la invención. Adicionalmente, la construcción de ácido

nucleico comprenderá iniciadores, promotores, mejoradores y otros elementos adecuados, tal como, por ejemplo, señales de poliadenilación, que pueden ser necesarios y que se colocan en la orientación correcta con objeto de permitir la expresión proteínica dentro de una célula mamífera

5 El promotor puede ser un promotor eucariótico, por ejemplo, un promotor CD68, Gal1, Gal10, o promotor NMT1, un promotor procariótico, por ejemplo, Tac, Tcr o Lac, o un promotor viral, por ejemplo, el promotor de citomegalovirus, el promotor SV40, el promotor de polihedrina, el promotor P10 o el promotor LTR de virus sincitial
10 respiratorio Preferentemente, el promotor es un promotor viral Se prefiere particularmente cuando el promotor es el promotor casi inmediato de citomegalovirus, comprendiendo opcionalmente el exón 1 del gen IE HCMV

Los elementos reguladores transcripcionales pueden
15 comprender mejoradores, por ejemplo, la región no traducida 3' de antígeno superficial de hepatitis B, el mejorador de CMV, intrones, por ejemplo, el Intrón CD68 o el intrón A de CMV, o regiones reguladoras, por ejemplo, la región no traducida CMV 5'

El polinucleótido se enlaza preferentemente de manera
20 operable al promotor en la construcción de ácido nucleico de tal manera que cuando la construcción se inserta en una célula mamífera, el polinucleótido se expresa para producir un polipéptido codificado La estructura de la construcción de ácido nucleico puede ser ARN o ADN, por ejemplo, ADN plásmido, ADN viral, ADN bacteriano, ADN de cromosoma
25 artificial bacteriano, ADN de cromosoma artificial de levadura, ADN

sintético. También es posible que la construcción de ácido nucleico sea ácido nucleico artificial, por ejemplo, ARN o ADN de fosforotioato. Preferentemente, la construcción es ADN. Se prefiere particularmente cuando es ADN plásmido.

5 La presente invención proporciona además una célula huésped que comprende un vector de expresión de la invención. Tales células incluyen mayores líneas celulares eucarióticas transitorias o preferentemente estables, tal como células mamíferas o células de insectos, utilizando, por ejemplo, un sistema de expresión de baculovirus, 10 células eucarióticas inferiores, tal como células de levadura o procarióticas tales como células bacterianas. Los ejemplos particulares de células que pueden modificarse por inserción de vectores que codifican un polipéptido de acuerdo a la invención incluyen células mamíferas de HEK293T, CHO, HeLa, NSO y COS. Preferentemente, la línea celular seleccionada será 15 una que no solamente sea estable, sino que también permita la glicosilación madura de un polipéptido. La expresión puede lograrse en oocitos transformados. Un polipéptido de la invención puede expresarse en células de un animal no humano transgénico, preferentemente un ratón o expresarse en la leche de animales mayores, tales como cabras, 20 borregos y vacas. Un animal no humano, transgénico, que expresa un polipéptido de la invención se incluye dentro del alcance de la invención. Un polipéptido de la invención también puede expresarse en oocitos *Xenopus laevis*.

La presente invención también incluye composiciones 25 farmacéuticas o de vacuna que comprenden una cantidad terapéuticamente

eficaz de construcción de ácido nucleico o polipéptido de la invención, opcionalmente en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferentemente en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable tal como solución salina regulada con fosfato (PBS), solución salina, dextrosa, agua, glicerol, etanol, liposomas o combinaciones de los mismos. La composición de vacuna puede comprender de manera alternativa una cantidad terapéuticamente eficaz de una construcción de ácido nucleico de la invención, formulada sobre perlas de metal, preferentemente perlas de oro. La composición de vacuna de la invención también puede comprender un adyuvante, tal como, por ejemplo, en una modalidad, imiquimod, tucaresol o alumbre.

Se prefieren las formulaciones adyuvantes de proteína ya que estas inducen respuestas de anticuerpo de título elevado.

Preferentemente, el adyuvante se administra al mismo tiempo que la invención y en las modalidades preferidas se formulan en conjunto. Tales agentes adyuvantes contemplados por la invención incluyen, pero sin ser esta lista de ninguna manera exhaustiva y sin evitar otros agentes imidazoquinolinas sintéticas tales como imiquimod [S-26308, R-837], (Harrison *et al*, 'Reduction of recurrent HSV disease using imiquimod alone or combined with a glycoprotein vaccine', Vacuna 19 1820-1826, (2001)), y resiquimod [S-28463, R-848 'Comparison with CpG ODN', Inmunología Celular 204 64-74 (2000)). Las bases de desplazamiento de carbonilos y aminos que se expresan de manera constitutiva en células que presentan antígeno y superficies de célula T, tales como tucaresol (Rodhes, J *et al* 'Therapeutic potentiation of the immune system by

costimulatory Schiff-base-forming drugs', *Naturaleza* 377 71-75 (1995)),
 citocina, quimlocina y moléculas co-estimuladores, inductores de Th1 tales
 como Interferon gamma, IL-2, IL-12, IL-15 e IL-18, inductores de Th2 tales
 como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 y otros genes de quimlocina y genes
 5 co-estimuladores tales como MCP-1, MIP-1 alfa, MIP-1 beta, RANTES,
 TCA-3, CD80, CD86 y CD40L, otros ligandos de dirección
 inmunoestimuladora tales como CTLA-4 y L-selectina, proteínas y péptidos
 estimuladores de apoptosis tales como Fas, (49), adyuvantes a base de
 lípidos sintéticos tales como vaxfectina (Reyes *et al* , 'Vaxfectin enhances
 10 antigen specific antibody titres and maintains Th1 type immune responses
 to plasmid DNA immunization', *Vacuna* 19 3778-3786) escualeno, alfa-
 tocoferol, polisorbato 80, DOPC y colesterol, endotoxina, [LPS], Beutler,
 B , Endotoxina, 'Toll-like receptor 4 and the afferent limb of innate
 immunity', *Opinión Actual en Microbiología* 3 23-30 (2000)), CpG oligo- y
 15 di-nucleótidos, Sato, Y *et al* , 'Immunostimulatory DNA sequences
 necessary for effective intradermal geneimmunization', *Ciencia* 273 (5273)
 352-354 (1996) Hemmi, H *et al* , 'A Toll-like receptor recognizes bacterial
 DNA', *Naturaleza* 408 740-745 (2000) y otros ligandos potenciales que
 activan los receptores Toll a fin de producir citosina inductoras de Th1, tal
 20 como lipoproteínas Micobacterianas sintéticas, proteína Micobacteriana
 p19, peptidoglicano, ácido teicóico y lípido A

Ciertos adyuvantes preferidos para producir una respuesta de
 tipo predominantemente Th1 incluyen, por ejemplo, un derivado de Lípido
 A tal como un lípido de monofosforilo A, o preferentemente lípido de
 25 monofosforilo 3-de-O-acilado A Los adyuvantes de MPL® se encuentran

disponibles en Corixa Corporation (Seattle, WA, ver, por ejemplo, Las Patentes de E U Nos 4,436,727, 4,877,611, 4,866,034 y 4,912,094) Los oligonucleótidos que contienen CpG (en los cuales el dinucleótido de CpG es no metilado) también inducen una respuesta predominantemente de

5 Th1 Tales oligonucleótidos son muy conocidos y se describen, por ejemplo, en WO 96/02555, WO 99/33488 y las Patentes de E U Nos 6,008,200 y 5,856,462 Las secuencias de ADN inmunoestimuladoras también se describen, por ejemplo, por Sato *et al*, *Science* 273 352, 1996 Otro adyuvante preferido comprende una saponina, tal como Quil A, 10 o derivados de la misma, incluyendo QS21 y QS7 (Aquila Biopharmaceuticals Inc, Framingham, MA), Escina, Digltonina, o saponinas de *Gypsophila* o *Chenopodium*

La presente Invención también proporciona métodos para el tratamiento o prevención de enfermedades mediadas por IL-13, cualquier 15 síntoma o enfermedad asociada con el mismo, que comprende la administración de una cantidad eficaz de una proteína, un polinucleótido, un vector o una composición farmacéutica de acuerdo a la Invención La administración de una composición farmacéutica puede tomar la forma de una o más dosis individuales, por ejemplo, en un régimen de vacunación 20 terapéutica de "refuerzo de carga de inicio" En ciertos casos, la vacunación de "carga de inicio" puede ser a través de suministro de ADN mediado por partículas de un polinucleótido de acuerdo a la presente invención, preferentemente incorporado en un vector derivado de plásmida y el "refuerzo" mediante la administración de un vector viral recombinante 25 que comprende la misma secuencia polinucleótida o reforzando con la

100
A02

proteína en adyuvante. Por el contrario, la imprimaición puede ser con el vector viral o con una formulación de proteína, típicamente una proteína formulada en adyuvante y el refuerzo con una vacuna de ADN de la presente invención.

5 Para el tratamiento de enfermedades mediadas por auto-antígeno, por ejemplo, IL-13, se prefiere que el adyuvante sea un inductor preferible de una respuesta TH-1. En particular, el adyuvante comprende un oligonucleótido de CpG inmunoestimulador, tal como se expone en (WO96102555). Los oligonucleótidos inmunoestimuladores típicos se
10 encontrarán entre 8-100 bases de longitud y comprenden la fórmula general $X_1 \text{ CpGX}_2$ donde X_1 y X_2 son bases nucleótidas y la C y G son no metilados.

 Los oligonucleótidos preferidos para utilizarse en adyuvantes o vacunas de la presente invención preferentemente contienen dos o más
15 motivos de CpG dinucleótidos, preferentemente separados por al menos tres, más preferentemente al menos seis o más nucleótidos. Los oligonucleótidos de la presente invención son típicamente deoxinucleótidos. En una modalidad preferida, el internucleótido en el oligonucleótido es fosforoditioato o más preferentemente un enlace de
20 fosforotioato, aunque el fosfodiéster y otros enlaces internucleótidos se encuentran dentro del alcance de la invención, incluyendo oligonucleótidos con enlaces internucleótidos mezclados, por ejemplo, fosforotioato/fosfodiésteres mezclados. Otros enlaces internucleótidos que estabilizan el oligonucleótido pueden utilizarse. Los métodos para la
25 producción de oligonucleótidos de fosforotioato o fosforoditioato se

101 104

describen en US5,666,153, US5,278,302 y WO95/26204

Los ejemplos de oligonucleótidos preferidos tienen las siguientes secuencias. Las secuencias preferentemente contienen enlaces internucleótidos modificados de fosfotioato

- 5 OLIGO 1 TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826) (SEQ ID NO 5)
OLIGO 2 TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758) (SEQ ID NO 6)
OLIGO 3 ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG (SEQ ID NO 7)
OLIGO 4 TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006) (SEQ ID NO 8)
OLIGO 5 TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668) (SEQ ID NO 9)

- 10 Los oligonucleótidos de CpG alternativos pueden comprender las secuencias preferidas anteriores ya que tienen omisiones o adiciones sin consecuencia para los mismos. Los oligonucleótidos de CpG utilizados en la presente invención pueden sintetizarse mediante cualquier método conocido en la materia (por ejemplo, EP 468520). Convenientemente,
15 tales oligonucleótidos pueden sintetizarse mediante el uso de un sintetizador automatizado. Una formulación adyuvante que contiene oligonucleótido de CpG puede adquirirse en QIAGEN bajo el nombre comercial "ImmunEasy".

- Las composiciones de la presente invención pueden utilizarse
20 tanto para profilaxis como también para terapia. La presente invención proporciona un polipéptido o un polinucleótido de acuerdo a la invención, para utilizarse en medicina. La invención proporciona además el uso de un polipéptido o polinucleótido de la invención en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de alergias, enfermedades respiratorias
25 tales como asma y COPD, desórdenes relacionados con infección por

helminchos, fibrosis o cirrosis del hígado

La presente invención también proporciona un método de vacunación que comprende la administración de una cantidad eficaz de una composición de vacuna de la invención a un paciente y que provoca
5 una respuesta inmune a la composición de vacuna

La presente invención también proporciona composiciones de vacuna según se describe en la presente para uso en vacunación de un mamífero contra desórdenes mediados por IL-13 tales como alergias, enfermedades respiratorias, desórdenes relacionados con infección por
10 helmintos, fibrosis y cirrosis del hígado Las enfermedades respiratorias incluyen, por ejemplo, asma, tal como asma alérgico, y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) Específicamente, una composición de vacuna capaz de dirigir una respuesta neutralizante a IL-13 constituiría, por consiguiente, un agente terapéutico útil en el tratamiento de asma,
15 particularmente asma alérgico, en humanos También tendría aplicación en el tratamiento de ciertos desórdenes relacionados con infección por helmintos (Brombacher, 2000 *Bioessays* 22 646-656) y enfermedades donde la producción de IL-13 se implica en fibrosis (Chiaramonte *et al* , 1999, *J Clin Inv* 104 777-785), tal como enfermedad pulmonar obstructiva
20 crónica (COPD) y cirrosis del hígado

Las composiciones de vacuna de la invención pueden administrarse en una variedad de maneras, por ejemplo, a través de las rutas mucosales, tal como oral y nasal, pulmonar, intramuscular, subcutánea o intradérmica Cuando el antígeno está por administrarse
25 como una vacuna a base de proteína, la vacuna se formulará típicamente

con un adyuvante y puede liofilizarse y volverse a suspender en agua para inyección antes de utilizarse. Tales composiciones pueden administrarse a un individuo como una composición inyectable, por ejemplo, como una dispersión acuosa estéril, preferentemente isotónica. Típicamente, tales composiciones se administrarán de manera intramuscular, pero son posibles otras rutas de administración.

