

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

04-124128

54. TITULO

POLIPÉPTIDOS RELACIONADOS CON TOCINA CON ACTIVIDAD

ANTIMICROBIANA Y ANTIVIRAL

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

1) UNIVERSITA DEGLI STUDI DI SIENA, 2) LUCIANO POLONELLI y
3) ANTONIO CASSONE.

DOMICILIO

1) Siena, 2) Parma y 3) Roma, Italia, Respectivamente.

74. APODERADO

EMILIO FERRERO

C.C. 438.019 de Usaquén.

22. BOGOTA, D.C.,

2020/09/18

SS



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

Radicación: 5424120 6330333
Fecha (MM): 2003-12-10 16:51:10
Trámite: 811 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Folios: 256 sión

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1

SOLICITUD DE:



Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.



Capítulo I.



Capítulo II.

2**SOLICITANTE**
(71)**Nombre: 1) UNIVERSITA DEGLI STUDI DI SIENA, 2) LUCIANO POLONELLI Y 3) ANTONIO CASSONE**

1) entidad constituida y existente bajo las leyes de Italia

Dirección: 1) Via Banchi di Sotto 55, I-53100 Siena, Italia;

2) Viale Campanini 17/1, I-43100 Parma, Italia;

3) Via Meropia 112, I-00147 Roma, Italia

Domicilio: 1) Siena; 2) Parma; 3) Roma, Italia

IDENTIFICACIONC.C. ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número: _____

3**REPRESENTANTE**
O APODERADO**Nombre: EMILIO FERRERO**

Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35

Teléfono: 347 36 11

Fax: 217 92 11

E-mail: clientes@camvp.com

Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIONC.C. ☒ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número: 438.019 T.P. 31.929

4**INVENTOR (ES)**
(72)

1. Luciano POLONELLI (sin copias) **2. Antonio CASSONE** (sin copias)
Viale Campanini 17/1, Fl 2da y 5a Via Meropia 112, Folio 262 y 5a
I-43100 Parma, Italia

3. Paolo NERI ✓
c/o Dipartimento di Biologia Molecolare,
Università degli Studi di Siena,
Via Fiorentina 1,
I-53100 Siena,
Italia

4. Luisa BRACCI ✓
c/o Dipartimento di Biologia Molecolare,
Università degli Studi di Siena,
Via Fiorentina 1,
I-53100 Siena,
Italia

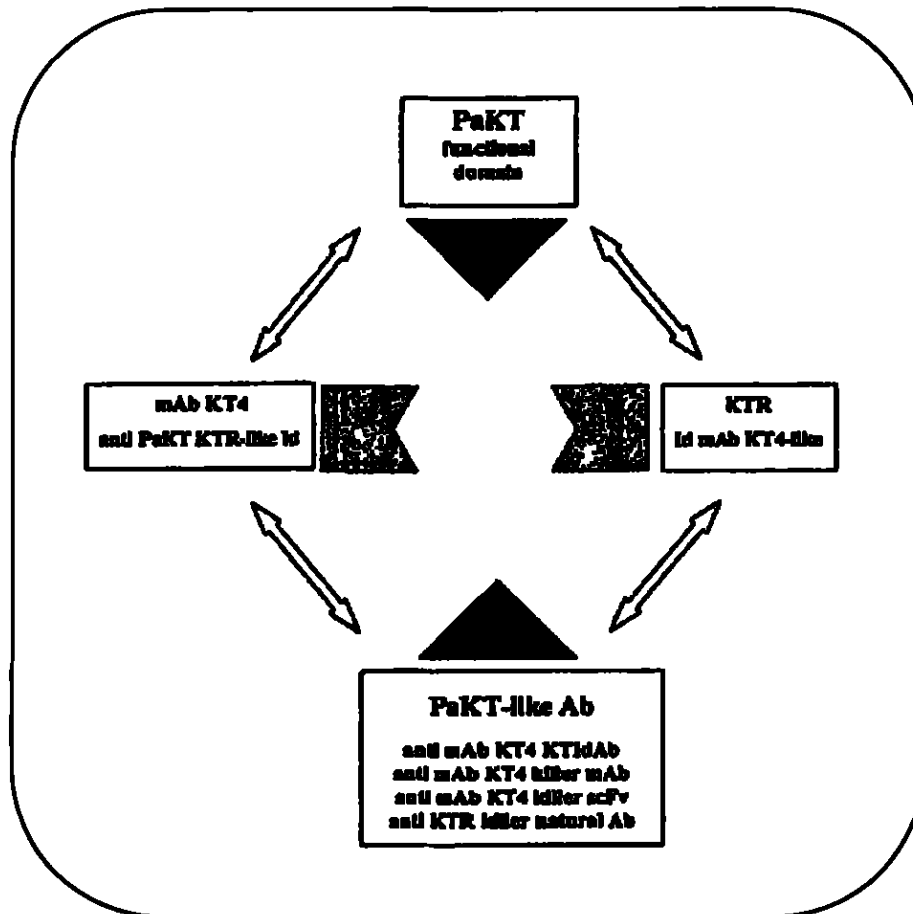
5**PCT (86)**Solicitud Internacional No. PCT/IB03/02348Fecha: 09 de mayo de 2003Publicación Internacional No. WO 03/095493 A2Fecha: 20 de noviembre de 2003**6****Título (54)**

POLIPÉPTID S RELACIONAD S CON TOXINA C N ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA Y ANTIVIRAL

7	Clasificación Internacional (51) <u>C07K 16/42, C12N 15/13, A61K 39/395, A61P 31/04, 31/12</u>		
8	Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen <u>GB</u>	(32) Fecha <u>10 de mayo de 2002</u>
			(31) Número de Solicitud <u>0210783,7</u>
9	Comprobante de pago No.: <u>04 - 92.146</u> Fecha: <u>29 de noviembre de 2004</u>		
10	Anexos: ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 422.000.00. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica. ☐ Poderes, si fuere el caso. ☐ 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 efectuado por la IPEA. ☒ Traducción del examen preliminar 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. ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico. ☒ 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, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud. ☐ Otros		

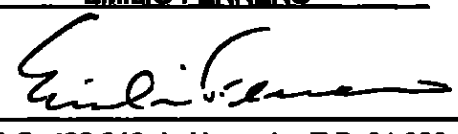
11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERREROFIRMA: 

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

DLM

4

DE SIMONE & PARTNERS
INTELLECTUAL PROPERTY ATTORNEYS

November 5, 2004

Messrs.
WIPO
The International Bureau
34, Chemin des Colombettes
1211 Geneva 20
Switzerland

Fax: 0041 22 910 06 10
Confirmation by mail

Our Ref: OC/MS/PCT 82990

Re: International Application no. PCT/IB03/02348
Filed on 9-May-2003
In the name of: Università degli Studi di Siena et al.
Inventors: Polonelli, Cassone

Dear Sirs,

Reference is made to the above and, in compliance with rule 92 bis under the Patent Cooperation Treaty, we wish to inform you that the following persons do need to be added as inventors and, namely:

Paolo NERI	Italian nationality
Luisa BRACCI	Italian nationality
Luisa LOZZI	Italian nationality

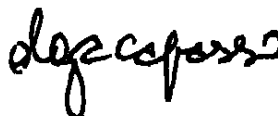
Address (for the three of them):

c/o Dipartimento di Biologia Molecolare, Università degli Studi di Siena
Via Fiorentina no. 1, IT- 53100 Siena ITALY

As a matter of fact, Power of Attorney will be provided as soon as possible.

We thank you for your kind attention and remain,

Yours sincerely
DE SIMONE & PARTNERS
Olga Capasso



(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organisation
International Bureau



(43) International Publication Date
20 November 2003 (20.11.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2003/095493 A3

(51) International Patent Classification: C07K 16/42,
C12N 15/13, A61K 39/395, A61P 31/04, 31/12, A61K
38/08, 38/06, 38/07

(74) Agent: MARSHALL, Cameron, John; Carpmaels &
Ransford, 43 Bloomsbury Square, London WC1A 2RA
(GB).

(21) International Application Number:
PCT/IB2003/002348

(22) International Filing Date: 9 May 2003 (09.05.2003)

(23) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0210783.7 10 May 2002 (10.05.2002) GB

(71) Applicant (for all designated States except US): UNIVER-
SITA DEGLI STUDI DI SIENA (IT/IT); Via Banchi di
Sotto 55, I-53100 Siena (IT).

(71) Applicants and

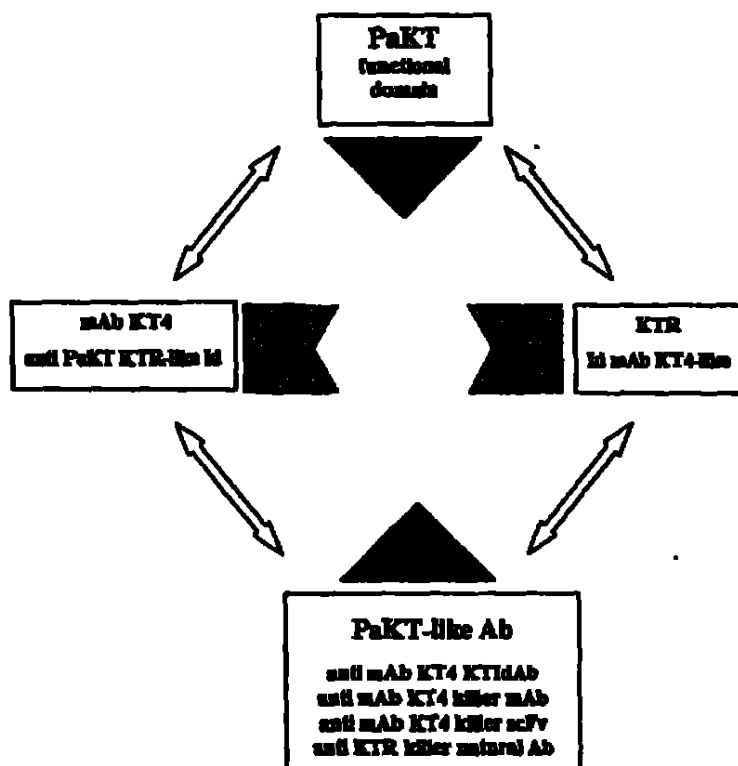
(72) Inventors: POLONELLI, Luciano (IT/IT); Viale Cam-
panini 17/1, I-43100 Parma (IT). CASSONE, Antonio
(IT/IT); Via Mecenate 112, I-00147 Roma (IT).

(81) Designated States (national): AR, AG, AL, AM, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GR, GM,
HN, 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, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Bourian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HU, IR, IT, LU, MC, NL, PT, RO,
SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NR, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: TOXIN-RELATED ANTIBODIES WITH ANTIMICROBIAL AND ANTIVIRAL ACTIVITY



(57) Abstract: Anti-idiotype antibodies which recognise the idiotype of an antibody specific for a yeast killer toxin possess microbicidal activity. Fragments (e.g. decapeptides) of these anti-idiotype antibodies, particularly those comprising CDR residues, also show microbicidal activity, as do peptides having 5 the same sequence but composed of D-amino acids, or including amino acid substitutions. Peptidomimetics of these microbicidal polypeptides are also provided. Antiviral activity is also seen.

WO 2003/095493 A3

WO 2003/095493 A3



Published:

— with international search report

(88) Date of publication of the international search report:
3 June 2004

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

TOXIN-RELATED POLYPEPTIDES WITH ANTIMICROBIAL & ANTIVIRAL ACTIVITY

All documents cited herein are incorporated by reference in their entirety.

TECHNICAL FIELD

This invention is in the field of microbicides and antivirals, in particular those derived from yeast killer toxins.

BACKGROUND ART

Killer toxins (KTs) are proteins secreted by yeasts which are able to kill other yeasts or microorganisms which compete in nature for the same ecological niche [1]. Although they are attractive therapeutic tools, due to their wide spectrum of microbicidal activity, they are of no practical use because of their instability in the host physiological milieu as well as their antigenicity and toxicity. Instead, the use of anti-idiotypic antibodies which mimic KT's has been shown to be effective.

The killer toxin from *Pichia anomala* ('PaKT') has a wide spectrum of microbicidal activity against pathogens including *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Pneumocystis carinii*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus* [2, 3, 4]. This observation has been exploited by the generation of a PaKT-neutralizing monoclonal antibody in mice (mAb KT4) [5] whose idiotype (Id) is able to induce the production of anti-idiotypic antibodies (antilids) [6, 7, 8]. These antilids represent the internal image of the active PaKT domain and as such exert its biological activities, including binding to the PaKT receptor (KTR) of susceptible microorganisms and broad spectrum microbicidal activity overlapping that of PaKT (Figure 1).

Experimental animals in which these antibodies ('KTIdAb') are raised by idiotype vaccination with mAb KT4 have repeatedly been shown to be protected against mucosal or systemic challenges by *C.albicans* [7, 8]. There is also ample evidence of susceptibility *in vitro* to KTIdAb by diverse microbial pathogens such as *M.tuberculosis* (including multidrug resistant strains), *P.carinii*, and others [4, 9].

Idiotypic theory (Figure 1) also predicted that antibodies against PaKT receptors would mimic PaKT activity. This has been demonstrated in animals and humans during the course of experimental and natural infections caused by PaKT-sensitive microorganisms [10]. Human natural anti-KTR antibodies have been shown to have microbicidal activity *in vitro* against *C.albicans*, *M.tuberculosis*, and *P.carinii*, to inhibit *P.carinii* infectivity of nude rats, and to be protective against passive transfer *in vivo*, in an experimental model of rat vaginal candidiasis [4, 10, 11].

Based on these results, and in order to obtain standard KTIdAb in sufficient amounts, rat monoclonal IgM (mAb K10) and mouse single-chain Fv (scFv H6) microbicidal antibodies have been obtained [12, 13]. These two antibodies have strong microbicidal effects *in vitro* against important pathogenic microorganisms including: *C.albicans* [12, 13]; *C.krusei* and *C.glabrata* (including fluconazole-resistant strains); *Cryptococcus neoformans*; *A.fumigatus* [14]; *M.tuberculosis* [4]; *S.aureus*, *Enterococcus faecalis*, *E.faecium*, and *Streptococcus pneumoniae* (including methicillin-,

vancomycin- and penicillin-resistant strains) [15], *S.mutans*, *Leishmania major*, *L.infantum* and *Achantamoeba castellan*. Furthermore, they showed specific therapeutic activity in an experimental model of rat vaginal candidiasis by intravaginal administration [13]. In addition, K10 proved to be therapeutic against *P.carinii* pneumonia in rats infected by aerosol administration [16], and in mice transplanted with T cell depleted bone marrow against aspergillosis caused by nasal instillation [14].

Although the existence of scFv H6 has been reported, a method for its manufacture has not previously been disclosed, and nor has its amino acid sequence.

It is an object of the invention to provide further and improved antimicrobial and/or antiviral compounds.

10 DISCLOSURE OF THE INVENTION

Antibodies of the invention

The invention provides an anti-idiotypic antibody which recognises the idiotope of an antibody specific for a yeast killer toxin, with the proviso that the anti-idiotypic antibody is not the K10 rat monoclonal antibody. The antibody preferably has microbicidal activity (e.g. it retains yeast killer toxin activity) and/or antiviral activity.