Una técnica para administración intradérmica involucra el bombardeo de partículas (el cual también se conoce como tecnología de 'pistola genética' y se describe en la Patente de E U No 537015). Las proteínas pueden formularse con azúcares para formar pequeñas partículas o ADN que codifica el antígeno puede cubrirse sobre partículas inertes (tales como perlas de oro) y se aceleran a velocidades suficientes para permitirles penetrar una superficie de un recipiente (por ejemplo, piel), por ejemplo, por medio de descarga bajo presión elevada a partir de un dispositivo de proyección. (Las partículas cubiertas con construcciones de vacuna de ácido nucleico de la invención y partículas de azúcar de proteína se encuentran dentro del alcance de la presente invención, ya que son dispositivos cargados con tales partículas). Otros métodos para la administración de las construcciones de ácido nucleico o composiciones que contienen dichas construcciones directamente hacia un recipiente incluyen ultrasonido, estimulación eléctrica, electroporación y microsembrado, los cuales se describen en la US-5,697,901.

Una construcción de ácido nucleico de la presente invención también puede administrarse por medio de vectores de suministro especializados, útiles en terapia genética. Los enfoques de terapia

104 107

genética se discuten por ejemplo por Verme *et al* , Naturaleza 1997, 389
239-242 Pueden utilizarse ambos sistemas viral y no viral Los sistemas
a base de virus incluyen retroviral, lentiviral, adenoviral, viral adeno-
asociado, herpes viral y sistemas a base de virus de vaccinia Los
5 sistemas de base no viral incluyen la administración directa de ácidos
nucleicos y sistemas a base de liposomas Por ejemplo, los vectores
pueden encapsularse por liposomas o dentro de partículas co-glicólidas
poliláctidas (PLG)

Una construcción de ácido nucleico de la presente invención
10 también puede administrarse por medio de células huésped transformadas
Tales células incluyen células recolectadas de un sujeto La construcción
de vacuna de ácido nucleico puede introducirse en tales células *in vitro* y
las células transformadas pueden regresarse posteriormente al sujeto La
construcción de ácido nucleico de la invención puede integrarse en ácido
15 nucleico ya presente en una célula mediante eventos de recombinación
homóloga Si se desea, una célula transformada puede desarrollarse *in*
vitro y una o más de las células resultantes puede utilizarse en la presente
invención Las células pueden proporcionarse en un sitio adecuado en un
paciente mediante técnicas conocidas de cirugía o microcirugía (por
20 ejemplo, injerto, micro-inyección, etc) Las células adecuadas incluyen
células dendríticas

La cantidad de composición de vacuna que se suministra
variará significativamente, dependiendo de la especie y peso del mamífero
que está siendo inmunizado, la naturaleza del estado de enfermedad que
25 se está tratando/contra la cual se protege, el protocolo de vacunación

adoptado (es decir, una sola administración *versus* dosis repetidas), la ruta de administración y la potencia y dosis del compuesto adyuvante seleccionado. En base a estas variables, un practicante médico o

veterinario será fácilmente capaz de determinar el nivel de dosis adecuado

5 pero puede ser, por ejemplo, cuando la vacuna es un ácido nucleico, que la dosis sea de 0.5-5 µg/kg de las construcciones de ácido nucleico o composición que las contiene. En particular, la dosis variará dependiendo de la ruta de administración. Por ejemplo, cuando se usa administración transdérmica en perlas de oro la dosis total se encontrará preferentemente
10 entre 1µg – 10ng, particularmente, la dosis total preferentemente se encontrará entre 10µg y 1ng. Cuando la construcción de ácido nucleico se administra directamente, la dosis total es generalmente mayor, por ejemplo, entre 50µg y 1 o más miligramos. Las dosis anteriores son ejemplificativas del caso promedio.

15 En una vacuna de proteína, la cantidad de proteína en cada dosis de vacuna se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos secundarios, adversos, significativos en los vacunados típicos. Tal cantidad variará dependiendo de cual inmunogen específico se utilice y de la manera como se presente.

20 Generalmente, se espera que cada dosis comprenda 1-1000 µg de proteína, preferentemente 1-500 µg, preferentemente 1-100 µg, más preferentemente 1 a 50 µg. Una cantidad óptima para una vacuna particular puede determinarse mediante estudios estándares que involucran la observación de respuestas inmunes adecuadas en sujetos
25 vacunados. Después de una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir

106/209

una o varias inmunizaciones de refuerzo adecuadamente separadas. Tal formulación de vacuna puede ser ya sea un régimen de vacunación por imprimación o de refuerzo, administrarse de manera sistémica, por ejemplo, a través de las rutas transdérmica, subcutánea o intramuscular o aplicarse a una superficie mucosal a través de, por ejemplo, rutas intranasal u oral.

Por supuesto, pueden existir casos individuales donde se ameriten rangos de dosis mayores o inferiores y tales se encuentran dentro del alcance de esta invención.

Es posible que la composición de vacuna se administre sobre una base de dosis única o se administre de manera repetida, por ejemplo, entre 1 y 7 veces, preferentemente entre 1 y 4 veces, a intervalos entre aproximadamente 1 día y aproximadamente 18 meses, preferentemente un mes. Esto puede seguirse opcionalmente mediante dosificación a intervalos regulares de entre 1 y 12 meses durante un periodo hasta por el resto de vida del paciente. En una modalidad, el paciente recibirá el antígeno en formas diferentes en un régimen de refuerzo de carga de inicio. Por lo tanto, un antígeno se administrará, por ejemplo, como una vacuna a base de ADN y subsecuentemente se administrará como una formulación a base de adyuvante de proteína. Sin embargo, una vez más este régimen de tratamiento variará significativamente dependiendo del tamaño y especie de animal a tratar, la cantidad de vacuna de ácido nucleico y/o composición de proteína administradas, la ruta de administración, la potencia y dosis de cualquier compuesto adyuvante utilizado y otros factores que serían aparentes a un experto practicante.

veterinario o médico

El siguiente ejemplo ilustra la teoría de la invención en ratones en vez de en humanos, a fin de que la proteína sea murino con mutaciones características de proteína humana, pero los resultados pueden extrapolarse fácilmente para el tratamiento de humanos donde la proteína tendrá epítopes de célula B de Humano con mutaciones características de un ratón, u otra proteína análoga

A través de todos los siguientes ejemplos de la invención, se hace uso de diversas técnicas ampliamente conocidas y practicadas en biología molecular y celular. Los detalles prácticos de estas pueden encontrarse en varios libros de texto, incluyendo Sambrook *et al* (1989, 2ª edición, Cold Spring Harbor Press Nueva York). Las secuencias o designaciones amino ácidas pueden darse ya sea en el código de una letra o el código de tres letras. El prefijo 'h' se utiliza para denotar una proteína o gen de origen humano, 'm', origen murino y 'c' una construcción quimérica. 'r' se utiliza para indicar una proteína recombinante.

Ejemplos

1 Diseño de una vacuna contra IL-13 murino

IL-13 pertenece a la familia de doblez de citocinas 4-helicoidales definidas por SCOP (Murzin *et al*, 1995, *J Mol Biol* 247: 536-540). Los miembros individuales de esta superfamilia de doblez se relacionan de manera estructural, pero son difíciles de alinear al nivel de secuencia. La estructura 3D de IL-13 aún no se ha determinado, pero las estructuras se han generado para varias otras citocinas 4-helicoidales.

Las alineaciones de secuencia de múltiples proteínas se generaron para ortólogos IL-13 y también para un número de otras citocinas que exhiben este doblez donde se ha determinado la estructura de al menos un miembro (IL-4, GM-CSF, IL-5 e IL-2). Las predicciones de estructura secundaria se llevaron a cabo para la alineación de secuencia de múltiples proteínas IL-13 mediante el uso de DSC (King y Sternberg, 1996, *Prot Sci* 5 2298-2310), SIMPA96 (Levin, 1997, *Prot Eng* 7 771-776) y Pred2ary (Chandonia y Karplus, 1995, *Prot Sci* 4 275-285). Las alineaciones de secuencia de múltiples proteínas de citosina, individuales, se alinearon entre sí mediante el uso tanto de la información de secuencia como de la información estructural (de las estructuras de cristal conocidas y de la predicción de estructura secundaria).

Los sitios antigénicos, específicamente epítopos de célula B, se predijeron para IL-13 murino mediante el uso del software Cameleon (Oxford Molecular) y estos se representaron gráficamente en la estructura de IL-4 (número de acceso 1RCB en la base de datos Brookhaven) mediante el uso de la alineación de secuencia de múltiples proteínas para dar una idea de dónde podrían localizarse estructuralmente en IL-13. A partir de este análisis, se seleccionaron las regiones expuestas que tanto fueron potencialmente antigénicas como también se involucraron en el enlace a receptor.

A partir de este modelo, se diseñó una secuencia de IL-13 quimérica en la cual la secuencia de los bucles antigénicos predichos se tomó de IL-13 murino y la secuencia de las regiones estructurales predichas (predominantemente helicoidales) se tomó de IL-13 humano. El

propósito de este diseño era identificar epítopes objetivo de IL-13 murino contra los cuales podrían provocarse anticuerpos neutralizantes y para presentarlos en una estructura de trabajo que era estructuralmente similar a la proteína nativa, pero conteniendo aún suficiente variación de secuencia respecto a la proteína nativa (murino) para asegurar que uno o más epítopes auxiliares CD4 T se presenten. Las secuencias de ácido nucleico y proteína seleccionadas para este ejemplo de una vacuna quimérica de IL-13 se muestran en la figura 1 (SEQ ID NO 19 y 20). Las secuencias subrayadas corresponden a secuencias encontradas en el ortólogo humano. Doce amino ácidos se substituyeron para lograr la secuencia en la figura 1. Debe entenderse que la degeneración del código genético permite que muchas posibles secuencias de ácido nucleico codifiquen proteínas idénticas. Además, se apreciará que existen otros posibles diseños de vacuna quiméricos de IL-13 dentro del alcance de la invención, que tienen otras mutaciones ortólogas en áreas no expuestas.

1.2 Preparación de IL-13 quimérico

La secuencia de ADN quimérico de IL-13 (cIL-13) se sintetizó a partir de una serie de oligonucleótidos de ADN de sobreposición parcial, con las secuencias cIL-13-1 a cIL-13-6 mostradas en la Tabla 1. Estos oligos se anillaron y el ADN de cIL-13 se generó por un PCR con la especificación de ciclo de 94°C durante 1 minutos después de 25 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos. Después de 72°C durante 7 minutos y enfriamiento hasta 4°C se terminó. El producto de reacción comprendió una banda del tamaño esperado, 361 pares base, que se sub-clonaron en el vector de clonación.

T/A pCR2 1 (Invitrogen, Groningen, Paises Bajos) para generar pCR2 1-clL-13 Un fragmento digerido de clL-13 BamH1 y Xho1 de pCR2 1-clL_13 se sub-clonó entonces en los sitios BamH1 y Xho1 en pGEX4T3 (Amersham Pharmacia, Bucks, Reino Unido) generando pGEX4T3-clL-13/1

5 Al ordenar por secuencia la construcción pGEX4T3-clL-13/1 descubrimos 39 pares base extra de secuencia de ADN (derivados del vector pCR2 1) entre la secuencia para GST y clL-13 Para corregir esto, repetimos el PCR para clL-13 mediante el uso de pGEX4T3-clL-13/1 y cargas de inicio clL-13F nuevas y clL-13R El producto de PCR obtenido se clonó entonces
10 nuevamente en pGEX4T3 mediante el uso de sitios de restricción BamH1 y Xho1, a fin de generar el vector de expresión pGEX4T3-clL-13 La secuencia de esta construcción se verificó mediante ordenamiento en secuencia del terminador de dideoxi Este vector codifica una proteína de fusión genética que consiste en glutatona-S-transferasa y clL-13 (GST-clL-13)
15 clL-13) Los dos elementos de la proteína se enlazan por un separador corto que contiene el sitio de reconocimiento de trombina La proteína de fusión puede purificarse fácilmente mediante cromatografía de afinidad de sefarosa de glutatona y utilizarse entonces directamente, o una preparación de clL-13 libre producido por disociación con trombina

20 Tabla 1 Oligonucleótidos utilizados para construir IL-13 quimérico

Oligo	Secuencia (5'-3')
clL-13-1R (SEQ ID NO 10)	TGTGATGTTGACCAGCTCCTCAATGAGCTCCCTAAGGG TCAGAGGGAGAGACACAGATCTTGGCACCGGCCC
clL-13-2F (SEQ ID NO 11)	AGGAGCTGGTCAACATCACACAAGACCAGACTCCCCT GTGCAACGGCAGCATGGTATGGAGTGTGGACCTGGC

III #9

cIL-13-3R (SEQ ID NO 12)	GCAATTGGAGATGTTGGTCAGGGATTCCAGGGCTGCA CAGTACCCGCCAGCGGCCAGGTCCACACTCCATAC
cIL-13-4F (SEQ ID NO 13)	TGACCAACATCTCCAATTGCAATGCCATCGAGAAGACC CAGAGGATGCTGGGCGGACTCTGTAACCGCAAGGC
cIL-13-5R (SEQ ID NO 14)	AAACTGGGCCACCTCGATTTTGGTATCGGGGAGGCTG GAGACCGTAGTGGGGGCCTTGCGGTTACAGAGTCC
cIL-13-6F (SEQ ID NO 15)	AAATCGAGGTGGCCCAGTTTGTAAGGACCTGCTCAG CTACACAAAGCAACTGTTTCGCCACGGCCCCTTC
cIL-13F (SEQ ID NO 16)	CGCGGATTCGGGCCGGTGCCAAGATCTG
cIL-13R (SEQ ID NO 17)	CTCCGCTCGAGTCGACTTAGAAGGGGCCGTGGCGAAA
cIL-13F nuevo (SEQ ID NO 18)	CGCGGATCCGGGCCGGTGCCAAGATCTG

El vector de expresión pGEX4T3-cIL-13 se transformó en cepa BRL *E coli* (Novagen, suministrado por Cambridge Bioscience, Cambridge, Reino Unido) La expresión de GST-cIL-13 se indujo mediante la adición de 0.5 mM IPTG a un cultivo en la fase de crecimiento logarítmico durante 4 horas a 37°C Las bacterias se recolectaron después mediante centrifugación y GST-cIL-13 se purificó de ellas mediante un método previamente descrito para purificación de una proteína de fusión IL-13 de GST-humano, similar (McKenzie *et al* , 1993, *Proc Natl Acad Sci* 90 3735-

Caracterización de propiedades de cIL-13

Las muestras de GST-cIL-13 purificado se analizaron mediante electroforesis de SDS-PAGE. La figura 2 muestra que la preparación purificada contiene una proteína del tamaño esperado para GST-cIL-13.

5 La banda inferior representa una pequeña cantidad de GST, surgiendo debido a la disociación parcial de la proteína de fusión durante la preparación.

Para confirmar que la proteína purificada era GST-cIL-13, las muestras se separaron mediante SDS-PAGE, se mancharon sobre
10 membrana de PVDF y después se analizaron respecto a la presencia de IL-13 e inmuno-reactividad de GST mediante manchado Western. Ya que cIL-13 contiene secuencia que surge tanto de IL-13 humano como murino, se esperó que se reconocería mediante antisuero específico dirigido a IL-13 humano o IL-13 de ratón. Los manchados se bloquearon con 3% de
15 albúmina de suero bovino (BSA) en TBS (50 mM de hidrocloreto de Tris, 138 mM de cloruro de sodio, 2.7 mM de cloruro de potasio, pH 8.0) que contiene 0.05% de Tween-20 (TBST) durante la noche a 4°C, se incubó con anticuerpo primario durante 1 hora a temperatura ambiente (RT) con agitación, después se enjuagó 4 veces con TBST. Se agregó anticuerpo
20 secundario durante 1 hora a RT con agitación, antes de enjuagar 4 veces y desarrollar con Reactivo Quimioluminiscente de SuperSignal (Pierce, Rockford, Illinois, EUA).

La figura 3 (leyendas abajo) ilustra los resultados de este análisis, que indican que la proteína purificada se reconoce por
25 anticuerpos hacia IL-13 humano, IL-13 de ratón y GST, confirmando así la

estructura esperada

Hilera	Muestra	Anticuerpos Primario
1	GST-cIL-13	Anti-mIL-13
2	rhIL-13	Anti-mIL-13
3	rmIL-13	Anti-mIL-13
4	Marcadores	-
5	GST-cIL-13	Anti-hIL-13
6	rhIL-13	Anti-hIL-13
7	rmIL-13	Anti-hIL-13
8	Marcadores	-
9	GST-cIL-13	Anti-GST
10	rhIL-13	Anti-GST
11	rmIL-13	Anti-GST
12	GST	Anti-GST

Los anticuerpos primarios utilizados en este experimento fueron anti-hIL-13, número de catálogo AF-213-NA,R&D Systems, Abingdon, Oxford, Reino Unido, utilizado a 1 µg/ml, anti-mIL-13, número de catálogo 27-4590D, Pharmacia, utilizado a 1/200 Los anticuerpos secundarios utilizados en este experimento fueron IgG de anti-cabra conjugado con HRP, número de catálogo A-5420, Sigma-Aldrich Company, Ltd, Poole, Dorset, Reino Unido, utilizado a 1/40,000

Las muestras de proteína fueron GST-cIL-13, preparado como se describe en el Ejemplo 2, IL-13 humano recombinante (rhIL-13), número de catálogo CH1-013, Cambridge Bioscience, Cambridge, Reino Unido, IL-

14/10

13 de ratón recombinante (rmIL-13), número de catálogo 413-ML-025, R&D Systems y GST, preparado a partir de *E coli* transfectado con vector vacío de pGEX4T3 como se describe (Sambrook *et al* , 1989, 2ª edición, Cold Spring Harbor Press Nueva York)

5 1 3 Confirmación de IL-13 Quimérico

Para confirmar que GST-clL-13 adopta una conformación similar en solución a la de IL-13 nativo, las muestras de GST-clL-13 y clL-13 (generadas a partir de GST-clL-13 mediante disociación de trombina) se analizaron por ELISA. Las placas Maxisorp de 96 cavidades (Life Technologies Ltd , Paisley, Reino Unido) se cubrieron con clL-13, GST-clL-13, mlL-13, hlL-13 o gst en regulador de carbonato-bicarbonato, durante la noche a 4°C. Las placas se bloquearon entonces con 3% de BSA/TBST durante 1 hora a RT, se enjuagaron 3 veces en TBST, se incubaron con anticuerpo primario durante 1 hora a RT, después se enjuagaron 3 veces en TBST. El anticuerpo secundario se agregó durante 1 hora, se enjuagó tres veces en TBST, después se desarrolló con sustrato de peroxidasa de dicloruro de 0-fenilenediamina (OPD, Sigma Aldrich) durante 30 minutos. Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en este experimento fueron como se describe arriba. Como se muestra en la figura 4, GST-clL-13 y clL-13 se reconocieron específicamente por anticuerpos para IL-13 humano e IL-13 de ratón. Estos datos confirman que el proceso de quimerización no ha alterado en gran medida la conformación de proteína.

1 4 Enlace de IL-13 quimérico a receptores

Se establecieron ELISAs para determinar si clL-13 podría unirse a cualquiera de los receptores IL-13 de ratón conocidos (mlL-13R1

o mL-13R2) Las placas Maxisorp de 96 cavidades se cubrieron con IgG anti-humano (número de catálogo I-3382, Sigma Aldrich) en regulador de carbonato-bicarbonato durante la noche a 4°C Las placas se bloquearon entonces con 3% de BSA/TBST durante 1 hora a RT, se enjuagaron 3 veces en TBST y se incubaron con mL-13R1-Fc o mL-13R2-Fc (números de catálogo 491-IR-200 y 539-IR-100, respectivamente, Sistemas R&D) durante 1 hora a RT Después del enjuague, las placas se incubaron con diluciones de mL-13 o cIL-13 o GST-cIL-13 durante 1 hora a RT, se enjuagaron nuevamente y se incubaron con anti-mL-13 bioestañado (número de catálogo BAF413, R+D Systems) Después de enjuague e incubación adicionales con peroxidasa de rábano picante conjugada con estreptavidina, las placas se desarrollaron con substrato de peroxidasa de dihidrocloruro de 0-fenilenodiamina durante 30 minutos Como se muestra en la figura 5, cIL-13 y GST-cIL-13 son ambos capaces de enlazarse a cualquiera de los receptores mL-13 Nuevamente, estos datos confirman que el proceso de quimerización no ha alterado en gran medida la confirmación de proteína

1.5 Bloactividad de IL-13 quimérico

La bloactividad de GST-cIL-13 se determinó mediante la habilidad de esta proteína para fosforilar STAT6 en la línea celular de fibroblasto de pulmón humano A549 Estas células expresan el receptor IL-4 de tipo 2 humano que responde tanto a IL-4 como a IL-13 La estimulación de estas células con hIL-4, hIL-13 o mL-13 induce la fosforilación de la proteína de señalización STAT6 5x10⁵ células A549 se colocaron sobre placas en discos de cultivo de tejidos de 60 mm (Life

116.119

Technologies) y crecieron hasta 70% de confluencia Las células se incubaron entonces con entre 2 y 150 ng/ml de citosina o cIL-13 purificado durante 15 minutos a 37°C Debido a que la presencia de un socio de fusión GST puede alterar la bioactividad de las citocinas, el IL-13 quimérico se ensayó tanto como proteína de fusión GST-cIL-13 como también cIL-13 libre, liberado de la fusión mediante disociación de trombina A manera de control, también se examinaron rmlL-13 y GST Los lisatos celulares se prepararon y analizaron entonces mediante manchado Western respecto a la presencia de fosfo-STAT6 utilizado anticuerpo policlonal anti-fosfo-STAT6 de conejo (NEB, Hitchin, Herts, Reino Unido, Número de catálogo 9361S) Los manchados se bloquearon durante la noche en 5% de BSA/TBST (BSA debe ser A-7906 de Sigma como anticuerpo primario es fosfo-específico, 0.1% Tween-20), el anticuerpo primario se agregó a 1/1000 durante 1 hora a RT, después se enjuagó 3 veces con TBST El anticuerpo secundario conjugado con HRP de anti-conejo (A-4914, Sigma Aldrich) se agregó a 1/5000 durante 1 hora a RT, después se enjuagó 4 veces con TBST antes de desarrollarse con el Reactivo de ECL de sustrato quimioluminiscente de HRP (Amersham Pharmacia) Los resultados de este experimento se muestran en la figura 6

Cada hilera se cargó con la siguiente proteína

Hilera	Lisatos de células A549 tratadas con
1	50 ng/ml rmlL-13 (R&D Systems)
2	10 ng/ml rmlL-13 (R&D Systems)
3	2 ng/ml rmlL-13 (R&D Systems)

4	50 ng/ml cIL-13
5	10 ng/ml cIL-13
6	2 ng/ml cIL-13
7	150 ng/ml GST-cIL-13
8	30 ng/ml GST-cIL-13
9	6 ng/ml GST-cIL-13
10	Sin tratamiento
11	1 µg/ml GST
12	0.25 µg/ml GST
13	Marcadores de peso molecular

Los reactivos de proteína recombinante fueron como se describe en la Figura 3

El tratamiento de células A549 con 50 o 10 ng/ml (pero 2
5 ng/ml) de rIL-13 indujo la fosforilación de STAT6, indicando bioactividad. El tratamiento de células A549 con 50 ng/ml (pero no 10 ni 20 ng/ml) de cIL-13 indujo la fosforilación de STAT6, indicando bioactividad. De manera similar, 150 ng/ml de GST-cIL-13 (el cual es aproximadamente equivalente en términos molares a 50 ng/ml de cIL-13) es bioactivo, mientras que 30 y
10 6 ng/ml no lo son. Por consiguiente, cIL-13 es un agonista en este receptor, pero bajo estas condiciones experimentales es aproximadamente 5 veces menos bioactivo que rIL-13.

1.6 Inmunización con cIL-13

cIL-13 y GST-cIL-13 se utilizaron entonces como inmunógenos
15 para inducir la formación de auto-anticuerpos contra IL-13 de ratón en

118.121

ratones Balb/c A los ratones hembra de 6-8 semanas de edad se les dio una inyección subcutánea (sc) de aproximadamente 30 µg de proteína en adyuvante de Freund completo (CFA) en la base de la cola Esto fue seguido por tres inmunizaciones de refuerzo en el mismo sitio, 5 consistiendo cada una en aproximadamente 10 µg de proteína en adyuvante Incompleto de Freund [IFA] para refuerzos Cada grupo de tratamiento contuvo 5 animales y fueron Inmunizados de acuerdo al protocolo en la Tabla 2

Tabla 2

Grupo	Inmunización
A	Control de solución salina en CFA/IFA s/c
B	30/10 µg GST en CFA/IFA s/c
C	Sin ratón nativo Inmunizado
D	30/10 µg GST-hIL-13 en CFA/IFA s/c
E	30/10 µg cIL-13 en CFA/IFA s/c
F	30/10 µg GST-cIL-13 en CFA/IFA s/c

10

Día	Tratamiento
-12	Pre-sangrado
0	Inmunización primaria
14	1ª Inmunización de refuerzo
27	Sangrado de cola
42	Sangrado de cola
49	2ª Inmunización de refuerzo

70	Sangrado de cola
97	Sangrado de cola
99	3ª Inmunización de refuerzo
113	Sangrado de cola
140	Sangrado de cola

Las muestras de suero se obtuvieron mediante punción de vena de la vena de la cola en los puntos de tiempo especificados en la Tabla 2. Después de la separación por centrifugación, las muestras se ensayaron por ELISA respecto a la presencia de respuestas específicas de IgG a IL-13 de ratón, IL-13 humano y GST. Ninguno de los animales en los grupos A-D poseyó anticuerpos IL-13 de anti-ratón en ningún punto de tiempo. Todos los animales en los grupos B, D y F realizan una fuerte respuesta de IgG a GST (el grupo de animales E también elaboró fuertes respuestas de anticuerpo a GST, debido a que existía GST remanente en la muestra de cIL-13 utilizada para inmunizar estos ratones). Las respuestas de anticuerpo de IL-13 de anti-ratón se indujeron en cinco de cinco animales en el grupo F y cuatro de cinco animales en el grupo E. La figura 7 (a y b) muestra los análisis serológicos para uno de estos animales en el grupo F y uno de estos animales del grupo E 7b (gst – cIL-13 inmunizado y cIL-13 inmunizado, respectivamente). Los resultados indican que la inmunización con GST-Cil-13 o cIL-13 fue capaz de fracturar la tolerancia a mIL-13, generando anticuerpos de anti-mIL-13 de ratón.