An anti-idiotypic antibody of the invention can be used to generate further anti-idiotypic antibodies (anti-anti-anti-idiotypic with respect to the original killer toxin). The anti-anti-anti-idiotypic antibody of the invention can in turn be used to generate further anti-idiotypic antibodies (anti-anti-anti-anti-idiotypic with respect to the original killer toxin). Thus the microbicidal activity of the killer toxin can be transferred through successive generations of anti-idiotypic antibodies, and these various generations are within the scope of the invention.

Thus the invention provides an antibody which recognises the idiotope of an anti-idiotypic antibody of the invention (i.e. it provides an anti-anti-anti-idiotypic antibody), an antibody which recognises the idiotope of such an anti-anti-anti-idiotypic antibody (i.e. an anti-anti-anti-anti-idiotypic antibody) etc. In general, therefore, the invention provides an antibody which recognises the idiotope of an (anti)- n -idiotypic antibody of the invention, wherein n is an odd number (e.g. 1, 3, 5, 7, 9 etc.). These antibodies will generally bind to the idiotope of an anti-toxin antibody such as KT4 and preferably have microbicidal and/or antiviral activity.

For production of these (anti)- n -idiotypic antibodies, the invention provides (anti)- m -idiotypic antibodies, wherein m is an even number (e.g. 2, 4, 6, 8 etc.). These antibodies will generally bind to a killer toxin.

The term 'antibody' includes any of the various natural and artificial antibodies and antibody-derived proteins which are available. Thus the term 'antibody' includes polyclonal antibodies, monoclonal antibodies, Fab fragments, F(ab')₂ fragments, Fv fragments, single-chain Fv (scFV) antibodies, oligobodies, etc.

To increase compatibility with the human immune system, it is preferred to use human antibodies. As an alternative, antibodies of the invention may be chimeric or humanized versions of non-human antibodies [e.g. refs. 17 & 18].

In chimeric antibodies, non-human constant regions are substituted by human constant regions but variable regions remain non-human.

Humanized antibodies may be achieved by a variety of methods including, for example: (1) grafting complementarity determining regions (CDRs) from the non-human variable region onto a human framework ("CDR-grafting"), with the optional additional transfer of one or more framework residues from the non-human antibody ("humanizing"); (2) transplanting entire non-human variable domains, but "cloaking" them with a human-like surface by replacement of surface residues ("veneering"). In the present invention, humanized antibodies include those obtained by CDR-grafting, humanizing, and veneering or variable regions. [e.g. refs. 19 to 25].

The constant regions of humanized antibodies are derived from human immunoglobulins. The heavy chain constant region can be selected from any of the five isotypes: α , δ , ϵ , γ or μ .

Humanized or fully-human antibodies can also be produced using transgenic animals that are engineered to contain human immunoglobulin loci. For example, ref. 26 discloses transgenic animals having a human Ig locus wherein the animals do not produce functional endogenous immunoglobulins due to the inactivation of endogenous heavy and light chain loci. Ref. 27 also discloses transgenic non-primate mammalian hosts capable of mounting an immune response to an immunogen, wherein the antibodies have primate constant and/or variable regions, and wherein the endogenous immunoglobulin-encoding loci are substituted or inactivated. Ref. 28 discloses the use of the Cre/Lox system to modify the immunoglobulin locus in a mammal, such as to replace all or a portion of the constant or variable region to form a modified antibody molecule. Ref. 29 discloses non-human mammalian hosts having inactivated endogenous Ig loci and functional human Ig loci. Ref. 30 discloses methods of making transgenic mice in which the mice lack endogenous heavy chains, and express an exogenous immunoglobulin locus comprising one or more xenogeneic constant regions.

Antibodies of the invention may include a label. The label may be detectable directly, such as a radioactive or fluorescent label. Alternatively, the label may be detectable indirectly, such as an enzyme whose products are detectable (e.g. luciferase, β -galactosidase, peroxidase etc.) or a binding partner such as biotin and avidin or streptavidin.

Antibodies of the invention may be attached to a solid support.

Antibodies of the invention may be produced by any suitable means (e.g. by recombinant expression).

Preferred antibodies of the invention are single chain Fv antibodies. These may be produced by joining heavy and light chain variable regions from a starting monoclonal antibody of interest, or

10

may be identified by screening a scFv library (e.g. by phage display). Reference 31 discloses a phage display method for producing anti-idiotypic scFv antibodies.

Particularly preferred scFv antibodies of the invention are H6 (SEQ IDs 1 & 2) and H20 (SEQ IDs 21 & 22). Antibodies comprising one or more (e.g. 2, 3, 4, 5 or 6) of the CDRs from H6 and H20 are also preferred, as are derivatives of H6 and H20 in which: (a) one or more (e.g. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15) framework residues are substituted with other amino acids; (b) the linker sequence (SEQ ID 30) is replaced with an alternative linker sequence; (c) the 'E-tag' sequence (SEQ ID 59) is omitted or replaced. Fusion proteins comprising H6 or H20, or derivatives (a) to (c), at the N- or C-terminus are also useful. The H6 and H20 CDRs may optionally contain 1, 2, 3 or 4 amino acid substitutions.

Other preferred antibodies of the invention are humanized antibodies. Particularly preferred humanized antibodies of the invention comprise one or more (e.g. 2, 3, 4, 5 or 6) CDRs from H6, H20 or K20.

Polypeptides and antibody fragments

It has surprisingly been found that short fragments (e.g. 10mer fragments) of the variable regions of anti-idiotypic antibodies of the invention can retain the antibodies' KT-like microbicidal activity. Even more surprisingly, L-amino acids in these fragments can be replaced with D-amino acids without removing microbicidal activity, and amino acids within the fragments can be substituted with other amino acids without removing microbicidal activity. In addition, the fragments have been found to possess anti-viral activity.

Thus the invention provides a polypeptide comprising: at least one amino acid sequence which is a fragment of at least x amino acids from the amino acid sequence of a variable region of an antibody of the invention, optionally with y amino acid(s) within said x amino acids being substituted by different amino acid(s). The polypeptide preferably has microbicidal and/or antiviral activity.

The polypeptide preferably consists of no more than 250 amino acids (e.g. no more than 225, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 95, 90, 80, 70, 60, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 or even 5 amino acids). Polypeptides consisting of between 5 and 90 amino acids are preferred (e.g. consisting of between 5 and 80, 5 and 70, 5 and 60 amino acids etc.). Particularly preferred are polypeptides consisting of between 8 and 25 amino acids are preferred.

The polypeptide preferably consists of at least 3 amino acids (e.g. at least 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, or at least 200 amino acids).

The value of x is preferably at least 3 (e.g. at least 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, or at least 200).

The value of y will be less than x and, depending on the value of x , it may be $x-1, x-2, x-3, x-4, x-5, x-6, x-7, x-8, x-9, x-10, x-11, x-12, x-13, x-14$, or $x-15$. Preferred values of y are 1, 2, 3, 4 and 5. The y

11

amino acids are typically substituted by A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, or Y. Each of the y substitutions may be the same or different as the others. The substitution is preferably by G or, more preferably, by A [32, 33]. The substituting amino acid may be an L- or a D- amino acid but, where the other x amino acids all share a single stereo-configuration (i.e. all D- or all L-), it preferably has that stereo-configuration (although, of course, G has no stereoisomers).

Where the fragment of x amino acids includes a C, the value of y is preferably at least 1 such that the C is substituted for another amino acid, such as S. Removal of C in this way improves resistance to oxidation.

The fragment of at least x amino acids preferably includes at least z amino acids from a CDR within the antibody. The value of z is preferably at least 1 (e.g. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 or 10 or more).

The polypeptide may comprise more than one (e.g. 2, 3, 4, 5, 6) amino acid sequence each of which is a fragment of at least x amino acids (e.g. SEQ ID 25). In such polypeptides, the value of x in each fragment may be the same or different, the value of y within each x may be the same or different, and the value of z within each x may be the same or different. The fragments may be joined by linker peptides such as glycine-rich linker sequences (e.g. SEQ ID 30).

The invention also provides a polypeptide having formula $\text{NH}_2\text{-A-B-C-COOH}$, wherein: A is a polypeptide sequence consisting of a amino acids; C is a polypeptide sequence consisting of c amino acids; B is a polypeptide sequence which is, as defined above, a fragment of at least x amino acids from the amino acid sequence of a variable region of an antibody of the invention, optionally with y amino acids within said x amino acids being substituted by different amino acid(s). The polypeptide preferably has microbicidal and/or antiviral activity.

The value of a is generally at least 1 (e.g. at least 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 etc.). The value of c is generally at least 1 (e.g. at least 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 etc.). The value of $a+c$ is at least 1 (e.g. at least 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 etc.). It is preferred that the value of $a+c$ is at most 1000 (e.g. at most 900, 800, 700, 600, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2).

The amino acid sequence of -A- typically shares less than $m\%$ sequence identity to the a amino acids which are N-terminal of sequence -B- in a variable region of an antibody of the invention (e.g. in SEQ ID 2), and the amino acid sequence of -C- typically shares less than $n\%$ sequence identity to the c amino acids which are C-terminal of sequence -B- in a variable region of an antibody of the invention (e.g. in SEQ ID 2). In general, the values of m and n are both 60 or less (e.g. 50, 40, 30, 20, 10 or less). The values of m and n may be the same as or different from each other.

The polypeptide may comprise a mimotope of a yeast killer toxin.

Preferred polypeptides comprise sequence AA₁-AA₂-AA₃-AA₄-AA₅-AA₆-AA₇-AA₈-AA₉-AA₁₀, wherein: each of AA₁...AA₁₀ is independently a D- or L- amino acid; AA₁ is E, A or G; AA₂ is K, A or G; AA₃ is V, A or G; AA₄ is T, A or G; AA₅ is M, A or G; AA₆ is T, A or G; AA₇ is C, S, A or G; AA₈ is S, A or G; AA₉ is A or G; and AA₁₀ is S, A or G; provided that no more than *p* of AA₁, AA₂, AA₃, AA₄, AA₅, AA₆, AA₇, AA₈, AA₉, and AA₁₀ are A; and provided that no more than *q* of AA₁, AA₂, AA₃, AA₄, AA₅, AA₆, AA₇, AA₈, AA₉, and AA₁₀ are G. The value of *p* is 1, 2, 3 or 4, and is preferably 1 or 2. The value of *q* is 0, 1 or 2 and is preferably 0 (i.e. no glycine residues) or 1.

Particularly preferred polypeptides comprise or consist of amino acid sequences SEQ IDs: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 23, 24, 25, 26, 27, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70 & 71, with constituent amino acids in the D- and/or L- configuration. SEQ IDs 3, 4, 23, 27 and 33 are most preferred.

For reference, the values of *x*, *y* and *z* for various of these polypeptide sequences are as follows:

SEQ ID	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>
3	10	0	3
4	10	1	3
5	10	1	3
6	10	1	3
7	10	1	3
8	10	1	3
9	10	1	3
10	10	1	3
11	10	1	3
12	10	1	3
14	9	1	2
15	8	1	1
16	7	1	0
17	6	1	0
18	5	1	0
19	4	1	0
20	3	1	0
23	10	2	3
24	10	0	3
26	15	0	8
27	9	0	8
32	10	2	3
33	10	2	3

Further microbicidal and/or antiviral fragments can be identified by screening panels of overlapping peptide fragments once the sequence of an anti-idiotypic antibody (e.g. H6, H20, K20) is known e.g. by using the *PepScan* method [34]. Overlapping fragments of 4mers, 5mers, 6mers, 7mers, 8mers, 9mers, 10mers, 11mers, 12mers, 13mers *etc.* can be tested for microbicidal ability without difficulty e.g. using the *in vitro* assays disclosed in the examples herein.

Polypeptides of the invention may be linear, branched or cyclic [35] but they are preferably linear chains of amino acids. Where cysteine residues are present, polypeptides of the invention may be linked to other polypeptides via disulfide bridges (and, in particular, linked to other polypeptides of the invention to form homodimers or heterodimers). Polypeptides of the invention may comprise L-amino acids and/or D-amino acids. The inclusion of D-amino acids is preferred in order to confer resistance to mammalian proteases.

Polypeptide production

Polypeptides of the invention may be produced by various means.

A preferred method for production involves *in vitro* chemical synthesis [36, 37]. Solid-phase peptide synthesis is particularly preferred, such as methods based on t-Boc or Fmoc [38] chemistry. Enzymatic synthesis [39] may also be used in part or in full.

As an alternative to chemical synthesis, biological synthesis may be used *e.g.* the polypeptides may be produced by translation. This may be carried out *in vitro* or *in vivo*. Biological methods are in general restricted to the production of polypeptides based on L-amino acids, but manipulation of translation machinery (*e.g.* of aminoacyl-tRNA molecules) can be used to allow the introduction of D-amino acids (or of other non-natural amino acids, such as iodotyrosine or methylphenylalanine, azidohomoalanine, *etc.*) [40]. Where D-amino acids are included in the polypeptides of the invention, however, it is preferred to use chemical synthesis. Further details on polypeptide expression are given below.

To facilitate biological peptide synthesis, the invention provides nucleic acid that encodes a polypeptide of the invention. The invention also provides nucleic acid that encodes an antibody of the invention.

The nucleic acid may be DNA or RNA (or hybrids thereof), or their analogues, such as those containing modified backbones (*e.g.* phosphorothioates) or peptide nucleic acids (PNA). It may be single-stranded (*e.g.* mRNA) or double-stranded, and the invention includes both individual strands of a double-stranded nucleic acid (*e.g.* for antisense, priming or probing purposes). It may be linear or circular. It may be labelled. It may be attached to a solid support.

Nucleic acid according to the invention can, of course, be prepared in many ways *e.g.* by chemical synthesis (*e.g.* phosphoramidite synthesis of DNA) in whole or in part, by nuclease digestion of longer molecules, by ligation of shorter molecules, from genomic or cDNA libraries, by use of polymerases *etc.*

The invention provides vectors (*e.g.* plasmids) comprising nucleic acid of the invention (*e.g.* expression vectors and cloning vectors) and host cells (prokaryotic or eukaryotic) transformed with such vectors.

These vectors can also be used for nucleic acid immunisation [*e.g.* refs. 41, 42, 43, 44, 45 *etc.*]. Peptides can be expressed *in vivo* in this way, as can therapeutic antibodies. It is also possible to

express idiotopes (e.g. the KT4 idiotope) to elicit anti-idiotypic antibodies of the invention in a patient *in vivo*.

Host cells which contain nucleic acid of the invention and which express polypeptide or antibody of the invention may be used as delivery vehicles e.g. commensal bacteria [46]. This is particularly useful for delivery to mucosal surfaces.

The yeast killer toxin

Killer toxins were originally identified in *Saccharomyces cerevisiae* [47] and have since been identified in other genera of yeasts including *Pichia* (such as *P.anomala*, *P.kluyveri* and *P.farinosa*), *Hanseniaspora* (such as *H.uvarum*), *Williopsis* (such as *W.mrakii*), *Candida* (such as *C.maltosa*), *Debaryomyces* (such as *D.hansenii*), *Schwanniomyces* (such as *S.occidentalis*), *Cryptococcus* (such as *C.humicola*), *Torulopsis* (such as *T.glabrata*), *Ustilago* (such as *U.maydis*), *Zygosaccharomyces* (such as *Z.bailii*) and *Kluyveromyces* (such as *K.lactis* and *K.phaffii*).

Any of these various toxins can be used with the present invention. Preferred toxins are (a) those with a broad range of microbicidal activity and (b) those from *Pichia*. A particularly preferred toxin is the killer toxin from *Pichia anomala* ('PaKT').