El suero de dos ratones (F1d70 y F5d97) que tuvo fuertes respuestas de IgG de anti-mIL-13, se examinó respecto a la capacidad de

120145
123

neutralizar la bioactividad de rmIL-13 en el ensayo de A549/fosfo-STAT6
Se incubaron 20 ng/ml o 10 ng/ml de rmIL-13 (R&D Systems) con 1% de
suero en medio de cultivo de tejido RPMI libre de suero durante 15 minutos
a temperatura ambiente antes de una incubación de 15 minutos a 37°C con

5 células A549 Los lisatos celulares se prepararon y analizaron por
manchado Western respecto a la presencia de fosfo-STAT6 como se
describió previamente Como control negativo, el suero anti-hIL-13 se
obtuvo de un ratón Balb/c Inmunizado con GST-hIL-13 y mostró mediante
ELISA tener una fuerte respuesta IgG de anti-hIL-13, pero ningún
10 anticuerpo anti-mIL-13 Como control positivo, el suero de ratón normal se
elevó con un anticuerpo de anti-mIL-13 neutralizante (R&D Systems,
número de catálogo AF-413-NA) para dar una concentración final de 1
µg/ml

Los resultados de este experimento se muestran en la figura 8,
15 en la cual se examina lo siguiente

Hilera	Citocina	Anticuerpo
1	20 ng/ml rmIL-13	Suero de ratón normal
2	10 ng/ml rmIL-13	Suero de ratón normal
3	0 ng/ml rmIL-13	Suero de ratón normal
4	20 ng/ml rmIL-13	Muestra de suero F1d70
5	10 ng/ml rmIL-13	Muestra de suero F1d70
6	0 ng/ml rmIL-13	Muestra de suero F1d70
7	20 ng/ml rmIL-13	Suero de ratón anti-hIL-13
8	10 ng/ml rmIL-13	Suero de ratón anti-hIL-13

12/2/21

9	0 ng/ml rmlL-13	Suero de ratón anti-hiL-13
10	Marcadores de peso molecular	-
11	0 ng/ml rmlL-13	Suero de ratón normal+anti-miL-13
12	20 ng/ml rmlL-13	Muestra de suero F5d97
13	10 ng/ml rmlL-13	Muestra de suero F5d97
14	0 ng/ml rmlL-13	Muestra de suero F5d97
15	20 ng/ml rmlL-13	Suero de ratón normal+anti-miL-13
16	10 ng/ml rmlL-13	Suero de ratón normal+anti-miL-13

La inmunización con un inmunogen IL-13 quimérico de la invención induce la producción de auto-anticuerpos contra IL-13 de ratón, capaces de neutralizar la actividad biológica del IL-13 de ratón (hileras 4, 5, 12, 13) en una manera comparable al anticuerpo IL-13 anti-murino agregado de manera exógena (hileras 15, 16) Esta actividad no se presenta en suero de ratón normal (hileras 1, 2), ni en suero de animales inmunizados con GST-hiL-13 (hileras 7, 8)

Estos datos proporcionan una base para el tratamiento de mamíferos con una patología dependiente de IL-13 mediante su vacunación con ciL-13 y la inducción así de una actividad de anticuerpo neutralizante endógena

1 7 Construcciones alternativas

1 7 1 6 Diseños de ciL-13 Identificados his

GST-ciL-13 es proteína producida de manera bacteriana, es insoluble y requiere de solubilización y redoblez *in vitro* La cromatografía de exclusión por tamaño indica que el proceso de redoblado genera varias

12/25

formas dobladas de manera diferente, lo cual sugiere que una proporción de la respuesta inmune se dirige contra formas que pueden estar generando anticuerpos irrelevantes que no se enlazan a IL-13 de ratón nativo

5 Por consiguiente, este candidato puede no generar las más potentes respuestas de anticuerpo de IL-13 de anti-ratón, neutralizantes, posibles

 Por esta razón, se han clonado 6 his-clL-13 en un vector de expresión mamífera, el 6 his-clL-13 expresado en mamíferos es soluble y
10 no requiere de redoblamiento *in vitro*

 1 7 2 La figura 12 (SEQ ID NO 23 y 24) muestra un antígeno de vacuna donde se realizan diferentes mutaciones análogas. La proteína numera por secuencias de acuerdo a un esquema donde el residuo de glicina en la secuencia "GPVPR" es el residuo 1. Las secuencias
15 individuales subrayadas corresponden a regiones helicoidales predichas del modelo estructural revisado. Los residuos de doble subrayado en negro indican puntos en los cuales las mutaciones se incorporan en la secuencia de ratón

- 11 Leu de ratón cambió a Val (rata)
- 20 21 Ser de ratón cambió a Thr (no ortólogo)
- 63 Tyr de ratón cambió a Phe (no ortólogo)
- 71 Gly de ratón cambió a Ala (perro/cerdo/vaca)
- 100 Ser de ratón cambió a Thr (perro)
- 104 Gln de ratón cambió a Asn (no ortólogo)
- 25 108 His de ratón cambió a Arg (no ortólogo)

123126

1 8 Aplicación a terapia humana

La figura 9 muestra un posible antígeno de vacuna de acuerdo a la invención dirigida a la producción de anticuerpos de IL-13 anti-humano en humanos. Esto será útil para el tratamiento de enfermedades caracterizadas por IL-13 excesivo o inadecuado, por ejemplo, asma. La secuencia correspondiente a IL-13 de ratón se subraya. La construcción contiene doce substitutos amino ácidos que son análogos a IL-13 murino.

Estas son

10	R	→	K	en	posición	30
	V	→	S	en	posición	37
	Y	→	F	en	posición	63
	A	→	V	en	posición	65
	E	→	D	en	posición	68
15	E	→	Y	en	posición	80
	K	→	R	en	posición	81
	M	→	I	en	posición	85
	G	→	H	en	posición	87
	Q	→	H	en	posición	113
20	V	→	I	en	posición	115
	D	→	K	en	posición	117

La figura 13 (SEQ ID NO 25) muestra una posible vacuna para uso humano en base a IL-4 Quimérico. Es un ejemplo de una proteína de vacuna de IL-4 humano, quimérico. Los residuos amino ácidos subrayados

124 127

comprenden las regiones estructurales alfa-helicoidales y se derivan de IL-4 de ratón con la inclusión de amino ácido 21 en la primer hélice. Los símbolos planos indican residuos amino ácidos derivados de IL-4 humano. Las posiciones de las regiones alfa-helicoidales se toman de Zuegg, J et al (2001) Immunol and Cell Biol 79 332-339

Ejemplo 2 La respuesta inmune a GST-cIL-13 es específica para IL-13 de ratón y no trans-reacciona con IL-4 de ratón

Ya que el IL-13 de ratón es estructuralmente similar a IL-4 de ratón, el suero de un ratón inmunizado con GST-cIL-13 (que había demostrado contener auto-anticuerpos IL-13 de anti-ratón de título elevado) se analizó respecto a trans-reactividad con IL-4 de ratón mediante el uso de ELISA de IL-4 de anti-ratón y un bioensayo de neutralización de mL-4 *in vitro*

2.1 ELISA de IL-4 de anti-ratón

Las placas Maxisorp de 96 cavidades se cubrieron con anticuerpo monoclonal IL-4 de anti-ratón (Número de catálogo MAB404, R+D Systems) en regulador de carbonato-bicarbonato durante la noche a 4°C. Las placas se bloquearon entonces con 3% de BSA/TBST durante 1 hora a RT, se enjuagó 3 veces en TBST y se incubó con IL-4 de ratón (Número de catálogo 404-ML-005, R+D Systems) durante 1 hora a RT. Después de enjuagarse, las placas se incubaron con suero de ratón durante 1 hora a RT, se enjuagaron nuevamente y se incubaron con anticuerpo policlonal de IgG de anti-ratón conjugado con HRP (Número de catálogo A-9309, SIGMA). Después de un enjuague adicional, las placas

125 128

se desarrollaron con sustrato de peroxidasa de dihidrocloruro de 0-fenilenediamina durante 30 minutos

El nivel de anticuerpos de IL-4 de anti-ratón en el suero se expresó como un título de punto final El título de punto final se define como esa dilución de suero que es equivalente a dos veces la lectura
5 antecedente de ELISA

Ratón	Título de punto final de anticuerpo IL-4 de anti-ratón	Título de punto final de anticuerpo IL-13 de anti-ratón
C2 (muestra de suero tomada el día 125, después de 4 x dosis de vacuna de GST-clL-13)	1/900	1/80000

Un nivel muy bajo de trans-reactividad de IL-4 de ratón se detectó en esta muestra de suero En contraste, un título de punto final de anticuerpo IL-13 de anti-ratón mucho mayor se determinó previamente en
10 esta muestra de suero, utilizando un ELISA de anticuerpo IL-13 de anti-ratón El nivel de trans-reactividad de IL-4 de ratón determinado por este ELISA no se esperaba que tuviera efectos neutralizantes de IL-4 de ratón *in vivo* Esta muestra de suero se determinó para capacidad de
15 neutralización de IL-4 de ratón en un bioensayo de IL-4 de ratón *in vitro*

2 2 Bioensayo de neutralización de IL-4 de ratón *in vitro*

El IL-4 de ratón estimula la proliferación de las células CTLL *in vitro* Por lo tanto, se desarrolló un ensayo en estas células, para determinar la capacidad de neutralización de IL-4 de ratón de suero de
20 este ratón vacunado de GST-clL-13

Para medir la habilidad de suero de ratón para neutralizar la

bioactividad de ratón recombinante IL-4 en células CTLL de ratón (No de Cat 87031904, ECACC), 3 ng/ml de IL-4 de ratón recombinante se incubó con diversas concentraciones de suero por 1 hora a 37°C en una lámina de cultivo de tejido de 96 cavidades (Invitrogen) Siguiendo a este período de pre-incubación, se agregaron las células CTLL La mezcla de ensayo, que contiene diversas soluciones de suero, IL-4 de ratón recombinante y células CTLL, se incubó a 37°C por 70 horas en una incubadora de CO₂ húmedo El sustrato MTT (No de Cat G4000, Promega) se agregó durante las 4 horas finales de incubación, después de lo cual se detuvo la reacción con una solución ácida para solubilizar el producto formazan azul metabolizado La absorción de la solución en cada cavidad se leyó en un lector de lámina de 96 cavidades a 570 nm de longitud de onda

Note que este ensayo es solamente capaz de medir la capacidad de neutralización de IL-4 de ratón en diluciones de suero mayores a o equivalentes a 1/100 Las diluciones de suero menores a 1/100 inducen los efectos proliferativos no específicos en células CTLL

La capacidad del suero para neutralizar la bioactividad de IL-4 de ratón se expresó como, aquella dilución de suero requerida para neutralizar la bioactividad de una cantidad definida de IL-4 de ratón por 50% (=ND₅₀) Mientras más se requirió muestra de suero diluida, más potente fue la capacidad de neutralización

La concentración más alta de suero C2 de ratón probada fue un 1/1000 de dilución Esta no neutralizó la bioactividad de 3 ng/ml de IL-4 de ratón por 50%, por lo tanto, el ND₅₀ se expresa como <1/100 de dilución

127 128

Ratón	Capacidad de Neutralización de IL-4 de Ratón (ND₅₀)	Capacidad de Neutralización de IL-13 de Ratón (ND₅₀)
C2 (muestra de suero tomada en el día 125, post 4 x dosis de vacuna GST-cIL-13)	<1/100	1/5300

No se detectó capacidad de neutralización de IL-4 de ratón en esta muestra de suero en las diluciones de suero probado En contraste (cuando se determinó para la capacidad de neutralización de IL-13 de ratón), esta muestra de suero potencialmente neutralizó la bioactividad de IL-13 de ratón

Estos datos demuestran que a pesar de que un nivel muy bajo de reactividad cruzada de IL-4 de ratón puede medirse en el suero por una ELISA de anticuerpo de IL-4 de anti-ratón, no existe capacidad de neutralización de IL-4 de ratón asociada

2 3 Nuevo bloensayo de neutralización de IL-13 de ratón para determinar la capacidad de neutralización de IL-13 de ratón de las muestras de suero de ratón

Los datos de bioactividad GST-cIL-13 previa y la capacidad de neutralización de IL-13 de ratón se generaron utilizando una lectura de salida de fosforilación STAT-6 en células A549 Este ensayo es incómodo

131
178

y no es fácilmente dócil para la generación de datos cuantitativos. El IL-13 de ratón estimula la proliferación de células TF-1 *in vitro*. Por lo tanto, un ensayo se desarrolló en estas células para determinar la capacidad de neutralización de IL-13 de ratón de ratones vacunados por GST-cIL-13.

5 **2.4 Bioensayo de neutralización de IL-13 de ratón**

Para medir la habilidad del suero de ratón de neutralizar la bioactividad de IL-13 de ratón recombinante sobre células TF-1 humanas (obtenidas en alojamiento), 5 ng/ml de IL-13 de ratón recombinante se incubó con diversas concentraciones de suero por 1 hora a 37°C en una
10 lámina de cultivo de tejido de 96 cavidades (Invitrogen). Siguiendo a este período de pre-incubación, las células TF-1 se agregaron. La mezcla de ensayo, que contiene diversas diluciones de suero, IL-13 de ratón recombinante y células TF-1, se incubó a 37°C por 70 horas en una incubadora de CO₂ húmedo. El sustrato MTT (No de Cat G4000,
15 Promega) se agregó durante las 4 horas finales de incubación, después de lo cual se detuvo la reacción con una solución ácida para solubilizar el producto formando azul metabolizado. La absorción de la solución en cada cavidad se leyó en un lector de lámina de 96 cavidades a 570 nm de longitud de onda.

20 Note que este ensayo es solamente capaz de medir la capacidad de neutralización de IL-13 de ratón en diluciones de suero mayores a o equivalentes a 1/100. Las diluciones de suero menores a 1/100 inducen los efectos proliferativos no específicos en células TF-1.

La capacidad del suero para neutralizar la bioactividad de IL-
25 13 de ratón se expresó como, aquella dilución de suero requerida para

132
129

neutralizar la bioactividad de una cantidad definida de IL-13 de ratón por 50% (=ND₅₀) Mientras más se requirió muestra de suero diluida, más potente fue la capacidad de neutralización

La capacidad de neutralización de IL-13 de ratón de suero de ratones inmunizados por GST-clL-13 se midió por el método anterior Las respuestas de neutralización de IL-13 potentes se generaron, según se indica abajo

Ratón (muestras de suero tomadas en el día 125, post 4 x dosis de vacuna GST-clL-13)	Capacidad de Neutralización de IL-13 de Ratón (ND₅₀)
C1	1/1250
C2	1/5230
C3	1/523
C4	1/417
C5	1/1670

2 5 Determinación del nivel de neutralización de IL-13 de ratón requerida para eficacia en el modelo de asma de ratón de "problema de ovalbúmina"

Para punto de referencia, la potencia requerida de una autovacuna de IL-13 para tratamiento de asma, los ratones se trataron con diversas dosis de anticuerpo policlonal de IL-13 de anti-ratón de conejo (administrada pasivamente por inyección Intra-peritoneal) durante el problema de ovalbumina, en el modelo de asma de ratón de "problema de

11
133
50

olvabumina" Los parámetros de modelo tales como hiper-respuesta por
vía aérea (AHR), metaplasia de célula caliciforme (GCM) y contenido de
célula inflamatoria de pulmón se midieron al final de este experimento La
eficacia en este modelo se correlacionó a los niveles de neutralización de
5 IL-13 de ratón lograda en el suero de ratón El bioensayo de
neutralización de IL-13 de ratón se utilizó para determinar el nivel de
neutralización de IL-13 de ratón en muestras de suero

Grupo de Tratamiento (Dosis anticuerpo de IL-13 de anti-ratón de conejo pasivamente administrada)	Capacidad de Neutralización de IL-13 de Ratón (ND₅₀)
Dosis Más Alta	1/4100
Dosis Alta	1/2670
Dosis Media	1/476
Dosis Más Baja	1/207

Los grupos de tratamiento dadas las tres dosis más altas de
10 anticuerpo, se realizaron de igual forma Todos estos tres grupos
mostraron eficacia equivalente a (para AHR) o mejor que (para GCM) que
el tratamiento estándar de oro (dexametasona, administrada por la vía
intraperitoneal a 3 x 1 5 mg/kg) utilizado en este modelo La dosis "más
baja" del anticuerpo administrado, mostró eficacia en alguna parte entre
15 aquella de dexametasona y los grupo de control positivo "sin tratamiento"

Por lo tanto, el nivel de neutralización de IL-13 lograda en el
grupo de tratamiento de "dosis media", representa el umbral de potencia

131

requerido para una autovacuna de IL-13 en este modelo de animal. El umbral de potencia se define como el nivel más bajo de la neutralización de IL-13 en suero de ratón, requerido para mostrar 100% de eficacia en el modelo de asma (= ED₁₀₀). Por lo tanto, 1xED₁₀₀ es equivalente a un ND₅₀ de 1/476.

Importancia del umbral de potencia definido

El nivel de neutralización de IL-13 requerido para eficacia en el modelo de asma de ratón de "problema de ovalbumina" se ha definido anteriormente. Los niveles de neutralización de IL-13 inducida por GST-clL-13 en C1-3 y C5 de ratones, se encuentran en exceso del umbral de potencia requerido para eficacia en el modelo de asma. Estos resultados se muestran en la Figura 11.

Por lo tanto, la vacuna GST-clL-13 podría esperarse que muestre eficacia en el modelo de asma de ratón.

Ejemplo 3 Configuración de Inmunogenicidad de GST-clL-13 en combinación con diversos adyuvantes

3.1 Protocolo de inmunización

Se utilizó GST-clL-13 como un inmunogen para inducir la formación de auto-anticuerpos contra IL-13 de ratón en ratones Balb/c. A los ratones hembra de 6-8 semanas de edad se les dio una inyección de aproximadamente 100 µg de proteína en adyuvante. Esto se siguió por cuatro inmunizaciones reforzadoras cada una consistiendo de 50 µg de proteína en adyuvante (Ver abajo para formulaciones de Inmunogen + adyuvante). Cada grupo de tratamiento contuvo 5 animales, inmunizados de acuerdo al protocolo en la tabla de abajo.

135
132

Las muestras de suero se obtuvieron por venepuntura de la vena de cola en los puntos finales especificados Después de la clarificación por centrifugación, las muestras se ensayaron por ELISA para la presencia de respuestas de IgG específicas a ratón IL-13

Grupo	Inmunización
A	GST-clL-13 en AS03 i/m
B	GST-clL-13 en Alumbre i/p
C	GST-clL-13 en "Inmuno-Fácil" i/m
D	GST-clL-13 en CFA/IFA s/c
E	GST-clL-13 en PBS s/c
F	Sin inmunizaciones

5

Día	Tratamiento
-7	Pre-sangrado
0	Inmunización Primaria
21	1ª inmunización de refuerzo
35	Sangrado de Cola
49	2ª inmunización de refuerzo
63	Sangrado de Cola
77	3ª inmunización de refuerzo
92	Sangrado de Cola
106	4ª Inmunización de refuerzo
125	Sangrado de Cola

133/26

3 2 Inmunogen + formulación de adyuvante

Preparación de adyuvante de emulsión AS03

Tween 80 se disolvió en salina regulada por fosfato (PBS) para dar un 2% de solución en el PBS. Para proporcionar 100 ml de emulsión de concentrado de dos pliegues, se arremolinan completamente 5 g de alfa tocoferol DL y 5 mL de triterpeno. La emulsión resultante se paso así a través de una jeringa y finalmente se microfluidizó al utilizar una máquina de microfluídicos M110S. Las gotículas de aceite resultantes tienen un tamaño de aproximadamente 180 nm.

10 Mezclar el adyuvante 1:1 con solución de proteína, arremolinar brevemente (10 segundos a velocidad media) e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente sobre un agitador orbital. Arremolinar brevemente antes de la inyección y administrar 100 µL de suspensión total por ratón por la vía intramuscular en 2 sitios separados (es decir, 2 x 10 µL por ratón, una inyección en cada músculo cuádriceps). Preparar en fresco antes de cada inmunización.

Alumbre

Suministrado por SIGMA (No de Catálogo No A-1577)

Preparar una suspensión de 2 mg/ml de alumbre en PBS. Mezclar el adyuvante 1:1 con solución de proteína, arremolinar brevemente e incubar, 20 agitar suavemente por 10 minutos a temperatura ambiente. Arremolinar brevemente antes de la inyección y administrar 100 µL de suspensión total por ratón i/p. Preparar en fresco antes de cada inmunización.

CpG – Inmuno-Fácil

25 Suministrado por Qiagen (No de Catálogo 303101). Mezclar

132
134

el recipiente de depósito por remolino suave, después mezclar el adyuvante 1:1 con proteína por pipetar suavemente arriba y abajo 5 veces. Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos. Pipetar suavemente la mezcla arriba y abajo 5 veces y administrar 100 µl de suspensión por ratón por la vía intramuscular en 2 sitios separados (es decir, 2 x 50 µL por ratón, una inyección en cada músculo cuádriceps). Preparar en fresco antes de cada inmunización.

CFA/IFA

Suministrado por SIGMA (Nos. de Catálogo F-5881, F-5506)

- 10 Formular 1:1 con CFA pre-mezclado para el principal o IFA para refuerzos. Mezclar por remolino para asegurar una suspensión blanca a nivel con el CFA/IFA. Almacenar en hielo por al menos 30 mins. antes de utilizarse y mezclar por remolino completamente antes de dosificarse.

3.3 Respuestas de anticuerpo de IL-13 de anti-ratón

- 15 Las respuestas de anticuerpo de IL-13 de anti-ratón se monitorearon en las muestras de suero utilizando una ELISA de detección de anticuerpo de IL-13 de anti-ratón. Las láminas Maxisorp de 96 cavidades se revistieron con anticuerpo monoclonal de IL-13 de anti-ratón (No. de Cat. MAB, Sistemas R+D) en regulador de bicarbonato-carbonato durante la noche a 4°C. Las láminas se bloquearon así con 3% de BSA/TBST por 1 hora a TA, se lavaron con 3 veces en TBST, y se incubaron con IL-13 de ratón (No. de Catálogo 413-ML-025, Sistemas R+D) por 1 hora a TA. Después del lavado, las láminas se incubaron con suero de ratón por 1 hora a TA, se lavaron nuevamente y se incubaron con anticuerpo policlonal de IgG de anti-ratón conjugado de HRP (SIGMA, No.
- 20
- 25

138
135

de Catálogo No A-9309) Siguiendo al lavado adicional, las láminas se desarrollaron con sustrato de peroxidasa de dihidrocloruro de 0-fenilenodiamina por 30 minutos

El nivel de anticuerpos de IL-13 de anti-ratón en el suero se expresó como un título de punto final El título de punto final se define como aquella dilución de suero que es equivalente a dos veces la lectura anterior de ELISA

Ratón	Título de punto final de anticuerpo de IL-3 de anti-ratón			
	AS03	Alumbre	CpG	CFA/IFA
1	1/875	1/7250	1/67500	1/6750
2	1/9250	1/800	1/80000	1/975
3	1/160	1/9000	1/54000	1/6000
4	1/9000	1/6500	1/62500	1/16000
5	1/3600	1/10000	1/77500	1/31000

La Figura 10 ilustra las configuraciones de anticuerpo de IL-13 de anti-ratón en los diversos grupos de tratamiento en el día 125, para las muestras de suero diluidas en 1/100

Todos los cinco ratones inmunizados con GST-cIL-13 en combinación con adyuvante CpG provocaron fuertes respuestas de auto-anticuerpo de IL-13 de anti-ratón Esto es en contraste a los otros adyuvantes, en donde las respuestas fueron menos consistentes a lo largo de cada grupo, algunos ratones provocando a la vez respuestas más débiles

Estos resultados indican que el adyuvante CpG es mucho más

139
136

eficaz en provocar respuestas de auto-anticuerpo de IL-13 de anti-ratón de alto título consistentes en comparación a los otros adyuvantes probados

Estas muestras de suero se analizaron por la habilidad neutralizadora de IL-13 en un bioensayo de neutralización de IL-13 *in vitro*

5 **3 4 Capacidad de neutralización de IL-3**

Para medir la habilidad del suero de ratón de neutralizar la bioactividad de IL-13 de ratón recombinante sobre células TF-1 humanas (ATCC No de Catálogo CRL-2003), 5 ng/ml de IL-13 de ratón recombinante se incubó con diversas concentraciones de suero por 1 hora a 37°C en una lámina de cultivo de tejido de 96 cavidades (GibcoRL) Siguiendo a este período de pre-incubación, las células TF-1 se agregaron La mezcla de ensayo, que contiene diversas diluciones de suero, IL-13 de ratón recombinante y células TF-1, se incubó a 37°C por 70 horas en una incubadora de CO₂ húmedo El sustrato MTT (No de Cat G4000, 15 Promega) se agregó durante las 4 horas finales de incubación, después de lo cual se detuvo la reacción con una solución ácida para solubilizar el producto formazan azul metabolizado La absorción de la solución en cada cavidad se leyó en un lector de lámina de 96 cavidades a 570 nm de longitud de onda

20 Note que este ensayo es solamente capaz de medir la capacidad de neutralización de IL-13 de ratón en diluciones de suero mayores a o equivalentes a 1/100 Las diluciones de suero menores a 1/100 inducen los efectos proliferativos no específicos en células TF-1

25 La capacidad del suero para neutralizar la bioactividad de IL-13 de ratón se expresó como, aquella dilución de suero requerida para

140
137

neutralizar la bioactividad de 5 ng/ml de IL-13 de ratón por 50% (=ND₅₀)
Mientras más se requirió muestra de suero diluida, más potente fue la
capacidad de neutralización

La concentración más alta de suero de D5 de ratón probada
5 fue un 1/1000 de dilución Esta no neutralizó la bioactividad de 50 ng/ml
de IL-13 de ratón por 50%, por lo tanto, el ND₅₀ se expresa como <1/100
de dilución

Ratón (Muestras de suero tomadas en el día 125)	Capacidad de neutralización de IL-13 de Ratón (ND₅₀)
C1	1/1250
C2	1/5230
C3	1/523
C4	1/417
C5	1/1670
D5	<1/100

Las muestras de suero del día 125 de todos los cinco ratones
10 inmunizados con GST-cIL-13 en combinación con el adyuvante CpG, fueron
capaces de neutralizar potencialmente la bioactividad de IL-13 de ratón en
un bioensayo *in vitro* En contraste, la muestra de suero del día 125 de D5
de ratón (Inmunizado con GST-cIL-13 en CFA/IFA) fue incapaz de
neutralizar la bioactividad de IL-13 de ratón en todas las diluciones
15 probadas

144
138

Estos resultados indican que el adyuvante CpG es mucho más eficaz en provocar respuestas de auto-anticuerpo de IL-13 de anti-ratón neutralizadoras en comparación a los otros adyuvantes probados

REIVINDICACIONES

1 **Uso** de una proteína recombinante quimérica que tiene
epítopes de célula B provenientes de una auto-proteína de una primer
especie mamífera y una mutación que da lugar a una secuencia de una
5 proteína análoga de una especie mamífera que es diferente de dicha
primer especie mamífera, de tal manera que la proteína es capaz de
provocar una respuesta inmune que reconoce la proteína natural de la cual
se derivan los epítopes de célula B en la primer especie mamífera, en la
elaboración de una vacuna para fraccionar la tolerancia de células B y
10 provocar así una respuesta inmune contra dicha auto-proteína en dicha
primer especie mamífera

2 **Uso** de una proteína recombinante quimérica que tiene
epítopes de célula B provenientes de una auto-proteína de una primer
especie mamífera que se injertan, por substitución, en una estructura de
15 trabajo de una proteína análoga de una segunda especie mamífera, de tal
manera que la proteína es capaz de provocar en la especie de la cual se
derivan los epítopes de célula B, una respuesta inmune que reconoce la
proteína natural de la cual se derivan los epítopes de célula B, en la
elaboración de una vacuna para fraccionar la tolerancia de células B y
20 provocar así una respuesta inmune contra dicha auto-proteína en dicha
primer especie mamífera