Microbicidal activity

The polypeptide or antibody of the invention preferably has microbicidal activity.

Preferably, it has anti-mycotic activity and/or anti-bacterial activity. Anti-bacterial activity may be against a Gram-negative or Gram-positive bacterium.

More preferably, it has activity against a microbe which has a glucan-based cell wall.

Microbes which are susceptible to polypeptides and antibodies of the invention include bacteria, fungi and protozoa, and include, but are not limited to: *Candida* species, such as *C.albicans*; *Cryptococcus* species, such as *C.neoformans*; *Enterococcus* species, such as *E.faecalis*; *Streptococcus* species, such as *S.pneumoniae*, *S.mutans*, *S.agalactiae* and *S.pyogenes*; *Leishmania* species, such as *L.major* and *L.infantum*; *Acanthamoeba* species, such as *A.castellani*; *Aspergillus* species, such as *A.fumigatus*; *Pneumocystis* species, such as *P.carinii*; *Mycobacterium* species, such as *M.tuberculosis*; *Pseudomonas* species, such as *P.aeruginosa*; *Staphylococcus* species, such as *S.aureus*; *Salmonella* species, such as *S.typhimurium*; and *Escherichia* species, such as *E.coli*.

Antiviral activity

The polypeptide or antibody of the invention preferably has antiviral activity.

Preferably, it has antiviral activity against a human virus, such as a myxovirus (e.g. an orthomyxovirus) or a retrovirus (e.g. a lentivirus).

Viruses which are susceptible to polypeptides and antibodies of the invention include, but are not limited to: influenza virus (A or B), human immunodeficiency virus (HIV-1, HIV-2, HIV-O), respiratory syncytial virus (RSV), yellow fever virus, etc.

Drug design and peptidomimetics

Polypeptides of the invention are useful microbicides and antivirals in their own right. However, they may be refined to improve microbicidal and/or antiviral activity (either general or specific) or to improve pharmacologically important features such as bio-availability, toxicology, metabolism, pharmacokinetics *etc.* The polypeptides may therefore be used as lead compounds for further research and refinement.

Polypeptides of the invention can be used for designing peptidomimetic molecules [e.g. refs. 48 to 53] with microbicidal and/or antiviral activity. These will typically be isosteric with respect to the polypeptides of the invention but will lack one or more of their peptide bonds. For example, the peptide backbone may be replaced by a non-peptide backbone while retaining important amino acid side chains.

The peptidomimetic molecule may comprise sugar amino acids [54]. Peptoids may be used.

To assist in the design of peptidomimetic molecules, a pharmacophore (*i.e.* a collection of chemical features and 3D constraints that expresses specific characteristics responsible for activity) can be defined for the KM peptides. The pharmacophore preferably includes surface-accessible features, more preferably including hydrogen bond donors and acceptors, charged/ionisable groups, and/or hydrophobic patches. These may be weighted depending on their relative importance in conferring activity [55].

Pharmacophores can be determined using software such as CATALYST (including HypoGen or HipHop) [56], CERIUS², or constructed by hand from a known conformation of a polypeptide of the invention. The pharmacophore can be used to screen structural libraries, using a program such as CATALYST. The CLIX program [57] can also be used, which searches for orientations of candidate molecules in structural databases that yield maximum spatial coincidence with chemical groups which interact with the receptor.

The binding surface or pharmacophore can be used to map favourable interaction positions for functional groups (e.g. protons, hydroxyl groups, amine groups, hydrophobic groups) or small molecule fragments. Compounds can then be designed *de novo* in which the relevant functional groups are located in substantially the same spatial relationship as in polypeptides of the invention.

Functional groups can be linked in a single compound using either bridging fragments with the correct size and geometry or frameworks which can support the functional groups at favourable orientations, thereby providing a peptidomimetic compound according to the invention. Whilst linking of functional groups in this way can be done manually, perhaps with the help of software such as QUANTA or SYBYL, automated or semi-automated *de novo* design approaches are also available, such as:

- MCSS/HOOK [58, 59, 56], which links multiple functional groups with molecular templates taken from a database.

- LUDI [60, 56], which computes the points of interaction that would ideally be fulfilled by a ligand, places fragments in the binding site based on their ability to interact with the receptor, and then connects them to produce a ligand.
- MCDLNG [61], which fills a receptor binding site with a close-packed array of generic atoms and uses a Monte Carlo procedure to randomly vary atom types, positions, bonding arrangements and other properties.
- GROW [62], which starts with an initial 'seed' fragment (placed manually or automatically) and grows the ligand outwards.
- SPROUT [63], suite which includes modules to: identify favourable hydrogen bonding and hydrophobic regions within a binding pocket (HIPPO module); select functional groups and position them at target sites to form starting fragments for structure generation (EleFANT); generate skeletons that satisfy the steric constraints of the binding pocket by growing spacer fragments onto the start fragments and then connecting the resulting part skeletons (SPIDeR); substitute hetero atoms into the skeletons to generate molecules with the electrostatic properties that are complementary to those of the receptor site (MARABOU). The solutions can be clustered and scored using the ALLigATOR module.
- CAVEAT [64], which designs linking units to constrain acyclic molecules.
- LEAPFROG [65], which evaluates ligands by making small stepwise structural changes and rapidly evaluating the binding energy of the new compound. Changes are kept or discarded based on the altered binding energy, and structures evolve to increase the interaction energy with the receptor.
- GROUPEBUILD [66], which uses a library of common organic templates and a complete empirical force field description of the non-bonding interactions between a ligand and receptor to construct ligands that have chemically reasonable structure and have steric and electrostatic properties complimentary to the receptor binding site.
- RASSE [67]

These methods identify microbicidal compounds. These compounds may be designed *de novo*, may be known compounds, or may be based on known compounds. The compounds may be useful microbicides and/or antivirals themselves, or they may be prototypes which can be used for further pharmaceutical refinement (*i.e.* lead compounds) in order to improve binding affinity or other pharmacologically important features (*e.g.* bio-availability, toxicology, metabolism, pharmacokinetics *etc.*).

The invention thus provides: (i) a compound identified using these drug design methods; (ii) a compound identified using these drug design methods, for use as a pharmaceutical; (iii) the use of a compound identified using these drug design methods in the manufacture of a microbicide and/or an antiviral; and (iv) a method of treating a patient with a microbial or viral infection, comprising administering an effective amount of a compound identified using these drug design methods.

17

As well as being useful compounds individually, ligands identified *in silico* by the structure-based design techniques can also be used to suggest libraries of compounds for 'traditional' *in vitro* or *in vivo* screening methods. Important pharmaceutical motifs in the ligands can be identified and mimicked in compound libraries (e.g. combinatorial libraries) for screening for microbicidal and/or antiviral activity.

Pharmaceutical compositions

The invention provides a pharmaceutical composition comprising (a) polypeptide, peptidomimetic, nucleic acid and/or antibody of the invention and (b) a pharmaceutical carrier.

Component (a) is the active ingredient in the composition, and this is present at a therapeutically effective amount *i.e.* an amount sufficient to inhibit microbial/viral growth and/or survival in a patient, and preferably an amount sufficient to eliminate microbial infection. The precise effective amount for a given patient will depend upon their size and health, the nature and extent of infection, and the composition or combination of compositions selected for administration. The effective amount can be determined by routine experimentation and is within the judgment of the clinician.

For purposes of the present invention, an effective dose will generally be from about 0.01mg/kg to about 5 mg/kg, or about 0.01 mg/ kg to about 50 mg/kg or about 0.05 mg/kg to about 10 mg/kg. Pharmaceutical compositions based on polypeptides, antibodies and nucleic acids are well known in the art. Polypeptides may be included in the composition in the form of salts and/or esters.

Carrier (b) can be any substance that does not itself induce the production of antibodies harmful to the patient receiving the composition, and which can be administered without undue toxicity. Suitable carriers can be large, slowly metabolized macromolecules such as proteins, polysaccharides, polylactic acids, polyglycolic acids, polymeric amino acids, amino acid copolymers, and inactive virus particles. Such carriers are well known to those of ordinary skill in the art. Pharmaceutically acceptable carriers can include liquids such as water, saline, glycerol and ethanol. Auxiliary substances, such as wetting or emulsifying agents, pH buffering substances, and the like, can also be present in such vehicles. Liposomes are suitable carriers. A thorough discussion of pharmaceutical carriers is available in ref. 68.

Viral and microbial infections affect various areas of the body and so the compositions of the invention may be prepared in various forms. For example, the compositions may be prepared as injectables, either as liquid solutions or suspensions. Solid forms suitable for solution in, or suspension in, liquid vehicles prior to injection can also be prepared. The composition may be prepared for topical administration *e.g.* as an ointment, cream or powder. The composition be prepared for oral administration *e.g.* as a tablet or capsule, or as a syrup (optionally flavoured). The composition may be prepared for pulmonary administration *e.g.* as an inhaler, using a fine powder or a spray. The composition may be prepared as a suppository or pessary. The composition may be prepared for nasal, aural or ocular administration *e.g.* as drops, as a spray, or as a powder [*e.g.* 69]. The composition may be included in a mouthwash. The composition may be lyophilised.

18

The pharmaceutical composition is preferably sterile. It is preferably pyrogen-free. It is preferably buffered e.g. at between pH 6 and pH 8, generally around pH 7.

The invention also provides a delivery device containing a pharmaceutical composition of the invention. The device may be, for example, a syringe or an inhaler.

- 5 Compositions of the invention may be used in conjunction with known anti-fungals. Suitable anti-fungals include, but are not limited to, azoles (e.g. fluconazole, itraconazole), polyenes (e.g. amphotericin B), flucytosine, and squalene epoxidase inhibitors (e.g. terbinafine) [see also ref. 70]. Compositions may also be used in conjunction with known antivirals e.g. HIV protease inhibitors, a 2',3'-dideoxynucleoside (e.g. DDC, DDI), 3'-azido-2',3'-dideoxynucleosides (AZT), 3'-fluoro-2',3'-
10 dideoxynucleosides (FLT), 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxynucleosides (e.g. D4C, D4T) and carbocyclic derivatives thereof (e.g. carbovir), 2'-fluoro-ara-2',3'-dideoxynucleosides, 1,3-dioxolane derivatives (e.g. 2',3'-dideoxyl-3'-thiacytidine), oxetanocin analogues and carbocyclic derivatives thereof (e.g. cyclobut-G) and the 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine (PMEA) and 9-(3-fluoro-2-phosphonylmethoxypropyl)adenine (FPMPA) derivatives, tetrahydro-imidazo[4,5,1-jk][1,4]-
15 benzodiazepin-2(1H)one (TIBO), 1-[(2-hydroxyethoxy)-methyl]-6-(phenylthio)thymine (HEPT), dipyrido[3,2-b:2',3'-c]-[1,4]diazepin-6-one (nevirapine) and pyridin-2(1H)one derivatives, 3TC, etc.

Medical treatments and uses

- The invention provides antibody, polypeptide, peptidomimetic or nucleic acid of the invention for use as a medicament. The invention also provides a method for treating a patient suffering from a
20 microbial and/or viral infection, comprising administering to the patient a pharmaceutical composition of the invention. The invention also provides the use of antibody, polypeptide, peptidomimetic or nucleic acid of the invention in the manufacture of a medicament for treating a patient.

- () 25 The patient is preferably a human. The human may be an adult or, preferably, a child. The human may be immunocompromised.

- These uses and methods are particularly useful for treating infections of: *Candida* species, such as *C.albicans*; *Cryptococcus* species, such as *C.neoformans*; *Enterococcus* species, such as *E.faecalis*; *Streptococcus* species, such as *S.pneumoniae*, *S.mutans*, *S.galactiae* and *S.pyogenes*; *Leishmania* species, such as *L.major* and *L.infantum*; *Acanthamoeba* species, such as *A.castellani*; *Aspergillus*
30 species, such as *A.fumigatus* and *A.flavus*; *Pneumocystis* species, such as *P.carinii*; *Mycobacterium* species, such as *M.tuberculosis*; *Pseudomonas* species, such as *P.aeruginosa*; *Staphylococcus* species, such as *S.aureus*; *Salmonella* species, such as *S.typhimurium*; *Coccidioides* species such as *C.immitis*; *Trichophyton* species such as *T.verrucosum*; *Blastomyces* species such as *B.dermatidis*; *Histoplasma* species such as *H.capsulatum*; *Paracoccidioides* species such as *P.brasiliensis*;
35 *Pythium* species such as *P.insidiosum*, and *Escherichia* species, such as *E.coli*. They are also useful for treating infections of: influenza viruses and HIV.

The uses and methods are particularly useful for treating diseases including, but not limited to: candidosis, aspergillosis, cryptococcosis, dermatomycoses, sporothrychosis and other subcutaneous

mycoses, blastomycosis, histoplasmosis, coccidiomycosis, paracoccidiomycosis, pneumocystosis, thrush, tuberculosis, mycobacteriosis, respiratory infections, scarlet fever, pneumonia, impetigo, rheumatic fever, sepsis, septicaemia, cutaneous and visceral leishmaniasis, corneal acanthamoebiasis, keratitis, cystic fibrosis, typhoid fever, gastroenteritis and hemolytic-uremic syndrome, flu and AIDS. Anti-*C.albicans* activity is particularly useful for treating infections in AIDS patients.

Efficacy of treatment can be tested by monitoring microbial/viral infection after administration of the pharmaceutical composition of the invention.

Compositions of the invention will generally be administered directly to a patient. Direct delivery may be accomplished by parenteral injection (e.g. subcutaneously, intraperitoneally, intravenously, intramuscularly, or to the interstitial space of a tissue), or by rectal, oral, vaginal, topical, transdermal, ocular, nasal, aural, or pulmonary administration. Injection or intranasal administration is preferred.

Dosage treatment can be a single dose schedule or a multiple dose schedule.

Pharmaceutical compositions of the invention may also be used prophylactically e.g. in a situation where contact with microbes is expected and where establishment of infection is to be prevented. For instance, the composition may be administered prior to surgery.

Polypeptide expression and other general techniques

The practice of the present invention will employ, unless otherwise indicated, conventional techniques of molecular biology, microbiology, recombinant DNA, and immunology, which are within the skill of the art. Such techniques are explained fully in the literature e.g. Sambrook *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition* (1989); *DNA Cloning, Volumes I and II* (D.N Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait ed, 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. 1984); *Transcription and Translation* (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. 1984); *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney ed. 1986); *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, 1986); B. Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); the *Methods in Enzymology* series (Academic Press, Inc.), especially volumes 154 & 155; *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.H. Miller and M.P. Calos eds. 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Mayer and Walker, eds. (1987), *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Academic Press, London); Scopes, (1987) *Protein Purification: Principles and Practice*, Second Edition (Springer-Verlag, N.Y.), and *Handbook of Experimental Immunology, Volumes I-IV* (Weir & Blackwell eds 1986).

Standard abbreviations for nucleotides and amino acids are used in this specification:

Nucleotides

A	Adenine	C	Cytosine	G	Guanine	T	Thymine
U	Uracil						

Degenerate nucleotide codes in addition to the five above codes:

N	any (A/C/G/T)	R	puRine (G/A)	Y	pYrimidine (T/C)	K	Keto (G/T)
M	aMino (A/C)	S	Strong (G/C)	W	Weak (A/T)	B	not A (C/G/T)
D	not C (A/G/T)	H	not G (A/C/T)	V	not T (A/C/G)		

Amino acids

A	<u>Al</u> anine	C	<u>Cy</u> steine	D	<u>As</u> partate	E	<u>Gl</u> utamate
F	<u>Ph</u> enylalanine	G	<u>Gl</u> ycine	H	<u>His</u> tidine	I	<u>Iso</u> leucine

K	<u>Lysine</u>	L	<u>Leucine</u>	M	<u>Methionine</u>	N	<u>Asparagine</u>
P	<u>Proline</u>	Q	<u>Glutamine</u>	R	<u>Arginine</u>	S	<u>Serine</u>
T	<u>Threonine</u>	V	<u>Valine</u>	W	<u>Tryptophan</u>	Y	<u>Tyrosine</u>

5 The invention provides a polypeptide or nucleic acid comprising or consisting of any one of amino acid or nucleotide sequences given in the sequence listing.

Definitions

The term "comprising" means "including" as well as "consisting" e.g. a composition "comprising" X may consist exclusively of X or may include something additional to X, such as X+Y.

10 A composition containing X is "substantially free of" Y when at least 85% by weight of the total X+Y in the composition is X. Preferably, X comprises at least about 90% by weight of the total of X+Y in the composition, more preferably at least about 95% or even 99% by weight.

15 The term "heterologous" refers to two biological components that are not found together in nature. The components may be host cells, genes, or regulatory regions, such as promoters. Although the heterologous components are not found together in nature, they can function together, as when a promoter heterologous to a gene is operably linked to the gene. Another example is where an influenza sequence is heterologous to a mouse host cell. Further examples would be two epitopes from the same or different proteins which have been assembled in a single protein in an arrangement not found in nature.

20 An "origin of replication" is a polynucleotide sequence that initiates and regulates replication of polynucleotides, such as an expression vector. The origin of replication behaves as an autonomous unit of polynucleotide replication within a cell, capable of replication under its own control. An origin of replication may be needed for a vector to replicate in a particular host cell. With certain origins of replication, an expression vector can be reproduced at a high copy number in the presence of the appropriate proteins within the cell. Examples of origins are the autonomously replicating sequences, which are effective in yeast; and the viral T-antigen, effective in COS-7 cells.

25 A "mutant" sequence is defined as DNA, RNA or amino acid sequence differing from but having sequence identity with the native or disclosed sequence. Depending on the particular sequence, the degree of sequence identity between the native or disclosed sequence and the mutant sequence is preferably greater than 50% (e.g. 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% or more, calculated using the Smith-Waterman algorithm as described above). As used herein, an "allelic variant" of a nucleic acid molecule, or region, for which nucleic acid sequence is provided herein is a nucleic acid molecule, or region, that occurs essentially at the same locus in the genome of another or second isolate, and that, due to natural variation caused by, for example, mutation or recombination, has a similar but not identical nucleic acid sequence. A coding region allelic variant typically encodes a protein having similar activity to that of the protein encoded by the gene to which it is being compared. An allelic variant can also comprise an alteration in the 5' or 3' untranslated regions of the gene, such as in regulatory control regions (e.g. see US patent 5,753,235).

Polypeptide expression

35 Nucleotide sequences can be expressed in a variety of different expression systems; for example those used with mammalian cells, baculoviruses, plants, bacteria, and yeast.

Generally, any system or vector that is suitable to maintain, propagate or express nucleic acid molecules to produce a polypeptide in the required host may be used. The appropriate nucleotide sequence may be inserted into an expression system by any of a variety of well-known and routine techniques, such as, for example, those described in Sambrook *et al.* Generally, the encoding gene can be placed under the control of a control element such as a promoter, ribosome binding site (for bacterial expression) and, optionally, an operator, so that the DNA sequence encoding the desired polypeptide is transcribed into RNA

40

21

in the transformed host cell.

Examples of suitable expression systems include, for example, chromosomal, episomal and virus -derived systems, including, for example, vectors derived from: bacterial plasmids, bacteriophage, transposons, yeast episomes, insertion elements, yeast chromosomal elements, viruses such as baculoviruses, papova viruses such as SV40, vaccinia viruses, adenoviruses, fowl pox viruses, pseudorabies viruses and retroviruses, or combinations thereof, such as those derived from plasmid and bacteriophage genetic elements, including cosmids and phagemids. Human artificial chromosomes (HACs) may also be employed to deliver larger fragments of DNA than can be contained and expressed in a plasmid.

Particularly suitable expression systems include microorganisms such as bacteria transformed with recombinant bacteriophage, plasmid or cosmid DNA expression vectors; yeast transformed with yeast expression vectors; insect cell systems infected with virus expression vectors (for example, baculovirus); plant cell systems transformed with virus expression vectors (for example, cauliflower mosaic virus, CaMV; tobacco mosaic virus, TMV) or with bacterial expression vectors (for example, Ti or pBR322 plasmids); or animal cell systems. Cell -free translation systems can also be employed to produce the polypeptides of the invention.

Introduction of nucleic acid molecules encoding a polypeptide of the present invention into host cells can be effected by methods described in many standard laboratory manuals, such as Davis et al., *Basic Methods in Molecular Biology* (1986) and Sambrook et al., (*supra*). Particularly suitable methods include calcium phosphate transfection, DEAE -dextran mediated transfection, transfection, microinjection, cationic lipid -mediated transfection, electroporation, transduction, scrape loading, ballistic introduction or infection (see Sambrook et al., 1989 [*supra*]; "Current Protocols in Molecular Biology", Ausubel et al. (eds). Greene Publishing Association and John Wiley Interscience, New York, 1989,1992; Spector, Goldman & Leinwald, 1998). In eukaryotic cells, expression systems may either be transient (for example, episomal) or permanent (chromosomal integration) according to the needs of the system.

For long-term, high-yield production of a recombinant polypeptide, stable expression is preferred. For example, cell lines which stably express the polypeptide of interest may be transformed using expression vectors which may contain viral origins of replication and/or endogenous expression elements and a selectable marker gene on the same or on a separate vector.

Following the introduction of the vector, cells may be allowed to grow for 1 -2 days in an enriched media before they are switched to selective media. The purpose of the selectable marker is to confer resistance to selection, and its presence allows growth and recovery of cells that successfully express the introduced sequences. Resistant clones of stably transformed cells may be proliferated using tissue culture techniques appropriate to the cell type.

I. Mammalian Systems

Mammalian expression systems are known in the art. A mammalian promoter is any DNA sequence capable of binding mammalian RNA polymerase and initiating the downstream (3') transcription of a coding sequence (e.g. structural gene) into mRNA. A promoter will have a transcription initiating region, which is usually placed proximal to the 5' end of the coding sequence, and a TATA box, usually located 25 -30 base pairs (bp) upstream of the transcription initiation site. The TATA box is thought to direct RNA polymerase II to begin RNA synthesis at the correct site. A mammalian promoter will also contain an upstream promoter element, usually located within 100 to 200 bp upstream of the TATA box. An upstream promoter element determines the rate at which transcription is initiated and can act in either orientation [Sambrook et al. (1989) "Expression of Cloned Genes in Mammalian Cells." In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed.] .

Mammalian viral genes are often highly expressed and have a broad host range; therefore sequences encoding mammalian viral genes provide particularly useful promoter sequences. Examples include the SV40 early promoter, mouse mammary tumor virus LTR promoter, adenovirus major late promoter (Ad MLP), and herpes simplex virus promoter. In addition, sequences derived from non-viral genes, such as the murine metallothionein gene, also provide useful promoter sequences.

5 Expression may be either constitutive or regulated (inducible), depending on the promoter can be induced with glucocorticoid in hormone-responsive cells.

The presence of an enhancer element (enhancer), combined with the promoter elements described above, will usually increase expression levels. An enhancer is a regulatory DNA sequence that can stimulate transcription up to 1000-fold when linked to homologous or heterologous promoters, with synthesis beginning at the normal RNA start site. Enhancers are also active when
10 they are placed upstream or downstream from the transcription initiation site, in either normal or flipped orientation, or at a distance of more than 1000 nucleotides from the promoter [Maniatis et al. (1987) *Science* 236:1237; Alberts et al. (1989) *Molecular Biology of the Cell*, 2nd ed.]. Enhancer elements derived from viruses may be particularly useful, because they usually have a broader host range. Examples include the SV40 early gene enhancer [Dijkema et al (1985) *EMBO J.* 4:761] and the enhancer/promoters derived from the long terminal repeat (LTR) of the Rous Sarcoma Virus [Gorman et al. (1982b) *PNAS*
15 *USA* 79:6777] and from human cytomegalovirus [Boshart et al. (1985) *Cell* 41:521]. Additionally, some enhancers are regulatable and become active only in the presence of an inducer, such as a hormone or metal ion [Sassone-Corsi and Borelli (1986) *Trends Genet.* 2:215; Maniatis et al. (1987) *Science* 236:1237].

A DNA molecule may be expressed intracellularly in mammalian cells. A promoter sequence may be directly linked with the DNA molecule, in which case the first amino acid at the N-terminus of the recombinant protein will always be a methionine,
20 which is encoded by the ATG start codon. If desired, the N-terminus may be cleaved by *in vitro* incubation with cyanogen bromide.

Alternatively, foreign proteins can also be secreted from the cell into the growth media by creating chimeric DNA molecules that encode a fusion protein comprised of a leader sequence fragment that provides for secretion of the foreign protein in mammalian cells. Preferably, there are processing sites encoded between the leader fragment and the foreign gene that can be
25 cleaved either *in vivo* or *in vitro*. The leader sequence fragment usually encodes a signal peptide comprised of hydrophobic amino acids which direct the secretion of the protein from the cell. The adenovirus tripartite leader is an example of a leader sequence that provides for secretion of a foreign protein in mammalian cells.

Usually, transcription termination and polyadenylation sequences recognized by mammalian cells are regulatory regions located 3' to the translation stop codon and thus, together with the promoter elements, flank the coding sequence. The 3'
30 terminus of the mature mRNA is formed by site-specific post-transcriptional cleavage and polyadenylation [Birnstiel et al. (1985) *Cell* 41:349; Proudfoot and Whitelaw (1988) "Termination and 3' end processing of eukaryotic RNA. In *Transcription and splicing* (ed. B.D. Hames and D.M. Glover); Proudfoot (1989) *Trends Biochem. Sci.* 14:105]. These sequences direct the transcription of an mRNA which can be translated into the polypeptide encoded by the DNA. Examples of transcription terminator/polyadenylation signals include those derived from SV40 [Sambrook et al (1989) "Expression of cloned genes in
35 cultured mammalian cells." In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*].

Usually, the above described components, comprising a promoter, polyadenylation signal, and transcription termination sequence are put together into expression constructs. Enhancers, introns with functional splice donor and acceptor sites, and leader sequences may also be included in an expression construct, if desired. Expression constructs are often maintained in a replicon, such as an extrachromosomal element (e.g. plasmids) capable of stable maintenance in a host, such as mammalian
40 cells or bacteria. Mammalian replication systems include those derived from animal viruses, which require trans-acting factors to replicate. For example, plasmids containing the replication systems of papovaviruses, such as SV40 [Gluzman (1981) *Cell*

23:175] or polyomavirus, replicate to extremely high copy number in the presence of the appropriate viral T antigen. Additional examples of mammalian replicons include those derived from bovine papillomavirus and Epstein-Barr virus. Additionally, the replicon may have two replication systems, thus allowing it to be maintained, for example, in mammalian cells for expression and in a prokaryotic host for cloning and amplification. Examples of such mammalian-bacteria shuttle vectors include pMT2 [Kaufman et al. (1989) *Mol. Cell. Biol.* 9:946] and pHEBO [Shimizu et al. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6:1074].

The transformation procedure used depends upon the host to be transformed. Methods for introduction of heterologous polynucleotides into mammalian cells are known in the art and include dextran-mediated transfection, calcium phosphate precipitation, polybrene mediated transfection, protoplast fusion, electroporation, encapsulation of the polynucleotide(s) in liposomes, and direct microinjection of the DNA into nuclei.

Mammalian cell lines available as hosts for expression are known in the art and include many immortalised cell lines available from the American Type Culture Collection (ATCC) including, but not limited to, Chinese hamster ovary (CHO), HeLa, baby hamster kidney (BHK), monkey kidney (COS), C127, 3T3, BHK, HEK 293, Bowes melanoma and human hepatocellular carcinoma (for example Hep G2) cells and a number of other cell lines.

15 II. Baculovirus Systems

The polynucleotide encoding the protein can also be inserted into a suitable insect expression vector, and is operably linked to the control elements within that vector. Vector construction employs techniques which are known in the art. Generally, the components of the expression system include a transfer vector, usually a bacterial plasmid, which contains both a fragment of the baculovirus genome, and a convenient restriction site for insertion of the heterologous gene or genes to be expressed; a wild type baculovirus with a sequence homologous to the baculovirus-specific fragment in the transfer vector (this allows for the homologous recombination of the heterologous gene in to the baculovirus genome); and appropriate insect host cells and growth media.

After inserting the DNA sequence encoding the protein into the transfer vector, the vector and the wild type viral genome are transfected into an insect host cell where the vector and viral genome are allowed to recombine. The packaged recombinant virus is expressed and recombinant plaques are identified and purified. Materials and methods for baculovirus/insect cell expression systems are commercially available in kit form e.g. from Invitrogen, San Diego CA ("MaxBac" kit). These techniques are generally known to those skilled in the art and fully described in Summers & Smith, *Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555* (1987) (hereinafter "Summers & Smith").

Prior to inserting the DNA sequence encoding the protein into the baculovirus genome, the above described components, comprising a promoter, leader (if desired), coding sequence of interest, and transcription termination sequence, are usually assembled into an intermediate transplacement construct (transfer vector). This construct may contain a single gene and operably linked regulatory elements; multiple genes, each with its own set of operably linked regulatory elements; or multiple genes, regulated by the same set of regulatory elements. Intermediate transplacement constructs are often maintained in a replicon, such as an extrachromosomal element (e.g. plasmids) capable of stable maintenance in a host, such as a bacterium. The replicon will have a replication system, thus allowing it to be maintained in a suitable host for cloning and amplification.

Currently, the most commonly used transfer vector for introducing foreign genes into AcNPV is pAc373. Many other vectors, known to those of skill in the art, have also been designed. These include, for example, pVL985 (which alters the polyhedrin

start codon from ATG to ATT, and which introduces a BamHI cloning site 32 basepairs downstream from the ATT; see Luckow and Summers, *Virology* (1989) 17:31.

The plasmid usually also contains a polyhedrin polyadenylation signal (Miller (1988) *Ann.Rev.Microbiol.* 42:177) and a prokaryotic ampicillin-resistance (*amp*) gene and origin of replication for selection and propagation in *E.coli*.

- 5 Baculovirus transfer vectors usually contain a baculovirus promoter. A baculovirus promoter is any DNA sequence capable of binding a baculovirus RNA polymerase and initiating the downstream (5' to 3') transcription of a coding sequence (e.g. structural gene) into mRNA. A promoter will have a transcription initiation region which is usually placed proximal to the 5' end of the coding sequence. This transcription initiation region usually includes an RNA polymerase binding site and a transcription initiation site. A baculovirus transfer vector may also have a second domain called an enhancer, which, if present,
10 is usually distal to the structural gene. Expression may be either regulated or constitutive.