3 **El uso** según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2,
caracterizado porque la proteína comprende una región superficial
conservada, y una mutación introducida en la región expuesta no
25 superficial, dando lugar dicha mutación a una secuencia de una proteína

K10 113

análoga de tal manera que la proteína es capaz de provocar una respuesta inmune a la auto-proteína en la especie de la cual se deriva la auto-proteína, en la elaboración de una vacuna para fraccionar la tolerancia de células B y provocar así una respuesta inmune contra dicha auto-proteína en dicha primer especie mamífera

5
4 El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la proteína es una proteína humana y la secuencia amino ácida de la misma se muta para dar lugar a una secuencia de más de 5 amino ácidos contiguos de una proteína no humana, análoga, y
10 también en donde dicha mutación reemplaza más de un amino ácido de la secuencia amino ácida humana, nativa en cada región expuesta no superficial de la proteína humana y no se presenta en residuos que son residuos superficiales en la proteína activa, doblada, nativa, en solución acuosa bajo condiciones fisiológicas

15 5 El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la respuesta inmune es una respuesta de anticuerpo neutralizante

6 El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque la proteína o epítipo de célula B se deriva de una
20 citosina humana

7 El uso según la reivindicación 6, caracterizado porque la citosina humana es una citosina 4-helicoidal

8 El uso según la reivindicación 7, caracterizado porque la citosina humana es IL-4 o IL-13

25 9 El uso según la reivindicación 8, caracterizado porque la

citostina humana es IL-13 y la vacuna es para el tratamiento de asma

10 ¹⁰ Una proteína quimérica recombinante caracterizada porque comprende la secuencia amino ácida de una proteína humana en donde la secuencia amino ácida se ha mutado para dar lugar a una
5 secuencia de más de 5 amino ácidos contiguos a partir de una proteína análoga, no humana, y también en donde más de un amino ácido de la secuencia humana nativa se reemplaza en cada región expuesta no superficial de la proteína humana y no en residuos que son residuos superficiales en proteína activa, doblada, nativa en solución acuosa bajo
10 condiciones fisiológicas

do Estruxa

¹¹ Una proteína recombinante según la reivindicación 10, caracterizada porque la secuencia amino ácida de proteína humana ha mutado para sustituir las regiones expuestas no superficiales de la proteína humana con las secuencias equivalentes de una proteína no
15 humana, análoga, mientras se conservan los epítopes de célula B expuestos, superficiales

do Estruxa

¹² Una proteína recombinante según la reivindicación 10 u
11, caracterizada porque la proteína humana es IL-4

do Estruxa?

¹³ Una proteína recombinante según la reivindicación 10 u
20 11, caracterizada porque la proteína humana es IL-13

Estruxa?

¹⁴ Un IL-13 humano, mutado, recombinante, según la reivindicación 13, que tiene una o más de las siguientes substituciones o una substitución que involucra una substitución conservadora de la misma

25 R → K en posición 30
V → S en posición 37

	Y	→	F	en	posición	63
	A	→	V	en	posición	65
	E	→	D	en	posición	68
	E	→	Y	en	posición	80
5	K	→	R	en	posición	81
	M	→	I	en	posición	85
	G	→	H	en	posición	87
	Q	→	H	en	posición	113
	V	→	I	en	posición	115
10	D	→	K	en	posición	117

15 Un IL-13 humano, mutado, según la reivindicación 14, caracterizado porque tiene una pluralidad de las sustituciones listadas *cla*

16 Un humano mutado, recombinante, según la reivindicación 14, caracterizado porque comprende todas las sustituciones listadas o una sustitución que involucra una sustitución conservadora de las mismas

17 Un IL-13 humano, mutado, según la reivindicación 12, caracterizado porque tiene una o más de las siguientes secuencias

20 F C V A L D S L
A I Y R, T Q R I L H G
K I E V A H F I T K L L

UT claudas no relacion estructural.

o una variante de dicha secuencia que comprende una o más sustituciones conservadoras

18 Un IL-13 humano, mutado, según la reivindicación 17,

caracterizado porque tiene la secuencia mostrada en la figura 9

fig 9? 143-146

18 Un polinucleótido que codifica una proteína según las reivindicaciones 10 a 18

20 Un polinucleótido según la reivindicación 19, caracterizado porque es un ADN y se enlaza de manera operable a un promotor

21 Un vector que comprende un polinucleótido según las reivindicaciones 19 o 20

22 Un huésped transformado con un polinucleótido según la reivindicación 19 o 20 o un vector según la reivindicación 21

23 Una composición de vacuna que comprende una proteína, polinucleótido o vector según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 10 a 22 con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, para utilizarse en medicina

24 Una composición de vacuna según la reivindicación 23, caracterizada porque comprende además un oligonucleótido inmunoestimulador

25 Una composición de vacuna según la reivindicación 24, caracterizada porque el oligonucleótido inmunoestimulador se selecciona a partir del grupo

OLIGO 1(SEQ ID NO 1) TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826)

OLIGO 2(SEQ ID NO 2) TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758)

OLIGO 3(SEQ ID NO 3) ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG

OLIGO 4(SEQ ID NO 4) TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006)

OLIGO 5(SEQ ID NO 5) TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668)

26 El uso de una proteína según las reivindicaciones 10 u 11 en la elaboración de una vacuna para fraccionar la tolerancia de célula B y provocar así una respuesta inmune contra dicho auto-antígeno en un humano

5 27 El uso de una proteína según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18 en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades mediadas por IL-13

28 El uso según la reivindicación 27 para el tratamiento de asma

10 29 Un método para el tratamiento de profilaxis de enfermedad mediada por IL-13, caracterizado porque comprende la administración de una cantidad segura y eficaz de una composición según la reivindicación 21 a un paciente que necesita la misma

15 30 Un método para la preparación de una proteína según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, cuyo método comprende

1 identificación de una o más regiones de una auto-proteína, típicamente humana, contra la cual se desea una respuesta de anticuerpo

2 identificación de la secuencia amino ácida de la auto-proteína

20 3 identificación de la secuencia amino ácida de una construcción de proteína análoga mediante técnicas de ADN recombinantes de una molécula quimérica que contiene al menos una región objetivo identificada en etapa 1, cuya secuencia amino ácida se toma de la secuencia identificada en la etapa 2, y

25 suficientes amino ácidos de la(s) secuencia(s) identificada(s)

N1

145:48

en la etapa 3 a fin de permitir que la proteína resultante se doble en una forma similar a la de la auto-proteína, de tal manera que la proteína mutada puede provocar una respuesta inmune que reconoce la auto-proteína

- 5 ~~31~~ Un método para la producción de una vacuna de auto-proteína para el fraccionamiento de tolerancia de célula B y para provocar una respuesta inmune contra un auto-antígeno en un humano, caracterizado porque comprende (a) tomar una proteína humana, y (b) mutar la secuencia amino ácida de la proteína humana para dar lugar a
- 10 una secuencia de más de 5 amino ácidos contiguos a partir de una proteína análoga no humana y también en donde más de un amino ácido de la secuencia humana nativa se reemplaza en cada región expuesta no superficial de la proteína humana y no en residuos que son residuos superficiales en proteína activa, doblada, nativa, en solución acuosa bajo
- 15 condiciones fisiológicas

- ~~32~~ Un método para la producción de una vacuna de auto-proteína según la reivindicación 31, caracterizado porque comprende (a) la toma de una proteína humana, y (b) sustituir los amino ácidos expuestos no superficiales con los amino ácidos equivalentes de una proteína análoga de una especie mamífera no humana mientras se conservan los epítopes de célula B expuestos, superficiales
- 20

- ~~33~~ Un método para la producción de una auto-vacuna, caracterizado porque comprende la elaboración de una proteína recombinante quimérica que comprende regiones superficiales
- 25 conservadas de una proteína humana, y una mutación introducida en una

NI
métodos
conocidos
en estado
arte

146.1
+44

región expuesta no-superficial, dando lugar dicha mutación a una respuesta inmune a la proteína humana en un humano y formulando dicho antígeno recombinante quimérico en una formulación de vacuna

- 34 El uso de un polinucleótido o vector que comprende
- 5 dicho polinucleótido, que codifica la proteína recombinante quimérica descrita en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la elaboración de una vacuna para fracturar tolerancia a células B

Figura 1

1 GGGCCCGTCCAGATCTGTGTCTCTGACCCCTTAGCGAGCTCATTGAGGAGCTG 60
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 G P V P R S V S L P L T L R E L I E E L

61 GTCAACATCACACAGACCAAGACTCCCTTGTCAACCGCAGCATGTATGGAGTGTGGAC 120
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 V E I T Q D Q T P L C H G S H V W S V D

121 CTGCCCCCTGGCGGTACTGTGCAGCCCTGGATCCCTGACCAACATCTCCAATTGCAT 180
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 L A A G S Y C A A L E S L T N I S H C N

181 GCCATCGAGAAAGACCCAGAGGATCTGGGCGGACTCTGTAAACCGCAAGCGCCCGACTACG 240
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 A I E K T Q R H L G G L C H R A A P T T

241 GTCTCGAGCTTCCCGATACCAAAATCGAGGTGGCCCAATTTGTAAAGGACCTGCTTAC 300
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 V S S L P D T E I E V A Q P V K D L L S

301 TACACAAGCAACTGTTTTCGCAAGCGCCCGCTTCTAA 336
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 Y T K Q L P R H G P P *

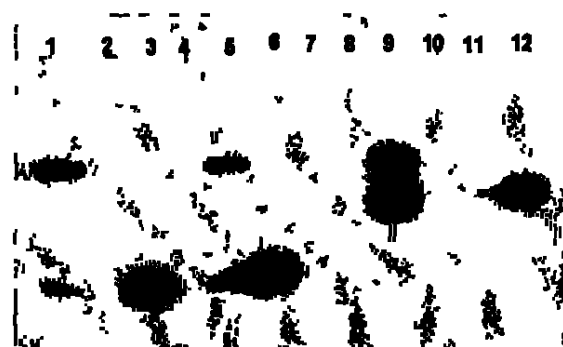
148

Figura 2



3/13

Figura 3



153
150

Figura 4.