Structural genes, abundantly transcribed at late times in a viral infection cycle, provide particularly useful promoter sequences. Examples include sequences derived from the gene encoding the viral polyhedrin protein, Friesen et al., (1986) "The Regulation of Baculovirus Gene Expression," in *The Molecular Biology of Baculoviruses* (ed. Walter Doerfler); EP-127839 & EP-155476; and the gene encoding the p10 protein, Vlak et al. (1988), *J. Gen. Virol.* 69:765.

- 15 DNA encoding suitable signal sequences can be derived from genes for secreted insect or baculovirus proteins, such as the baculovirus polyhedrin gene (Carbonell et al. (1988) *Gene*, 73:409). Alternatively, since the signals for mammalian cell posttranslational modifications (such as signal peptide cleavage, proteolytic cleavage, and phosphorylation) appear to be recognized by insect cells, and the signals required for secretion and nuclear accumulation also appear to be conserved
20 between the invertebrate cells and vertebrate cells, leaders of non-insect origin, such as those derived from genes encoding human γ -interferon, Maeda et al., (1985), *Nature* 315:592; human gastrin-releasing peptide, Lebacqz-Verheyden et al., (1988), *Molec. Cell. Biol.* 8:3129; human IL-2, Smith et al., (1985) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 82:8404; mouse IL-3, (Miyajima et al., (1987) *Gene* 58:273; and human glucocerebrosidase, Martin et al. (1988) *DNA*, 7:99, can also be used to provide for secretion in insects.

- A recombinant polypeptide or polyprotein may be expressed intracellularly or, if it is expressed with the proper regulatory
25 sequences, it can be secreted. Good intracellular expression of nonfused foreign proteins usually requires heterologous genes that ideally have a short leader sequence containing suitable translation initiation signals preceding an ATG start signal. If desired, methionine at the N-terminus may be cleaved from the mature protein by *in vitro* incubation with cyanogen bromide.

- Alternatively, recombinant polyproteins or proteins which are not naturally secreted can be secreted from the insect cell by creating chimeric DNA molecules that encode a fusion protein comprised of a leader sequence fragment that provides for
30 secretion of the foreign protein in insects. The leader sequence fragment usually encodes a signal peptide comprised of hydrophobic amino acids which direct the translocation of the protein into the endoplasmic reticulum.

- After insertion of the DNA sequence and/or the gene encoding the expression product precursor of the protein, an insect cell host is co-transformed with the heterologous DNA of the transfer vector and the genomic DNA of wild type baculovirus — usually by co-transfection. The promoter and transcription termination sequence of the construct will usually comprise a 2-5kb
35 section of the baculovirus genome. Methods for introducing heterologous DNA into the desired site in the baculovirus virus are known in the art. (See Summers & Smith *supra*; Ju et al. (1987); Smith et al., *Mol. Cell. Biol.* (1983) 3:2156; and Luckow and Summers (1989)). For example, the insertion can be into a gene such as the polyhedrin gene, by homologous double crossover recombination; insertion can also be into a restriction enzyme site engineered into the desired baculovirus gene. Miller et al., (1989), *Bioessays* 4:91. The DNA sequence, when cloned in place of the polyhedrin gene in the expression vector,
40 is flanked both 5' and 3' by polyhedrin-specific sequences and is positioned downstream of the polyhedrin promoter.

The newly formed baculovirus expression vector is subsequently packaged into an infectious recombinant baculovirus. Homologous recombination occurs at low frequency (between about 1% and about 5%); thus, the majority of the virus produced after cotransfection is still wild -type virus. Therefore, a method is necessary to identify recombinant viruses. An advantage of the expression system is a visual screen allowing recombinant viruses to be distinguished. The polyhedrin protein, which is produced by the native virus, is produced at very high levels in the nuclei of infected cells at late times after viral infection. Accumulated polyhedrin protein forms occlusion bodies that also contain embedded particles. These occlusion bodies, up to 15 μ m in size, are highly refractile, giving them a bright shiny appearance that is readily visualized under the light microscope. Cells infected with recombinant viruses lack occlusion bodies. To distinguish recombinant virus from wild -type virus, the transfection supernatant is plaqued onto a monolayer of insect cells by techniques known to those skilled in the art. Namely, the plaques are screened under the light microscope for the presence (indicative of wild -type virus) or absence (indicative of recombinant virus) of occlusion bodies. *Current Protocols in Microbiology* Vol. 2 (Ausubel et al. eds) at 16.8 (Supp. 10, 1990); Summers & Smith, *supra*; Miller et al. (1989).

Recombinant baculovirus expression vectors have been developed for infection into several insect cells. For example, recombinant baculoviruses have been developed for, *inter alia*: *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda*, and *Trichoplusia ni* (WO 89/046699; Carbonell et al., (1985) *J. Virol.* 56:153; Wright (1986) *Nature* 321:718; Smith et al., (1983) *Mol. Cell. Biol.* 3:2156; and see generally, Fraser, et al. (1989) *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 25:225).

Cells and cell culture media are commercially available for both direct and fusion expression of heterologous polypeptides in a baculovirus/expression system; cell culture technology is generally known to those skilled in the art. See, e.g. Summers & Smith *supra*.

The modified insect cells may then be grown in an appropriate nutrient medium, which allows for stable maintenance of the plasmid(s) present in the modified insect host. Where the expression product gene is under inducible control, the host may be grown to high density, and expression induced. Alternatively, where expression is constitutive, the product will be continuously expressed into the medium and the nutrient medium must be continuously circulated, while removing the product of interest and augmenting depleted nutrients. The product may be purified by such techniques as chromatography, e.g. HPLC, affinity chromatography, ion exchange chromatography, etc.; electrophoresis; density gradient centrifugation; solvent extraction, or the like. As appropriate, the product may be further purified, as required, so as to remove substantially any insect proteins which are also secreted in the medium or result from lysis of insect cells, so as to provide a product which is at least substantially free of host debris, e.g. proteins, lipids and polysaccharides.

In order to obtain protein expression, recombinant host cells derived from the transformants are incubated under conditions which allow expression of the recombinant protein encoding sequence. These conditions will vary, dependent upon the host cell selected. However, the conditions are readily ascertainable to those of ordinary skill in the art, based upon what is known in the art.

III. Plant Systems

There are many plant cell culture and whole plant genetic expression systems known in the art. Exemplary plant cellular genetic expression systems include those described in patents, such as: US 5,693,506; US 5,659,122; and US 5,608,143. Additional examples of genetic expression in plant cell culture has been described by Zenk, *Phytochemistry* 30:3861-3863 (1991). Descriptions of plant protein signal peptides may be found in addition to the references described above in Vancombe et al., *Mol. Gen. Genet.* 209:33-40 (1987); Chandler et al., *Plant Molecular Biology* 3:407-418 (1984); Rogers, *J. Biol. Chem.* 260:3731-3738 (1985); Rothstein et al., *Gene* 55:353-356 (1987); Whittier et al., *Nucleic Acids Research* 15:2515 -2535

(1987); Wiesel et al., *Molecular Microbiology* 3:3-14 (1989); Yu et al., *Gene* 122:247-253 (1992). A description of the regulation of plant gene expression by the phytohormone, gibberellic acid and secreted enzymes induced by gibberellic acid can be found in R.L. Jones and J. MacMillan, Gibberellins: in: *Advanced Plant Physiology*, Malcolm B. Wilkins, ed., 1984 Pitman Publishing Limited, London, pp. 21 -52. References that describe other metabolically -regulated genes: Sheen, *Plant Cell*, 2:1027-1038(1990); Maas et al., *EMBO J.* 9:3447-3452 (1990); Benkel & Hickey, *PNAS USA* 84:1337-1339 (1987)

Typically, using techniques known in the art, a desired polynucleotide sequence is inserted into an expression cassette comprising genetic regulatory elements designed for operation in plants. The expression cassette is inserted into a desired expression vector with companion sequences upstream and downstream from the expression cassette suitable for expression in a plant host. The companion sequences will be of plasmid or viral origin and provide necessary characteristics to the vector to permit the vectors to move DNA from an original cloning host, such as bacteria, to the desired plant host. The basic bacterial/plant vector construct will preferably provide a broad host range prokaryote replication origin; a prokaryote selectable marker; and, for *Agrobacterium* transformations, T DNA sequences for *Agrobacterium* -mediated transfer to plant chromosomes. Where the heterologous gene is not readily amenable to detection, the construct will preferably also have a selectable marker gene suitable for determining if a plant cell has been transformed. A general review of suitable markers, e.g. for the members of the grass family, is found in Wilmiak & Dons, 1993, *Plant Mol. Biol. Rept.*, 11(2):163-185.

Sequences suitable for permitting integration of the heterologous sequence into the plant genome are also recommended. These might include transposon sequences and the like for homologous recombination as well as Ti sequences which permit random insertion of a heterologous expression cassette into a plant genome. Suitable prokaryote selectable markers include resistance toward antibiotics such as ampicillin or tetracycline. Other DNA sequences encoding additional functions may also be present in the vector, as is known in the art.

The nucleic acid molecules of the subject invention may be included into an expression cassette for expression of the protein(s) of interest. Usually, there will be only one expression cassette, although two or more are feasible. The recombinant expression cassette will contain in addition to the heterologous protein encoding sequence the following elements, a promoter region, plant 5' untranslated sequences, initiation codon depending upon whether or not the structural gene comes equipped with one, and a transcription and translation termination sequence. Unique restriction enzyme sites at the 5' and 3' ends of the cassette allow for easy insertion into a pre-existing vector.

A heterologous coding sequence may be for any protein relating to the present invention. The sequence encoding the protein of interest will encode a signal peptide which allows processing and translocation of the protein, as appropriate, and will usually lack any sequence which might result in the binding of the desired protein of the invention to a membrane. Since, for the most part, the transcriptional initiation region will be for a gene which is expressed and translocated during germination, by employing the signal peptide which provides for translocation, one may also provide for translocation of the protein of interest. In this way, the protein(s) of interest will be translocated from the cells in which they are expressed and may be efficiently harvested. Typically secretion in seeds are across the aleurone or scutellar epithelium layer into the endosperm of the seed. While it is not required that the protein be secreted from the cells in which the protein is produced, this facilitates the isolation and purification of the recombinant protein.

Since the ultimate expression of the desired gene product will be in a eucaryotic cell it is desirable to determine whether any portion of the cloned gene contains sequences which will be processed out as introns by the host's splicosome machinery. If so, site-directed mutagenesis of the "intron" region may be conducted to prevent losing a portion of the genetic message as a false intron code, Reed and Maniatis, *Cell* 41:95-105, 1985.

The vector can be microinjected directly into plant cells by use of micropipettes to mechanically transfer the recombinant DNA. Crossway, *Mol. Gen. Genet*, 202:179-185, 1985. The genetic material may also be transferred into the plant cell by using polyethylene glycol, Krens, et al., *Nature*, 296, 72-74, 1982. Another method of introduction of nucleic acid segments is high velocity ballistic penetration by small particles with the nucleic acid either within the matrix of small beads or particles, or on the surface, Klein, et al., *Nature*, 327, 70-73, 1987 and Knudsen and Muller, 1991, *Planta*, 185:330-336 teaching particle bombardment of barley endosperm to create transgenic barley. Yet another method of introduction would be fusion of protoplasts with other entities, either minicells, cells, lysosomes or other fusible lipid-surfaced bodies, Fraley, et al., *PNAS USA*, 79, 1859-1863, 1982.

The vector may also be introduced into the plant cells by electroporation. (Fromm et al., *PNAS USA* 82:5824, 1985). In this technique, plant protoplasts are electroporated in the presence of plasmids containing the gene construct. Electrical impulses of high field strength reversibly permeabilize biomembranes allowing the introduction of the plasmids. Electroporated plant protoplasts reform the cell wall, divide, and form plant callus.

All plants from which protoplasts can be isolated and cultured to give whole regenerated plants can be transformed by the present invention so that whole plants are recovered which contain the transferred gene. It is known that practically all plants can be regenerated from cultured cells or tissues, including but not limited to all major species of sugarcane, sugar beet, cotton, fruit and other trees, legumes and vegetables. Some suitable plants include, for example, species from the genera *Fragaria*, *Lotus*, *Medicago*, *Onobrychis*, *Trifolium*, *Trigonella*, *Vigna*, *Citrus*, *Linum*, *Geranium*, *Manihot*, *Daucus*, *Arabidopsis*, *Brassica*, *Raphanus*, *Sinapis*, *Atropa*, *Capsicum*, *Datura*, *Hyoscyamus*, *Lycopersion*, *Nicotiana*, *Solanum*, *Petunia*, *Digitalis*, *Majorana*, *Clethrum*, *Helianthus*, *Lactuca*, *Bromus*, *Asparagus*, *Antirrhinum*, *Hererocallis*, *Nemesia*, *Pepergonium*, *Panicum*, *Pennisetum*, *Ranunculus*, *Senecio*, *Salpiglossis*, *Cucumis*, *Browaalia*, *Glycine*, *Lolium*, *Zea*, *Triticum*, *Sorghum*, and *Datura*.

Means for regeneration vary from species to species of plants, but generally a suspension of transformed protoplasts containing copies of the heterologous gene is first provided. Callus tissue is formed and shoots may be induced from callus and subsequently rooted. Alternatively, embryo formation can be induced from the protoplast suspension. These embryos germinate as natural embryos to form plants. The culture media will generally contain various amino acids and hormones, such as auxin and cytokinins. It is also advantageous to add glutamic acid and proline to the medium, especially for such species as corn and alfalfa. Shoots and roots normally develop simultaneously. Efficient regeneration will depend on the medium, on the genotype, and on the history of the culture. If these three variables are controlled, then regeneration is fully reproducible and repeatable.

In some plant cell culture systems, the desired protein of the invention may be excreted or alternatively, the protein may be extracted from the whole plant. Where the desired protein of the invention is secreted into the medium, it may be collected. Alternatively, the embryos and embryoless-half seeds or other plant tissue may be mechanically disrupted to release any secreted protein between cells and tissues. The mixture may be suspended in a buffer solution to retrieve soluble proteins. Conventional protein isolation and purification methods will be then used to purify the recombinant protein. Parameters of time, temperature pH, oxygen, and volumes will be adjusted through routine methods to optimize expression and recovery of heterologous protein.

iv. Bacterial Systems

Bacterial expression techniques are known in the art. A bacterial promoter is any DNA sequence capable of binding bacterial RNA polymerase and initiating the downstream (3') transcription of a coding sequence (e.g. structural gene) into mRNA. A promoter will have a transcription initiation region which is usually placed proximal to the 5' end of the coding sequence. This transcription initiation region usually includes an RNA polymerase binding site and a transcription initiation site. A bacterial

promoter may also have a second domain called an operator, that may overlap an adjacent RNA polymerase binding site at which RNA synthesis begins. The operator permits negative regulated (inducible) transcription, as a gene repressor protein may bind the operator and thereby inhibit transcription of a specific gene. Constitutive expression may occur in the absence of negative regulatory elements, such as the operator. In addition, positive regulation may be achieved by a gene activator protein binding sequence, which, if present is usually proximal (5') to the RNA polymerase binding sequence. An example of a gene activator protein is the catabolite activator protein (CAP), which helps initiate transcription of the lac operon in *E.coli* [Raibaud *et al.* (1984) *Annu. Rev. Genet.* 18:173]. Regulated expression may therefore be either positive or negative, thereby either enhancing or reducing transcription.

Sequences encoding metabolic pathway enzymes provide particularly useful promoter sequences. Examples include promoter sequences derived from sugar metabolizing enzymes, such as galactose, lactose (*lac*) [Chang *et al.* (1977) *Nature* 198:1056], and maltose. Additional examples include promoter sequences derived from biosynthetic enzymes such as tryptophan (*trp*) [Goeddel *et al.* (1980) *Nuc. Acids Res.* 8:4057; Yelverton *et al.* (1981) *Nucl. Acids Res.* 9:731; US patent 4,738,921; EP-A-0036776 and EP-A-0121775]. The g-lactamase (*bla*) promoter system [Weissmann (1981) "The cloning of interferon and other mistakes." In *Interferon 3* (ed. I. Gresser)], bacteriophage lambda PL [Shimatake *et al.* (1981) *Nature* 292:128] and T5 [US patent 4,689,406] promoter systems also provide useful promoter sequences.

In addition, synthetic promoters which do not occur in nature also function as bacterial promoters. For example, transcription activation sequences of a bacterial or bacteriophage promoter may be joined with the operon sequences of another bacterial or bacteriophage promoter, creating a synthetic hybrid promoter [US patent 4,551,433]. For example, the *tac* promoter is a hybrid *trp-lac* promoter comprised of both *trp* promoter and *lac* operon sequences that is regulated by the *lac* repressor [Amann *et al.* (1983) *Gene* 25:167; de Boer *et al.* (1983) *PNAS USA* 80:21]. Furthermore, a bacterial promoter can include naturally occurring promoters of non-bacterial origin that have the ability to bind bacterial RNA polymerase and initiate transcription. A naturally occurring promoter of non-bacterial origin can also be coupled with a compatible RNA polymerase to produce high levels of expression of some genes in prokaryotes. The bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system is an example of a coupled promoter system [Studier *et al.* (1986) *J.Mol.Biol.* 189:113; Tabor *et al.* (1985) *PNAS USA* 82:1074]. In addition, a hybrid promoter can also be comprised of a bacteriophage promoter and an *E.coli* operator region (EP-A-0267851).

In addition to a functioning promoter sequence, an efficient ribosome binding site is also useful for the expression of foreign genes in prokaryotes. In *E.coli* the ribosome binding site is called the Shine-Dalgarno (SD) sequence and includes an initiation codon (ATG) and a sequence 3-9 nucleotides in length located 3-11 nucleotides upstream of the initiation codon [Shine *et al.* (1975) *Nature* 254:34]. The SD sequence is thought to promote binding of mRNA to the ribosome by base-pairing between the SD sequence and the 3' end of 16S rRNA [Steitz *et al.* (1979) "Genetic signals and nucleotide sequences in messenger RNA." In *Biological Regulation and Development: Gene Expression* (ed. R.F. Goldberger)]. To express eukaryotic genes and prokaryotic genes with weak ribosome-binding site [Sambrook *et al.* (1989) "Expression of cloned genes in *Escherichia coli*." In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*].

A DNA molecule may be expressed intracellularly. A promoter sequence may be directly linked with the DNA molecule, in which case the first amino acid at the N-terminus will always be a methionine, which is encoded by the ATG start codon. If desired, methionine at the N-terminus may be cleaved from the protein by *in vitro* incubation with cyanogen bromide or by either *in vivo* or *in vitro* incubation with a bacterial methionine N-terminal peptidase (EPO-A-0 219 237).

Fusion proteins provide an alternative to direct expression. Usually, a DNA sequence encoding the N-terminal portion of an endogenous bacterial protein, or other stable protein, is fused to the 5' end of heterologous coding sequences. Upon expression, this construct will provide a fusion of the two amino acid sequences. For example, the bacteriophage lambda cell gene can be linked at the 5' terminus of a foreign gene and expressed in bacteria. The resulting fusion protein preferably retains a site for a

processing enzyme (factor Xa) to cleave the bacteriophage protein from the foreign gene [Nagai *et al.* (1984) *Nature* 309:810]. Fusion proteins can also be made with sequences from the *lacZ* [Jia *et al.* (1987) *Gene* 60:197], *trpE* [Allen *et al.* (1987) *J. Biotechnol.* 5:93; Makoff *et al.* (1989) *J. Gen. Microbiol.* 135:11], and *Chey* [EP-A-0 324 647] genes. The DNA sequence at the junction of the two amino acid sequences may or may not encode a cleavable site. Another example is a ubiquitin fusion protein. Such a fusion protein is made with the ubiquitin region that preferably retains a site for a processing enzyme (e.g. ubiquitin specific processing-protease) to cleave the ubiquitin from the foreign protein. Through this method, native foreign protein can be isolated [Miller *et al.* (1989) *Bio/Technology* 7:698].

Alternatively, foreign proteins can also be secreted from the cell by creating chimeric DNA molecules that encode a fusion protein comprised of a signal peptide sequence fragment that provides for secretion of the foreign protein in bacteria [US patent 4,336,336]. The signal sequence fragment usually encodes a signal peptide comprised of hydrophobic amino acids which direct the secretion of the protein from the cell. The protein is either secreted into the growth media (gram-positive bacteria) or into the periplasmic space, located between the inner and outer membrane of the cell (gram-negative bacteria). Preferably there are processing sites, which can be cleaved either *in vivo* or *in vitro* encoded between the signal peptide fragment and the foreign gene.

DNA encoding suitable signal sequences can be derived from genes for secreted bacterial proteins, such as *E.coli* outer membrane protein gene (*ompA*) [Masui *et al.* (1983) in: *Experimental Manipulation of Gene Expression*; Ghayeb *et al.* (1984) *EMBO J* 3:2437] and the *E.coli* alkaline phosphatase signal sequence (*phoA*) [Oka *et al.* (1985) *PNAS USA* 82:7212]. As a further example, signal sequence of the alpha-amylase gene from various *Bacillus* strains can be used to secrete heterologous proteins from *B.subtilis* [Palva *et al.* (1982) *PNAS USA* 79:5582; EP-A-0244042].

Usually, transcription termination sequences recognized by bacteria are regulatory regions located 3' to the translation stop codon, and thus together with the promoter flank the coding sequence. These sequences direct the transcription of an mRNA which can be translated into the polypeptide encoded by the DNA. Transcription termination sequences frequently include DNA sequences of about 50 nucleotides capable of forming stem loop structures that aid in terminating transcription. Examples include transcription termination sequences derived from genes with strong promoters, such as the *trp* gene in *E.coli* as well as other biosynthetic genes.

Usually, the above described components, comprising a promoter, signal sequence (if desired), coding sequence of interest, and transcription termination sequences, are put together into expression constructs. Expression constructs are often maintained in a replicon, such as an extrachromosomal element (e.g. plasmid) capable of stable maintenance in a host, such as bacteria. The replicon will have a replication system, thus allowing it to be maintained in a prokaryotic host either for expression or for cloning and amplification. In addition, a replicon may be either a high or low copy number plasmid. A high copy number plasmid will generally have a copy number ranging from ~5 to ~200, and usually ~10 to ~150. A host containing a high copy number plasmid will preferably contain at least ~10, and more preferably at least ~20 plasmids. Either a high or low copy number vector may be selected, depending upon the effect of the vector and the foreign protein on the host.

Alternatively, the expression constructs can be integrated into the bacterial genome with an integrating vector. Integrating vectors usually contain at least one sequence homologous to the bacterial chromosome that allows the vector to integrate. Integrations appear to result from recombinations between homologous DNA in the vector and the bacterial chromosome. For example, integrating vectors constructed with DNA from various *Bacillus* strains integrate into the *Bacillus* chromosome (EP-A-0127328). Integrating vectors may also be comprised of bacteriophage or transposon sequences.

Usually, extrachromosomal and integrating expression constructs may contain selectable markers to allow for the selection of bacterial strains that have been transformed. Selectable markers can be expressed in the bacterial host and may include genes

which render bacteria resistant to drugs such as ampicillin, chloramphenicol, erythromycin, kanamycin (neomycin), and tetracycline [Davies *et al.* (1978) *Annu. Rev. Microbiol.* 32:469]. Selectable markers may also include biosynthetic genes, such as those in the histidine, tryptophan, and leucine biosynthetic pathways.

Alternatively, some of the above described components can be put together in transformation vectors. Transformation vectors are usually comprised of a selectable marker that is either maintained in a replicon or developed into an integrating vector, as described above.

Expression and transformation vectors, either extra-chromosomal replicons or integrating vectors, have been developed for transformation into many bacteria. For example, expression vectors have been developed for, *inter alia*, the following bacteria: *Bacillus subtilis* [Palva *et al.* (1982) *PNAS USA* 79:5582; EP-A-0 036 259 and EP-A-0 063 953; WO 84/04541], *Escherichia coli* [Shimatake *et al.* (1981) *Nature* 292:128; Amann *et al.* (1985) *Gene* 40:183; Studier *et al.* (1986) *J. Mol. Biol.* 189:113; EP-A-0 036 776, EP-A-0 136 829 and EP-A-0 136 907], *Streptococcus cremoris* [Powell *et al.* (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* 54:655]; *Streptococcus lividans* [Powell *et al.* (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* 54:655], *Streptomyces lividans* [US patent 4,745,056].

Methods of introducing exogenous DNA into bacterial hosts are well-known in the art, and usually include either the transformation of bacteria treated with CaCl_2 or other agents, such as divalent cations and DMSO. DNA can also be introduced into bacterial cells by electroporation. Transformation procedures usually vary with the bacterial species to be transformed. See e.g. [Masson *et al.* (1989) *FEMS Microbiol. Lett.* 60:273; Palva *et al.* (1982) *PNAS USA* 79:5582; EP-A-0 036 259 and EP-A-0 063 953; WO 84/04541, *Bacillus*], [Miller *et al.* (1988) *PNAS USA* 85:856; Wang *et al.* (1990) *J. Bacteriol.* 172:949, *Campylobacter*], [Cohen *et al.* (1973) *PNAS USA* 69:2110; Dower *et al.* (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:6127; Kushner (1978) "An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColE1-derived plasmids. In *Genetic Engineering: Proceedings of the International Symposium on Genetic Engineering* (eds. H.W. Boyer and S. Nicolson); Mandel *et al.* (1970) *J. Mol. Biol.* 53:159; Taketo (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 949:318; *Escherichia*], [Chassy *et al.* (1987) *FEMS Microbiol. Lett.* 44:173 *Lactobacillus*], [Fiedler *et al.* (1988) *Anal. Biochem.* 170:38, *Pseudomonas*], [Angustin *et al.* (1990) *FEMS Microbiol. Lett.* 66:203, *Staphylococcus*], [Barany *et al.* (1980) *J. Bacteriol.* 144:698; Harlander (1987) "Transformation of *Streptococcus lactis* by electroporation, in: *Streptococcal Genetics* (ed. J. Ferretti and R. Curtiss III); Perry *et al.* (1981) *Infect. Immun.* 32:1295; Powell *et al.* (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* 54:655; Somkuti *et al.* (1987) *Proc. 4th Eur. Cong. Biotechnology* 1:412, *Streptococcus*].

General guidance on expression in *E. coli* and its optimisation can be found in Baneyx (1999) *Curr. Opin. Biotech.* 10:411-421 and Hannig & Makrides (1998) *TIBTECH* 16:54-60.

v. Yeast Expression

Yeast expression systems are also known to one of ordinary skill in the art. A yeast promoter is any DNA sequence capable of binding yeast RNA polymerase and initiating the downstream (3') transcription of a coding sequence (e.g. structural gene) into mRNA. A promoter will have a transcription initiation region which is usually placed proximal to the 5' end of the coding sequence. This transcription initiation region usually includes an RNA polymerase binding site (the "TATA Box") and a transcription initiation site. A yeast promoter may also have a second domain called an upstream activator sequence (UAS), which, if present, is usually distal to the structural gene. The UAS permits regulated (inducible) expression. Constitutive expression occurs in the absence of a UAS. Regulated expression may be either positive or negative, thereby either enhancing or reducing transcription.

Yeast is a fermenting organism with an active metabolic pathway, therefore sequences encoding enzymes in the metabolic pathway provide particularly useful promoter sequences. Examples include alcohol dehydrogenase (ADH) (EP -A-0284044), glucose-6-phosphate isomerase, glyceraldehyde -3-phosphate-dehydrogenase (GAP or GAPDH), hexokinase, phosphofructokinase, 3-phosphoglycerate mutase, enolase, glucokinase, and pyruvate kinase (PyK) (EPO -A-0329203). The yeast *PHOS* gene, encoding acid phosphatase, also provides useful promoter sequences [Myanohara *et al.* (1983) *PNAS USA* 80:1].

In addition, synthetic promoters which do not occur in nature also function as yeast promoters. For example, UAS sequences of one yeast promoter may be joined with the transcription activation region of another yeast promoter, creating a synthetic hybrid promoter. Examples of such hybrid promoters include the ADH regulatory sequence linked to the GAP transcription activation region (US Patent Nos. 4,876,197 and 4,880,734). Other examples of hybrid promoters include promoters which consist of the regulatory sequences of either the *ADH2*, *GAL4*, *GAL10*, OR *PHOS* genes, combined with the transcriptional activation region of a glycolytic enzyme gene such as GAP or PyK (EP -A-0 164 556). Furthermore, a yeast promoter can include naturally occurring promoters of non -yeast origin that have the ability to bind yeast RNA polymerase and initiate transcription. Examples of such promoters include, *inter alia*, [Cohen *et al.* (1980) *PNAS USA* 77:1078; Henikoff *et al.* (1981) *Nature* 283:835; Hollenberg *et al.* (1981) *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 96:119; Hollenberg *et al.* (1979) "The Expression of Bacterial Antibiotic Resistance Genes in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*," in: *Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance* (eds. K.N. Timmis and A. Puhler); Mercerau -Puigalon *et al.* (1980) *Gene* 11:163; Panthier *et al.* (1980) *Curr. Genet.* 2:109;].

A DNA molecule may be expressed intracellularly in yeast. A promoter sequence may be directly linked with the DNA molecule, in which case the first amino acid at the N -terminus of the recombinant protein will always be a methionine, which is encoded by the ATG start codon. If desired, methionine at the N -terminus may be cleaved from the protein by *in vitro* incubation with cyanogen bromide.

Fusion proteins provide an alternative for yeast expression systems, as well as in mammalian, baculovirus, and bacterial expression systems. Usually, a DNA sequence encoding the N-terminal portion of an endogenous yeast protein, or other stable protein, is fused to the 5' end of heterologous coding sequences. Upon expression, this construct will provide a fusion of the two amino acid sequences. For example, the yeast or human superoxide dismutase (SOD) gene, can be linked at the 5' terminus of a foreign gene and expressed in yeast. The DNA sequence at the junction of the two amino acid sequences may or may not encode a cleavable site. See e.g. EP-A-0 196 056. Another example is a ubiquitin fusion protein. Such a fusion protein is made with the ubiquitin region that preferably retains a site for a processing enzyme (e.g. ubiquitin-specific processing protease) to cleave the ubiquitin from the foreign protein. Through this method, therefore, native foreign protein can be isolated (e.g. WO88/024066).

Alternatively, foreign proteins can also be secreted from the cell into the growth media by creating chimeric DNA molecules that encode a fusion protein comprised of a leader sequence fragment that provide for secretion in yeast of the foreign protein. Preferably, there are processing sites encoded between the leader fragment and the foreign gene that can be cleaved either *in vivo* or *in vitro*. The leader sequence fragment usually encodes a signal peptide comprised of hydrophobic amino acids which direct the secretion of the protein from the cell.