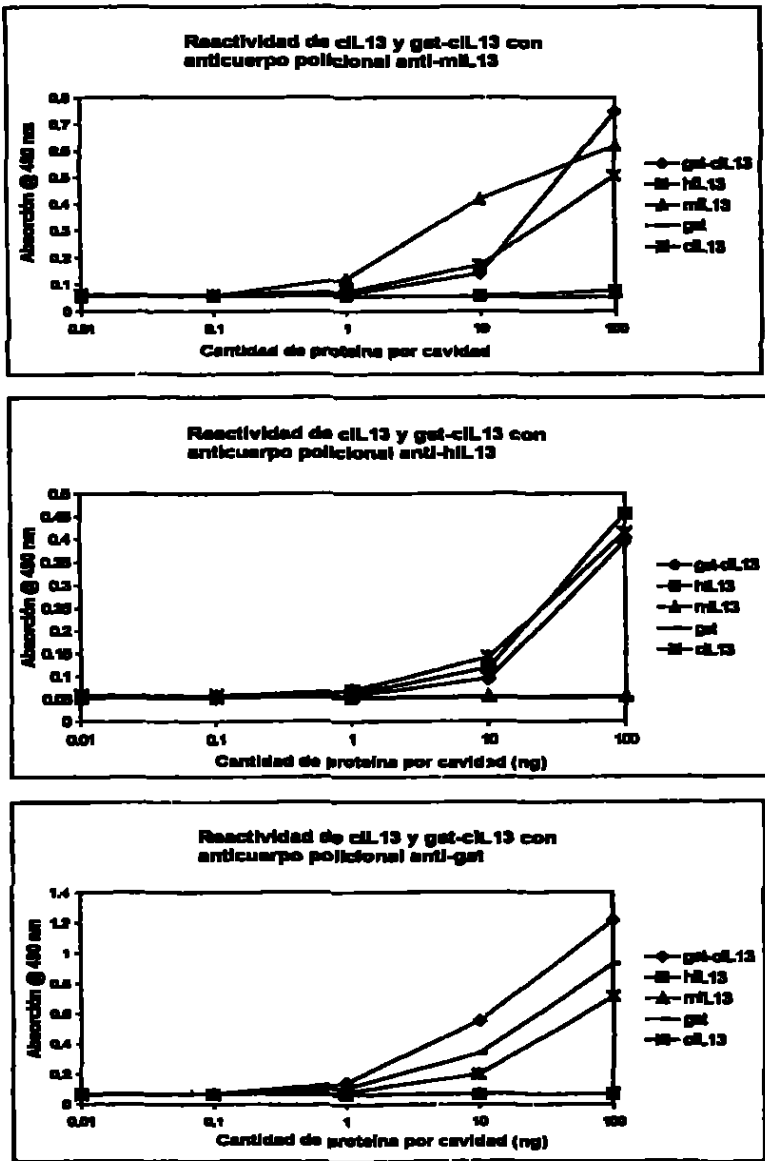
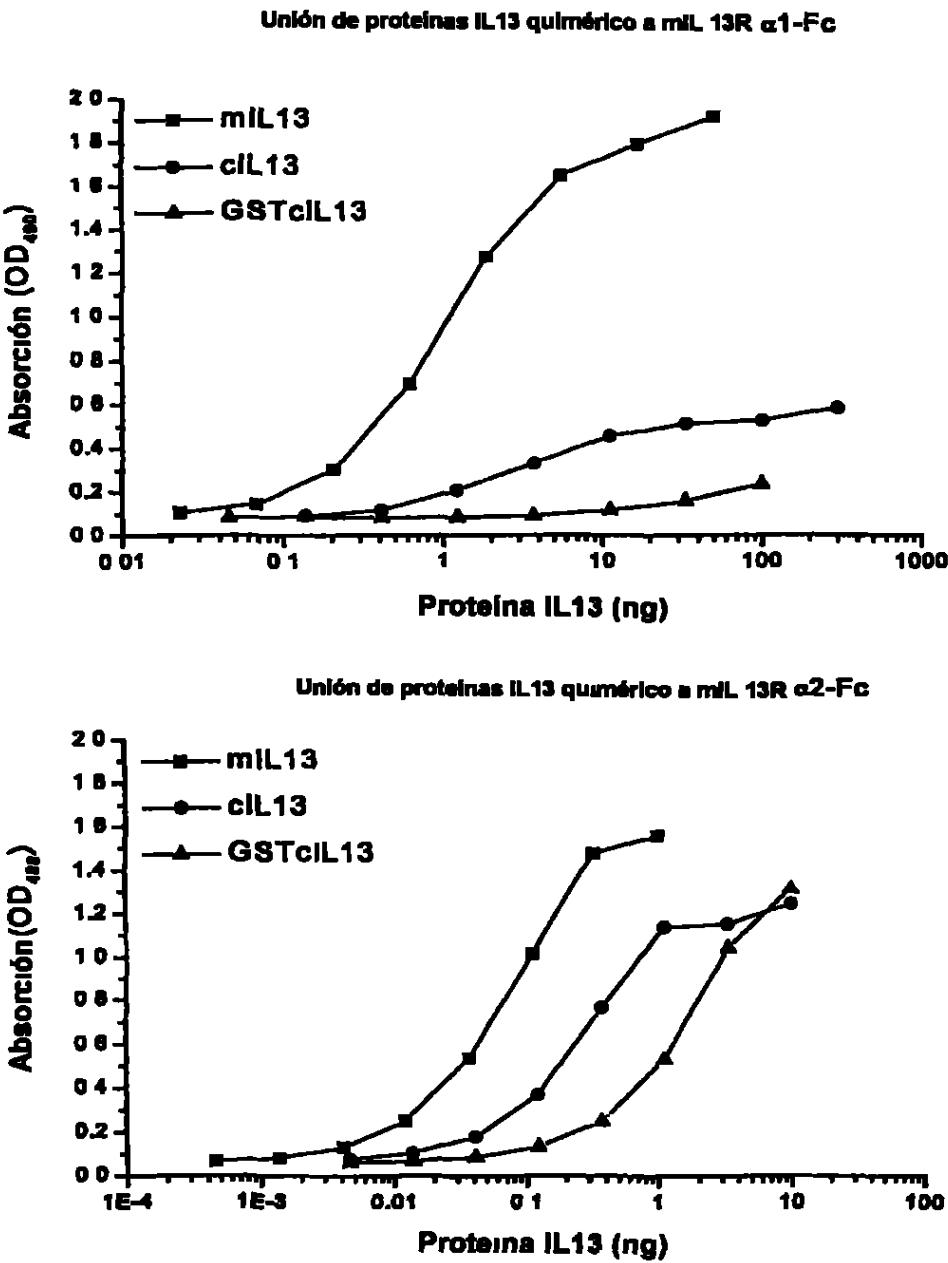
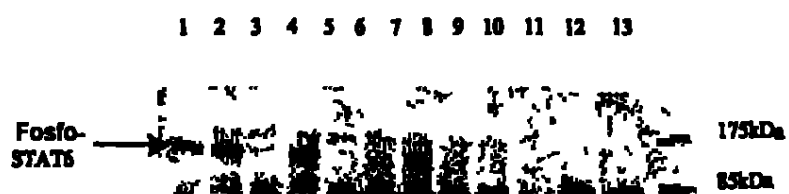


Figura 5



6/13

Figura 6



156
153

7/13

Figura 7a

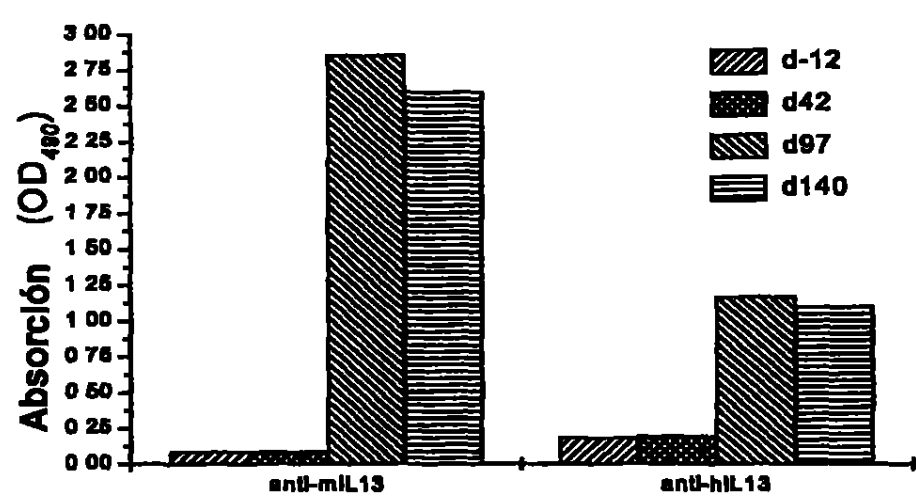


Figura 7b

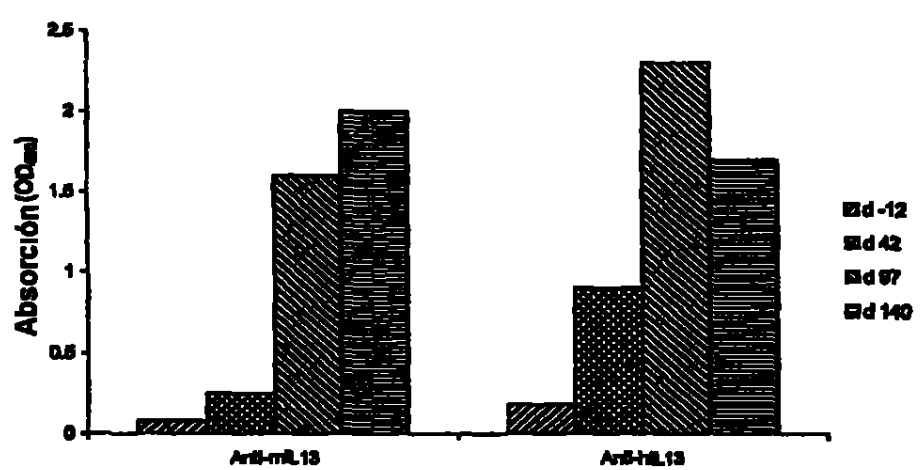
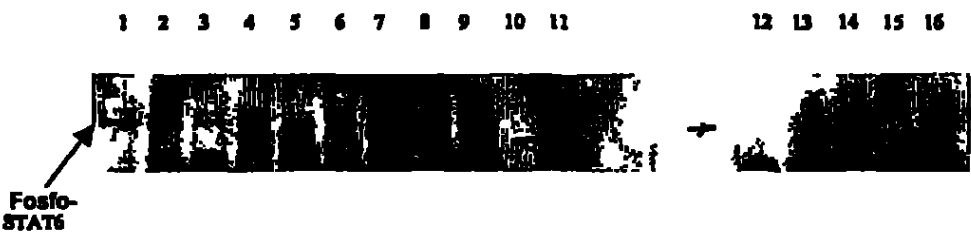


Figura 8



155

Figura 9

1 ATGGCCGCTTTTGTGACCAAGGTCATTGCTCTCACTTGCCTTGGCGGCTTTGCCCTCCCA 60
-----+-----+-----+-----+-----+
M A L L L T T V I A L T C L G G F A S P

61 GGCCCTGTGCTCCCTCTACAGCCCTTAAGGAGCTTATTGAGGAGCTGAGCAACATCACC 120
-----+-----+-----+-----+-----+
G P V P P S T A L K E L I E E L S N I T

121 CAGAACCAGAAGGCTCCGCTCTGCAATGGCAGCATGGTTTGGAGCATCAACCTGACAGCT 180
-----+-----+-----+-----+-----+
Q N Q K A P L C N G S M V W S I N L T A

181 GGCATGTTCTGTGTAGCCCTGGATTCCCTGATCAACGTGTGAGGCTGCAGTGGCCATCTAC 240
-----+-----+-----+-----+-----+
G M F C V A L D S L I N V S G C S A I Y

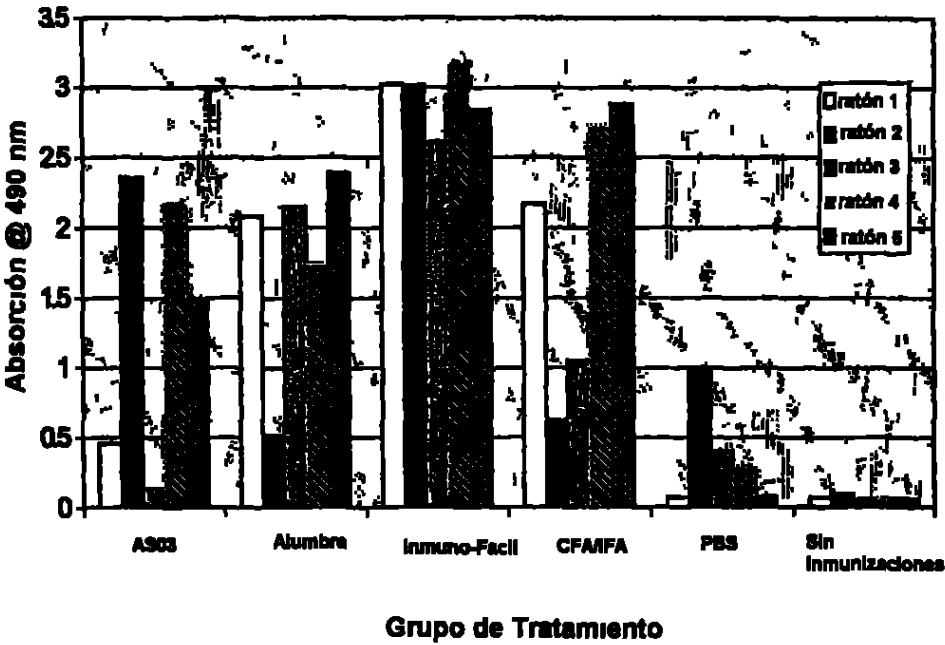
241 AGGACCCAGAGGATATTGCATGGCTTCTGCCCGCACAGGTCTCAGCTGGGCAGTTTTC 300
-----+-----+-----+-----+-----+
E T Q R I L E G F C P H K V S A G Q F S

301 AGCTTGCATGTCCGAGACACCAAAATCGAAGTAGCCCACTTTATAACAAAACCTCTCTTA 360
-----+-----+-----+-----+-----+
S L E V R D T K I E V A N F I T K L L L

361 CATTTAAAGAACTTTTTCGCGAGGGACGGTTCAACTGA 399
-----+-----+-----+-----+
H L K K L P R E G R F N *

157
156

Figura 10



157

Figura 11

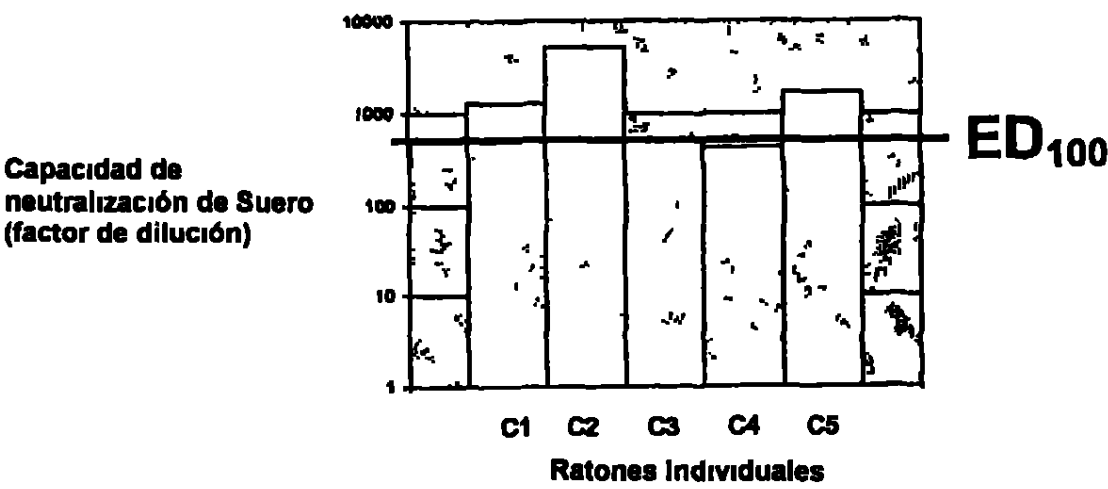


Figura 12

	atggcgctctgggtgactgaagtccttgaccttgccttggttggtcgcgcgcacca	
1	-----+-----+-----+-----+-----+	60
-19	M A L W V T A V L A L A C L G G L A A P	0
	GGGCCGCTGCCAAGATCTGTGTCCTCCCTGTGACCCCTTAAGGAGCTTATTGAGGAGCTG	
61	-----+-----+-----+-----+-----+	120
1	G P V P R S V S L P <u>Y T L K E L I E E L</u>	20
	ACCAACATCACACAAGACCAGACTCCCCTGTGCAACCGGCAGCATGGTATGGAGTGTTGGAC	
121	-----+-----+-----+-----+-----+	180
21	<u>T N I T</u> Q D Q T P L C H G S M V W S V D	40
	CTGGCCGCTGGCGGGTCTGTGTAGCCCTGGATTCCCTGACCAACATCTCCAATTGCAAT	
181	-----+-----+-----+-----+-----+	240
41	L A A G G <u>F C V A L D S L T N I S N C N</u>	60
	GCCATCTTCAGGACCCAGAGGATATTGCATGCCCTCTGTAAACCGCAAGGCCCCCCACTACG	
241	-----+-----+-----+-----+-----+	300
61	A I <u>E R T Q R I L H A L</u> C N R K A P T T	80
	GTCTCCAGCCTCCCCGATACCAAATCGAAGTAGCCCACTTTATAACAAAACGCTCACC	
301	-----+-----+-----+-----+-----+	360
81	V S S L P D T K I E <u>V A H F I T K L L T</u>	100
	TACACAAGAACCTGTTTCGCGCGCGCCCTTCTAA	
361	-----+-----+-----+-----+-----+	396
101	Y T K <u>H L F R R</u> G P F *	112