DNA encoding suitable signal sequences can be derived from genes for secreted yeast proteins, such as the invertase gene (EP -A-0 012 873; JPO. 62,096,086) and the A -factor gene (US patent 4,588,684). Alternatively, leaders of non -yeast origin, such as an interferon leader, exist that also provide for secretion in yeast (EP -A-0 060 057).

A preferred class of secretion leaders are those that employ a fragment of the yeast alpha -factor gene, which contains both a "pre" signal sequence, and a "pro" region. The types of alpha -factor fragments that can be employed include the full -length pre-pro alpha factor leader (about 83 aa residues) as well as truncated alpha -factor leaders (usually about 25 to about 50 amino acid residues) (US Patents 4,546,083 and 4,870,008; EP -A-0 324 274). Additional leaders employing an alpha -factor leader fragment that provides for secretion include hybrid alpha -factor leaders made with a presequence of a first yeast, but a pro - region from a second yeast alpha factor. (e.g. see WO 89/02463.)

Usually, transcription termination sequences recognized by yeast are regulatory regions located 3' to the translation stop codon, and thus together with the promoter flank the coding sequence. These sequences direct the transcription of an mRNA which can be translated into the polypeptide encoded by the DNA. Examples of transcription terminator sequences and other yeast-recognized termination sequences, such as those coding for glycolytic enzymes.

Usually, these components, comprising a promoter, leader (if desired), coding sequence of interest, and transcription termination sequence, are put together into expression constructs. Expression constructs are often maintained in a replicon, such as an extrachromosomal element (e.g. plasmid) capable of stable maintenance in a host, such as yeast or bacteria. The replicon may have two replication systems, thus allowing it to be maintained, for example, in yeast for expression and in a prokaryotic host for cloning and amplification. Examples of such yeast -bacteria shuttle vectors include YEp24 [Botstein *et al.* (1979) *Gene* 8:17-24], pCI/1 [Brake *et al.* (1984) *PNAS USA* 81:4642-4646], and YRp17 [Stinchcomb *et al.* (1982) *J. Mol. Biol.* 158:157]. In addition, a replicon may be either a high or low copy number plasmid. A high copy number plasmid will generally have a copy number ranging from ~5 to ~200, and usually ~10 to ~150. A host containing a high copy number plasmid will preferably have at least ~10, and more preferably at least ~20. Either a high or low copy number vector may be selected, depending upon the effect of the vector and the foreign protein on the host. See e.g. Brake *et al.*, *supra*.

Alternatively, the expression constructs can be integrated into the yeast genome with an integrating vector. Integrating vectors usually contain at least one sequence homologous to a yeast chromosome that allows the vector to integrate, and preferably contain two homologous sequences flanking the expression construct. Integrations appear to result from recombinations between homologous DNA in the vector and the yeast chromosome [Orr -Weaver *et al.* (1983) *Methods in Enzymol.* 101:228-245]. An integrating vector may be directed to a specific locus in yeast by selecting the appropriate homologous sequence for inclusion in the vector. See Orr -Weaver *et al.*, *supra*. One or more expression construct may integrate, possibly affecting levels of recombinant protein produced [Rine *et al.* (1983) *PNAS USA* 80:6750]. The chromosomal sequences included in the vector can occur either as a single segment in the vector, which results in the integration of the entire vector, or two segments homologous to adjacent segments in the chromosome and flanking the expression construct in the vector, which can result in the stable integration of only the expression construct.

Usually, extrachromosomal and integrating expression constructs may contain selectable markers to allow for the selection of yeast strains that have been transformed. Selectable markers may include biosynthetic genes that can be expressed in the yeast host, such as *ADE2*, *HIS4*, *LEU2*, *TRP1*, and *ALG7*, and the G418 resistance gene, which confer resistance in yeast cells to tunicamycin and G418, respectively. In addition, a suitable selectable marker may also provide yeast with the ability to grow in the presence of toxic compounds, such as metal. For example, the presence of *CUP1* allows yeast to grow in the presence of copper ions [Butt *et al.* (1987) *Microbiol. Rev.* 51:351].

Alternatively, some of the above described components can be put together into transformation vectors. Such vectors usually comprise a selectable marker that is either maintained in a replicon or developed into an integrating vector as described above.

Expression and transformation vectors, either extrachromosomal replicons or integrating vectors, have been developed for transformation into many yeasts. For example, expression vectors have been developed for, *inter alia*, the following

yeasts: *Candida albicans* [Kurtz, et al. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6:142], *Candida maltosa* [Kunze, et al. (1985) *J. Basic Microbiol.* 25:141], *Hansenula polymorpha* [Gleeson, et al. (1986) *J. Gen. Microbiol.* 132:3459; Roggenkamp et al. (1986) *Mol. Gen. Genet.* 202:302], *Kluyveromyces fragilis* [Das, et al. (1984) *J. Bacteriol.* 158:1165], *Kluyveromyces lactis* [De Louvencourt et al. (1983) *J. Bacteriol.* 154:737; Van den Berg et al. (1990) *Bio/Technology* 8:135], *Pichia guilliermondii* [Kunze et al. (1985) *J. Basic Microbiol.* 25:141], *Pichia pastoris* [Cregg, et al. (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5:3376; US Patent Nos. 4,837,148 and 4,929,555], *Saccharomyces cerevisiae* [Hinnen et al. (1978) *PNAS USA* 75:1929; Ito et al. (1983) *J. Bacteriol.* 153:163], *Schizosaccharomyces pombe* [Beach and Nurse (1981) *Nature* 300:706], and *Yarrowia lipolytica* [Davidow, et al. (1985) *Curr. Genet.* 10:380471 Gaillardin, et al. (1985) *Curr. Genet.* 10:49].

Methods of introducing exogenous DNA into yeast hosts are well known in the art, and usually include either the transformation of spheroplasts or of intact yeast cells treated with alkali cations. Transformation procedures usually vary with the yeast species to be transformed. See e.g. [Kurtz et al. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6:142; Kunze et al. (1985) *J. Basic Microbiol.* 25:141; *Candida*]; [Gleeson et al. (1986) *J. Gen. Microbiol.* 132:3459; Roggenkamp et al. (1986) *Mol. Gen. Genet.* 202:302; *Hansenula*]; [Das et al. (1984) *J. Bacteriol.* 158:1165; De Louvencourt et al. (1983) *J. Bacteriol.* 154:1165; Van den Berg et al. (1990) *Bio/Technology* 8:135; *Kluyveromyces*]; [Cregg et al. (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5:3376; Kunze et al. (1985) *J. Basic Microbiol.* 25:141; US Patent Nos. 4,837,148 and 4,929,555; *Pichia*]; [Hinnen et al. (1978) *PNAS USA* 75:1929; Ito et al. (1983) *J. Bacteriol.* 153:163 *Saccharomyces*]; [Beach and Nurse (1981) *Nature* 300:706; *Schizosaccharomyces*]; [Davidow et al. (1985) *Curr. Genet.* 10:39; Gaillardin et al. (1985) *Curr. Genet.* 10:49; *Yarrowia*].

BRIEF DESCRIPTION OF DRAWINGS

Figure 1 shows structural and functional relationships of *Pichia anomala* killer toxin (PaKT), PaKT-neutralizing monoclonal antibody (mAb KT4), killer toxin receptor (KTR), and PaKT-like killer antibodies and derivative killer mimotopes (KM).

Figure 2 shows *in vitro* microbicidal activity by CFU assay of mAb K10 and mAb K20 in comparison with an irrelevant isotype-matched mAb (all at 100 µg/ml dose) against *Candida albicans* UP10S.

Figure 3 shows *in vitro* microbicidal activity of scFv antibodies H6 and H20 (100 µg/ml dose).

Figure 4 shows *in vitro* microbicidal activity of peptides KM2 and KM3 compared to KM0 and IP controls (1mg/ml dose).

Figure 5 shows *in vitro* microbicidal activity of KM4 (0.5mg/ml dose).

Figure 6 shows *in vitro* microbicidal activity of KM5 (1mg/ml dose).

Figure 7 shows *in vitro* microbicidal activity of KM1 (1mg/ml dose).

Figure 8 shows clearance of vaginal candidiasis in rats intravaginally administered with KM.

Figure 9 shows a Kaplan-Meier survival curve of SCID mice challenged with 5 LD50 of *C. albicans* and treated with KM.

Figure 10 shows microbicidal activity of KM (25 & 10 µg/ml doses) against *C. neoformans* UP25.

Figure 11 shows microbicidal activity of KM (500 µg/ml & 100 µg/ml doses) against *S. aureus* a38.

Figure 12 shows *in vitro* microbicidal activity of KM0, KM6, KM and KM7 at 20 µg/ml dose.

Figure 13 is an illustration of features within the H6 scFv (SEQ ID 2).

Figure 14 shows the effect of KM peptide (14A & 14B) on *A.castellani* growth, compared to the effect of SP peptide (14C & 14D). Growth was at either 37°C (14A & 14C) or 25°C (14B & 14D). The graphs show the number of trophozoites per well.

Figure 15 shows the effect of KM peptide on *A.castellani* cell viability. SP peptide is set as 100%.

5 Figure 16 shows the effect of the K20 mAb on *A.castellani* growth, and Figure 17 shows the effect of K10 mAb. Values are the number of trophozoites per well. Amoebal growth in medium alone is shown as crosses. Antibodies were used at 12.5µg/ml (?), 25µg/ml (?) or 50µg/ml (?).

Figure 18 shows the effect of KM (circles) and SP (crosses) peptides on influenza virus replication at up to 80µg/ml concentration. Values are log₂ HA titres.

10 Figure 19 shows the effect of KM (circles) and SP (squares) peptides on HIV-1 replication. Peptides were used at either 1µg/ml (closed) or 10µg/ml (open). Values are copies/ml over 15 days of culture.

BRIEF DESCRIPTION OF THE SEQUENCE LISTING

SEQ ID	Description
1	Nucleotide sequence of H6 scFv
2	Amino acid sequence of H6 scFv
3	KM0 (fragment of SEQ ID 2)
4	KM (= SEQ ID 3 with Glu? Ala mutation at position 1)
5-12	Alanine-scanning variants of SEQ ID 3
13	SP0 scramble peptide
14-20	Shortened derivatives of KM (9mer, 8mer, 7mer, 6mer, 5mer, 4mer, 3mer from SEQ ID 3)
21	Nucleotide sequence of H20 scFv
22	Amino acid sequence of H20 scFv
23	KM1 (=SEQ ID 3 with Cys? Ser mutation at position 7)
24	KM2
25	KM3
26	KM4
27	KM5
28	Irrelevant peptide IP
29	SP
30	Linker (used to join KM0 and KM2 to give KM3)
31	Peptide control
32	KM1 derivative (=SEQ ID 4 with Cys? Xaa mutation at position 7)
33	SEQ ID 32 with Cys? Ser mutation at position 7
34-38	KM0, KM1, KM2, KM4 & KM5 equivalents from H20
39	KM equivalent from H20
40-47	Alanine-scanning variants of SEQ ID 24
48	KM2 (SEQ ID 24) with Cys? Ser mutation at position 7
49-57	Alanine-scanning variants of SEQ ID 27
58	KM4 (SEQ ID 26) with Cys? Ser mutation at position 7
59	C-terminus 'E-tag' from scFv system
60-65	CDRs from H6 antibody (fragments of SEQ ID 2)
66-71	CDRs from H20 antibody (fragments of SEQ ID 22)

NB: the inclusion of a polypeptide sequence in the sequence listing does not imply any particular D- or L- configuration to its constituent amino acids.

MODES FOR CARRYING OUT THE INVENTION

H6 single-chain Fv antibody

H6 is a single-chain Fv raised against the idiotope of the KT4 monoclonal antibody. It is an anti-idiotypic antibody raised with the purpose of mimicking the activity of the *Pichia anomala* killer toxin (PaKT).

The existence of scFv H6 has previously been reported [e.g. ref. 13], but a method for its manufacture has not previously been disclosed, nor has its amino acid sequence. The sequence of H6 is now disclosed (SEQ IDs 1 and 2). Within SEQ ID 2, amino acids 107-132 (GT . . . IE) are a linker and the final 13 amino acids (GA . . . PR; SEQ ID 59) are the 'E-tag' inserted by the *Recombinant Phage Antibody System* (Pharmacia Biotech™) used to create the scFv.

The CDRs within H6 are as follows:

CDR	aa	SEQ ID	CDR	aa	SEQ ID
H1	33-37	60	L1	153-162	63
H2	52-65	61	L2	178-184	64
H3	98-101	62	L3	217-224	65

The H6 scFv has strong microbicidal effects *in vitro* against important pathogenic microorganisms including: *C.albicans*; *C.krusei* and *C.glabrata* (including fluconazole-resistant strains); *Cryptococcus neoformans*; *A.fumigatus*; *M.tuberculosis*; *S.aureus*, *Enterococcus faecalis*, *E.faecium*, and *Streptococcus pneumoniae* (including methicillin-, vancomycin- and penicillin-resistant strains); *S.mutans*, *Leishmania major*, *L.infantum* and *Achantamoeba castellani*. Furthermore, it shows specific therapeutic activity in an *in vivo* model of rat vaginal candidiasis by intravaginal administration.

K20 monoclonal antibody and scFv derivative H20

K10 is an anti-idiotypic rat monoclonal antibody raised against KT4. Like the H6 scFv, it shows good *in vitro* microbicidal activity. In addition, it has been shown to be therapeutic against *P.carinii* pneumonia in rats infected by aerosol administration [16], and in mice transplanted with Tcell depleted bone marrow against aspergillosis caused by nasal instillation [14].

Anti-idiotypic antibodies were raised in mice against K10 (i.e. anti-anti-anti-idiotypic with respect to PaKT). One of the resulting hybridoma-produced antibodies was designated 'K20'.

K20 was tested in a conventional *in vitro* colony forming unit (CFU) assay to evaluate killer activity. Approximately 250 viable PaKT-susceptible germinating *C.albicans* UP10 cells, suspended in 10 µl PBS, were added to 90 µl K20 to obtain a final concentration of 100 µg/ml and incubated for 6h at 37°C. After incubation with the respective reagents, the fungal cells were dispensed and streaked on the surface of Sabouraud dextrose agar plates, which were therefore incubated at 30°C and their colony forming units (CFU) enumerated after 48 hours. Each experiment was performed in triplicate. An irrelevant mAb was used as a control.

As shown in Figure 2, K20 shows slightly better anti-candida activity than K10.

K20 was converted into a scFv antibody using the *Recombinant Phage Antibody System* (Pharmacia Biotech™). The scFv was designated 'H20' and its sequence is given as SEQ IDs 21 and 22. The H20 CDRs are as follows:

CDR	aa	SEQ ID	CDR	aa	SEQ ID
H1	33-37	66	L1	167-176	69
H2	52-66	67	L2	192-198	70
H3	99-115	68	L3	231-238	71

- 5 H20 was tested in the CFU assay (Figure 3) and shows a candidacidal activity comparable to H6.

Active fragments of H6

Short peptide fragments of H6 were synthesised, with emphasis on the CDR sequences.

- 10 Solid phase synthesis was carried out with a MultiSynTech Syro automatic peptide synthesizer (Witten, Germany) employing Fmoc chemistry with HOBt activation and Rink amide MBHA resin as solid support. Peptides were cleaved from the resins and deprotected by treatment with trifluoroacetic acid containing ethanedithiol, water, triisobutylsilane and anisole (93/2.5/2/1.5/1). After precipitation by ethyl ether, peptides were purified by a Vydac C18 column (25 cm × 1cm) and characterized by amino acid analysis and mass spectrometry.