102
159

Figura 13

-23	---+-----+-----+	0
	<u>MELTSQLLPPLPPLACAGNFVEG</u>	
1	-----+-----+-----	24
	<u>HKCDKNEHLREIIGILNEVTGKTL</u>	
25	-----+-----+-----	48
	<u>CTELTVTDIFAASKFTTESLVCR</u>	
49	-+-----+-----+--	72
	<u>ASKVLRIFFYLKHKDTRCLGATAK</u>	
73	-----+-----+-----	96
	<u>WSEVLMELOQLFRAFRCIDGLNSC</u>	
97	---+-----+-----+	120
	<u>PVKRANQSSLKDFLESLKSIQMD</u>	
121	----- 126	
	<u>YSKCSG</u>	

163
160

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Glaxo Group Ltd

<120> Vacuna

<130> PG4355

<160> 25

<170> FastSBQ for Windows Version 4 0

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> epitope mutado

<400> 1

Leu	Lys	Glu	Leu	Ile	Glu	Glu	Leu	Ser	Asn
1				5					10

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> epitope mutado

<400> 2

Phe	Cys	Val	Ala	Leu	Asp	Ser	Leu
1				5			

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> epitope mutado

<400> 3

Ala	Ile	Tyr	Arg	Thr	Gln	Arg	Ile	Leu	His	Gly
1				5					10	

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> epitope mutado

<210> 10

213
162

<211> 72
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligocarga de inicio de PCR para IL13 Químico para uso murino

<400> 10
tgtgatgttg accagctcct caatgagctc cctcagggtc agagggagag acacagatct 60
tggcacgggc cc 72

<210> 11
<211> 73
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligocarga de inicio de PCR para IL13 Químico para uso murino

<400> 11
aggagctggg caacatcaca caagacaga ctcctctgtg caacggcagc atggtatgga 60
gtgtggacct ggc 73

<210> 12
<211> 72
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligocarga de inicio de PCR para IL13 Químico para uso murino

<400> 12
gcattggag atgttggtca gggattccag ggtgmacag taaccgccag cggccaggtc 60
cacaaccat ac 72

<210> 13
<211> 73
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligocarga de inicio de PCR para IL13 Químico para uso murino

<400> 13
tgaccasat ctccattgc aatgcctcg agagacca gaggatgctg ggggaatct 60
gtaccgcaa ggc 73

<210> 14
<211> 72
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligocarga de inicio de PCR para IL13 Químico para uso murino

<400> 14
aaactgggc acctcgattt tggatcgga gaggctggag aactagctg gggcattgag 60
gttacagagt cc 72

<210> 15
<211> 71

166
163

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligocarga de inicio de PCR para IL13 Químérico para uso murino

<400> 15
aaatogaggt ggcacagttt gtaaaggaco tgotcagata cacaagaaa otgtttcgoc 60
acgggocott o 71

<210> 16
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligocarga de inicio de PCR para IL13 Químérico para uso murino

<400> 16
ogggattog ggcgggtgco aagatctg 28

<210> 17
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligocarga de inicio de PCR para IL13 Químérico para uso murino

<400> 17
otcogotoga gtogaattag aagggggcgt ggogaaa 37

<210> 18
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligocarga de inicio de PCR para IL13 Químérico para uso murino

<400> 18
ogggatcog ggcgggtgco aagatctg 28

<210> 19
<211> 336
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> IL13 Químérico para uso murino

<400> 19
gggagggtgc caagatctgt gtctctccct otgacotta gggagotcat tggggagctg 60
gtcaacataa cacaagaaa gactccctg tgcacggca goatggtatg gagtgtggac 120
otggcgctg ggggtactg tgcagccctg gaacccctga ccaacatoto caattgcaat 180
gcaatcgaga agaccagag gatgotggg ggaototgta accgcaaggc ccccaotag 240
gtotcagao tcccgatac caaatogag gtggccagc ttgtaaagga cctgctcago 300
tacacaaagc aatgtttog caacggcccc ttctaa 336

<210> 20
<211> 211

163
164

<212> PKT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> IL3 Químico para uso murino

<400> 20
Gly Pro Val Pro Arg Ser Val Ser Leu Pro Leu Thr Leu Arg Glu Leu
1 5 10 15
Ile Glu Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asp Gln Thr Pro Leu Cys Asn
20 25 30
Gly Ser Met Val Trp Ser Val Asp Leu Ala Ala Gly Gly Tyr Cys Ala
35 40 45
Ala Leu Glu Ser Leu Thr Asn Ile Ser Asn Cys Asn Ala Ile Glu Lys
50 55 60
Thr Gln Arg Met Leu Gly Gly Leu Cys Asn Arg Lys Ala Pro Thr Thr
65 70 75 80
Val Ser Ser Leu Pro Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe Val Lys
85 90 95
Asp Leu Leu Ser Tyr Thr Lys Gln Leu Phe Arg His Gly Pro Phe
100 105 110

<210> 21
<211> 399
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> IL3 Químico para uso humano

<400> 21
atggcggttt tgttgaccac ggtcattgtg otcatttgcg ttggcgggtt tgcctcccaa 60
ggcctgtg otcctctac agccottag gagttattg aggagctgag caacatcaac 120
cagaaaccaga aggtccgct ctgcattgga agcatggttt ggagcatcaa octgacagct 180
ggatgtttct gtgtagccct gattccctg atcaactgtt caggctgcag tgccatctac 240
aggaccaga ggtatttga tggctctgc ccgcacaagg tctcagctgg gaagtcttcc 300
agttgcatg tccagacac caaatcgaa gtagccact ttatacaaa actgctotta 360
catttaaga aactttttog caggggacgg ttcactga 399

<210> 22
<211> 132
<212> PKT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> IL3 Químico para uso humano

<400> 22
Met Ala Leu Leu Leu Thr Thr Val Ile Ala Leu Thr Cys Leu Gly Gly
1 5 10 15
Phe Ala Ser Pro Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Lys Glu Leu
20 25 30
Ile Glu Glu Leu Ser Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys
35 40 45
Asn Gly Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Phe Cys
50 55 60
Val Ala Leu Asp Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Tyr
65 70 75 80
Arg Thr Gln Arg Ile Leu His Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala
85 90 95

165

67

Gly Gln Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala
 100 105 110
 His Phe Ile Thr Lys Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu
 115 120 125
 Gly Arg Phe Asn
 130

<210> 23
 <211> 396
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> IL3 Químico para uso murino

<400> 23
 atggcgctct gggtgactgc agtccctggt attgattgac ttggtggtct cgcgcgcaca 60
 gggccggtgc caagatctgt gtctctccct gtgacaccta agggatttat tgaggagctg 120
 accaacatca cacaagacca gactcccttg tgcacaggca gcatgggtatg gactgtggac 180
 ctggcgctg ggggtttctg tctagccctg gattccctga ccaacatctc cacttggcat 240
 gccattctca ggaccagag gatattgcat gcoctctgta aocgcaaggc cccactacy 300
 gtctccagcc tcccgatac caaatcgaa gtgcccact ttataacaa actgctcac 360
 tacacaaaga acctgttttg ccggggcccc ttctaa 396

<210> 24
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> IL3 Químico para uso murino

<400> 24
 Met Ala Leu Trp Val Thr Ala Val Leu Ala Leu Ala Cys Leu Gly Gly
 1 5 10 15
 Leu Ala Ala Pro Gly Pro Val Pro Arg Ser Val Ser Leu Pro Val Thr
 20 25 30
 Leu Lys Glu Leu Ile Glu Glu Leu Thr Asn Ile Thr Gln Asp Gln Thr
 35 40 45
 Pro Leu Cys Asn Gly Ser Met Val Trp Ser Val Asp Leu Ala Ala Gly
 50 55 60
 Gly Phe Cys Val Ala Leu Asp Ser Leu Thr Asn Ile Ser Asn Cys Asn
 65 70 75 80
 Ala Ile Phe Arg Thr Gln Arg Ile Leu His Ala Leu Cys Asn Arg Lys
 85 90 95
 Ala Pro Thr Thr Val Ser Ser Leu Pro Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala
 100 105 110
 His Phe Ile Thr Lys Leu Leu Thr Tyr Thr Lys Asn Leu Phe Arg Arg
 115 120 125
 Gly Pro Phe
 130

<210> 25
 <211> 150
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> IL4 Químico para uso humano

169
166

<400> 25
 Met Gly Leu Thr Ser Gln Leu Leu Pro Pro Leu Phe Phe Leu Leu Ala
 1 5 10 15
 Cys Ala Gly Asn Phe Val His Gly His Lys Cys Asp Lys Asn His Leu
 20 25 30
 Arg Glu Ile Ile Gly Ile Leu Asn Glu Val Thr Gly Glu Lys Thr Leu
 35 40 45
 Cys Thr Glu Leu Thr Val Thr Asp Ile Phe Ala Ala Ser Lys Asn Thr
 50 55 60
 Thr Glu Ser Glu Leu Val Cys Arg Ala Ser Lys Val Leu Arg Ile Phe
 65 70 75 80
 Tyr Leu Lys His Glu Lys Asp Thr Arg Cys Leu Gly Ala Thr Ala Lys
 85 90 95
 Asn Ser Ser Val Leu Met Glu Leu Gln Arg Leu Phe Arg Ala Phe Arg
 100 105 110
 Cys Leu Asp Gly Leu Asn Ser Cys Pro Val Lys Glu Ala Asn Gln Ser
 115 120 125
 Ser Leu Lys Asp Phe Leu Glu Ser Leu Lys Ser Ile Met Gln Met Asp
 130 135 140
 Tyr Ser Lys Cys Ser Ser
 145 150

196
167



SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO
Radicación 03073597 00000000 Folios 168 0/A
Fecha (MID): 2003-09-01 16:47:15
Trámite : 011 PCT-PATENT 378 FASE MRCI 411 PRESENTAC
Dependencia 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION ☒ [X]

MODELO DE UTILIDAD ☐ []

- ♦ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒ [X] 1
- ♦ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒ [X] 1
- ♦ Descripción de la invención ☒ [X] 82
- ♦ Dibujos de ser estos pertinentes ☒ [X] 159
- ♦ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒ [X] 2

COMPLETA ☒ [X]

INCOMPLETA ☐ []

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ []

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

COMPLETA ☐ []

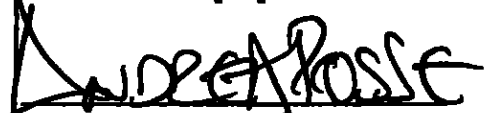
INCOMPLETA ☐ []

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ []

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

COMPLETA ☐ []

INCOMPLETA ☐ []


Firma Responsable

Fecha _____

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

1689



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION
FECHA INGRESO FASE NACIONAL

No. SOLICITUD
INTERNACIONAL
Fecha

PCT/GB02/00900
01 03 - 2002

(51) INT CL. C12N 15/24

(21) No. SOLICITUD **03- 075597**

(22) FECHA DE
PRESENTACIÓN **29-08-03**

(71) SOLICITANTE GLAXO GROUP LIMITED

(30) PRI RIDAD

(31) No. DE SOLICITUD **0105360 2**

(72) INVENTOR/ES **ASHMAN, Claire, CROWE,**
James, Scott, ELLIS, Jonathan,
Henry y LEWIS, Alan, Peter

(32) FECHA DE
PRESENTACIÓN **03-03-01**

(33) PAÍS
GB

(74) REPRESENTANTE
LEGAL **JOSE ANTONIO LLOREDA**

(54) TÍTULO

"VACUNA"

(57) RESUMEN

Reivindicación número 1 -

Uso de una proteína recombinante quimérica que tiene epítopes de célula B provenientes de una auto-proteína de una primer especie mamífera y una mutación que da lugar a una secuencia de una proteína análoga de una especie mamífera que es diferente de dicha primer especie mamífera, de tal manera que la proteína es capaz de provocar una respuesta inmune que reconoce la proteína natural de la cual se derivan los epítopes de célula B en la primer especie mamífera, en la elaboración de una vacuna para fraccionar la tolerancia de células B y provocar así una respuesta inmune contra dicha auto-proteína en dicha primer especie mamífera



2020
Bogotá, D C ,

Doctor:
José Antonio Lloreda
Apoderado
Glaxo Group Limited

08441

ASUNTO:	Radicación N°	03-075597
	Solicitud internacional	PCT/GB2002/00900
	Fecha inicio fase nacional	03/10/2003
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	430
	Folios	001

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

- ☐ La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486).
- ☐ El solicitante debe aclarar si la solicitud corresponde al capítulo I o II del PCT por que la indicación en el petitorio no corresponde a los documentos del expediente, en caso necesario adjuntar los documentos que corresponden
- ☐ El solicitante debe presentar un nuevo título que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el título relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente. (Regla 4.3 PCT, Art 26-27 D-486, Circular unica 5.2.9)

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

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica N° 10 de 2001


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

10 OCT 2003

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