The following peptides were synthesised:

#	Name	SEQ ID	H6 residues	Based on CDR
1	KM0	3	146-155	L1
2	KM2	24	91-100	H3
3	KM4	26	146-160	L1
4	KM5	27	155-163	L1

- 15 These peptides were tested in the CFU assay to evaluate killer activity.

- As a control, a 'scramble' peptide (SEQ ID 13; 'SP0') was synthesised in which the amino acids of KM0 were re-ordered to have the same overall peptide composition but different sequence. This was used in the above assay at the same concentration as the test KM peptides as a control for KM0 and KM4. For KM2, the control was SEQ ID 28 ('IP' or 'irrelevant peptide'). For KM5, the control was
20 SEQ ID 31.

Results with KM0 were as follows, expressed as % growth in comparison to the control:

Peptide	100 µg/ml	25 µg/ml	6.25 µg/ml
SP0 Control	100	100	100
KM0	5.69 ± 0.20	29.84 ± 10.63	67.13 ± 13.81

Results with KM0, KM2, KM4 and KM5 at various concentrations are shown in Figures 4 to 6.

KM0 & KM5 are thus extremely effective anti-candidal peptides. KM2 is also effective, and KM4 is moderately effective.

The CDRs of H6 were also prepared in isolated form (SEQ IDs 60-65) and tested for microbicidal activity in the *C.albicans* CFU assay. Each CDR peptide was tested at scalar dilutions to establish the IC₅₀. Assays were performed in triplicate and the IC₅₀ of each peptide was calculated by nonlinear regression analysis of curves obtained by plotting the number of CFU versus Log peptide concentration. Results were as follows:

Peptide	IC ₅₀ (mol/l)	SEQ ID
Heavy chain		
CDR-1	2.67×10^{-7}	60
CDR-2	1.17×10^{-7}	61
CDR-3	1.09×10^{-7}	62
Light chain		
CDR-1	6.92×10^{-7}	63
CDR-2	2.34×10^{-7}	64
CDR-3	2.00×10^{-7}	65

The CDRs of H6 antibody therefore show significant anti-candida activity, with CDR-3 from the heavy chain (SEQ ID 62) showing the best activity.

Fragments of the H6 scFv are therefore able to act as microbicides even though they would not be expected to hold in the same tertiary conformation as in the intact antibody.

Polypeptides comprising more than one fragment of H6

KM0 is derived from a H6 light chain CDR and KM2 is derived from a H6 heavy chain CDR. The two decapeptides , each of which has microbicidal activity on its own, were linked by a glycine-rich sequence (SEQ ID 30) to give KM3 (SEQ ID 25).

In comparison to IP in the CFU assay, KM3 showed candidacidal activity, but this was weaker than either KM0 and KM2 alone (Figure 4).

Substitution within KM0 – cysteine replacement

The cysteine residue in decapeptide KM0 was substituted with serine to give KM1 (SEQ ID 23), with a view to reducing oxidation and polymerization processes. KM1 showed similar activity to KM0 in the CFU assay (Figure 7) in comparison to the IP control. The substitution of cysteine with serine thus gave no apparent alteration of the antibiotic effect of KM0, but offers increased resistance to oxidation and thus increased *in vivo* half life.

SEQ ID 48 is a C7 S substitution form of KM2. SEQ ID 58 is a C7 S substitution form of KM4.

Substitution within KM0 – alanine scanning

Decapeptide KM0 was analysed by alanine scanning [32] in order to identify the functional contribution of individual residues to its microbicidal activity. Each of the ten constituent amino acids was replaced with A (except for residue 9, which is already A) and activity in the *in vitro* CFU assay was assessed. Results were as follows, with values being % growth in comparison to the SP0 control:

SEQ ID	100 µg/ml	25 µg/ml	6.25 µg/ml
3	5.69 ± 0.20	29.84 ± 10.63	67.13 ± 13.81
4	0	0	0
5	9.91 ± 3.28	42.67 ± 2.04	53.40 ± 6.99
6	9.27 ± 2.45	19.72 ± 2.91	60.06 ± 5.24
7	9.18 ± 4.13	26.56 ± 4.24	63.24 ± 4.77
8	0.10 ± 0.10	10.12 ± 2.96	40.42 ± 16.01
9	52.89 ± 3.90	55.52 ± 3.7	58.14 ± 8.15
10	55.71 ± 10.20	59.73 ± 4.77	64.25 ± 6.72
11	2.60 ± 0.50	23.12 ± 3.59	72.95 ± 7.42
12	11.90 ± 0.64	32.90 ± 0.79	70.33 ± 9.14
13	100	100	100

The most active polypeptide is SEQ ID 4 ('KM'), in which the first amino acid E is substituted by A. SEQ ID 8, in which C was substituted by A, also shows good activity relative to both the SP0 control and to the starting KM0 decapeptide. The CFU reduction for these two decapeptides compared to the control was statistically significant at all three doses ($p < 0.005$ by two-tailed Student's *t* test).

On the basis of KM0 and KM sequences, scramble peptides (SP0, SEQ ID 13; SP, SEQ ID 29) were also synthesised. Neither of these two scramble peptides showed *in vitro* candidacidal activity.

Alanine-scanning of KM2 is shown in SEQ IDs 40 to 47.

Alanine-scanning of KM5 is shown in SEQ IDs 49 to 57.

C-terminal truncation of KM

SEQ ID 4 ('KM') was reduced by C-terminal deletions down to three residues to establish the ability to retain *in vitro* candidacidal activity relative to the SP control. Scalar dilutions (100-0.8 µg/ml) were tested to establish the minimal fungicidal concentration corresponding to the killing of 100% of *C. albicans* cells. KM and its truncation derivatives were also tested at scalar dilutions to establish the peptide concentration (mol/l) corresponding to the 50% inhibitory concentration (IC50). Assays were performed in triplicate and the IC50 of each peptide was calculated by nonlinear regression analysis of curves obtained by plotting the number of CFU versus Log peptide concentration using the GraphPad Prism 3.02 software. Results were as follows:

SEQ ID	IC50 (mol/l)
4	5.6×10^{-5}
14	5×10^{-5}
15	2.3×10^{-5}
16	6×10^{-7}
17	7.3×10^{-4}
18	2.5×10^{-5}
19	7.1×10^{-4}
20	1×10^{-5}

There is a drop of candidacidal activity of about three orders of magnitude with deletion of the C-terminus serine from KM . However, the heptamer formed by deletion of the 3 C-terminal residues shows activity only one order of magnitude lower than that of KM.

KM oligomers

- 5 Experiments on the stability of the killer peptide KM after lyophilisation were carried out using the CFU assay. KM proved to be very stable in the lyophilised form.

After solubilisation in non-reducing conditions, the free cysteine in KM can lead to the formation of a disulfide bridge, to give a KM dimer. The candidacidal activity of the dimer was assessed by comparison to dimerised SP peptide. The disulfide-bonded KM dimer retains candidacidal activity.

- 10 Moreover, this activity was maintained unaltered over a long period under different storage conditions (4°C, room temperature, 37°C).

In vivo activity of KM in vaginal infection model

KM was tested using a well-established experimental model [71] of vaginal *C. albicans* infection in oophorectomized estrogen-treated rats. Estrogen-conditioned rats (5 animals per group) were inoculated intravaginally with 10^7 cells of fluconazole-sensitive (SA-40) or fluconazole-resistant (AIDS 68) *C.albicans*. Both *Candida* strains were originally isolated from human vaginal infection, and maintained in stock collections in the Department of Bacteriology and Medical Mycology of the Istituto Superiore di Sanità (ISS), Rome (Italy). Different doses (10, 25, 50 and 100 µg) of KM were administered intravaginally at 1, 24 and 48 hours post challenge and vaginal *C.albicans* burden was quantitated by CFU enumeration from the vaginal fluid taken each day by a special calibrated loop. Vaginal smears were also stained by PAS-van Gieson method. Any benefit of KM treatment was assessed in terms of microscopic reduction of the hyphal growth in the vagina. Negative controls were untreated rats and rats treated with SP. As a positive control, rats received 50 or 100 µg/ml fluconazole (Pfizer) in PBS (0.1 ml) at 1, 24 and 48 hours after the yeast challenge.

- 25 A dose-response therapeutic effect was observed at 50 and 100 µg doses.

In subsequent experiments, 50 µg of KM was used in the established three dose administration schedule to determine acceleration of fungal CFU clearance over a period of 28 days. Rats (five per groups) were given 10^7 cells in 0.1 ml of physiological solution on day 0 and were sampled for initial intravaginal CFU. Treatments were administered 1, 24 and 48 hours after the challenge.

Figure 8 shows the results of a typical experiment with strain SA-40. At each time point there was a statistically-significant difference ($p<0.05$ by two-tailed Student's t test) in vaginal CFU counts between (a) untreated or SP-treated rats, and (b) KM-treated or fluconazole-treated rats. There was no significant difference between untreated and SP-treated rats, and there was no significant difference between KM-treated and fluconazole-treated rats.

KM significantly accelerates the early rate of clearance (1-5 days) of the fungus from rat vagina, also providing a substantial resolution of the infection (less than 10^3 CFU/ml of vaginal fluid) within three weeks from challenge, when the untreated controls still had from 2 to 4×10^4 *Candida* CFU/ml of vaginal fluid. No acceleration of the fungal clearance and no effect on resolution of infection was provided by SP administration. The therapeutic benefit of KM was substantially comparable with that of fluconazole.

Results for both test strains over 28 days were as follows:

Experimental group	<i>C. albicans</i> vaginal CFU ($\times 10^3$) ($\pm$ SD) on days:			
	0	7	14	28
1. <i>C.albicans</i> SA-40, no treatment	>100	98 $\pm$ 12	42 $\pm$ 7	38 $\pm$ 6
2. <i>C.albicans</i> SA-40 + 50 μ g fluconazole	>100	13 $\pm$ 4	2 $\pm$ 1	<1
3. <i>C.albicans</i> SA-40 + KM	>100	12 $\pm$ 7	1 $\pm$ 1	<1
4. <i>C.albicans</i> AIDS 68, no treatment	>100	70 $\pm$ 10	55 $\pm$ 8	18 $\pm$ 3
5. <i>C.albicans</i> AIDS 68 + 100 μ g fluconazole	>100	64 $\pm$ 6	48 $\pm$ 3	12 $\pm$ 4
6. <i>C.albicans</i> AIDS 68 + KM	>100	40 $\pm$ 5	18 $\pm$ 2	<1

On day 7, 14 and 28, differences in CFU vaginal counts were statistically significant ($p<0.05$, two-tailed Student's t test) between:

- group 1 and group 2
- group 1 and group 3
- group 4 and group 6
- group 1 and group 5
- group 1 and group 6
- group 5 and group 6

There was no statistically significant difference between:

- group 2 and group 3
- group 4 and group 5

In contrast to treatment with 100 μ g fluconazole, KM had a therapeutic effect also in rat vaginal infection caused by the fluconazole-resistant *C.albicans* strain.

In vivo anti-Candida activity of KM in systemic infection model

KM was tested using a well-established rapidly-lethal systemic mouse model [72] of *C. albicans* infection. Groups of 8 Balb/C female mice (weight 18-21 g) were challenged with 5 LD₅₀ (10^7 cells of SA-40) by the intravenous route. 50 μ g KM were administered intraperitoneally for three days starting on day 0 (i.e. 1 hour after the fungal challenge) and at 24 and 48 hours thereafter. Controls

were untreated animals or animals treated with peptide SP (same dosage and treatment schedule as those treated with KM). The animals were then followed for mortality and internal organ invasion for 60 days. Any beneficial effect was established in term of prolongation of the median survival time (in days) and reduction of total mortality. Assessment by necroscopy showed that the death of the animals was due to the fungus, and assessment of internal organs showed invasion by *C.albicans*.

In parallel experiments, SCID mice were used instead of immunocompetent mice in order to verify whether the curative effect of KM required the participation of host adaptive immunity. These experiments used the same challenging fungal burden, schedule of KM and SP treatments, and *C. albicans*-caused mortality end-points as described above.

In all experiments, KM exerted a similar beneficial therapeutic effect in terms of mortality delay and animal cure (60 days). As a typical example, Figure 9 shows the Kaplan-Meyer survival curve of SCID mice challenged with 5x LD50 of *C.albicans* and treated with 50 µg of either KM, fluconazole or SP, or left untreated. KM was seen to increase the median survival time from 1 day of the untreated control to >60 days. In addition, only 1/8 KM-treated animals died as compared to 8/8 deaths in untreated mice or those treated with SP. In all cases, death was attributable to *C.albicans* challenge as shown by fungus burden in the kidneys. Figure 9 shows that KM out-performed fluconazole.

Blocking of KM activity by glucans

As shown above, KM shows anti-candida activity. As KM is distantly-related to the KT antibody, which interacts with cell surface β-glucans, the possible involvement of glucans in KM's activity was investigated.

The binding of the KT mAb to germinating cells of *C.albicans* was assessed by immunofluorescence [12]. KM completely inhibited the binding of KT to the cells, whereas SP did not.

In further experiments, the CFU assay was performed as before, using 25µg/ml KM or SP, except that various concentrations (between 12.5µg/ml and 100µg/ml) of either laminarin (β-1,3-glucan, from Sigma) or pustulan (β-1,6-glucan, from Calbiochem) were included. Results were as follows:

Glucan	Conc ^a (µg/ml)	CFU with KM	CFU with SP
None	—	0	2822.00 ± 122.00
Laminarin	12.5	0	2525.33 ± 92.72
Laminarin	25	1.33 ± 0.58	2780.00 ± 264.21
Laminarin	50	115.33 ± 12.58	2742.66 ± 105.09
Laminarin	100	2766.66 ± 63.54	2740.00 ± 282.13
Pustulan	12.5	0	2380.00 ± 148.04
Pustulan	25	0	2500.00 ± 52.00
Pustulan	50	0	2666.00 ± 306.49
Pustulan	100	0	2824.00 ± 119.82

Thus the candidacidal activity of KM was strongly and dose-dependently inhibited by laminarin, but not by pustulan.

These data suggest that the candidacidal KM decapeptide competes for the binding site of KT-IdAb on fungal cell wall, and the receptor seems to contain β -1-3 glucans.

5 *Anti-A.castellani activity*

In addition to their anti-candida activity, the KM peptide and the K20 monoclonal antibody were tested for activity against trophozoites (the infectious form) of the eukaryotic free-living soil amoeba *Acanthamoeba castellanii* — a cause of encephalomyelitis and keratitis which can cause severe ocular inflammation and visual loss.

10 *A.castellani* was grown in PYG medium at 37°C or 25°C, in the presence of either SP or KM peptides at 1µg/ml, 10µg/ml or 100µg/ml (or, as a control, with no peptide). The effect on growth over six days, in terms of the number of trophozoites, is shown in Figure 14. As seen in Figures 14C & 14D, the scramble peptide SP has no antimicrobial activity at either 37°C or 25°C, whereas KM (Figures 14A & 14b) shows good antimicrobial activity.

15 Figure 15 shows the *in vitro* activity of KM at 190µg/ml on cell viability of *A.castellanii* evaluated at 25°C in comparison with SP. Figure 15A shows a reduction in cell viability ($p<0.05$) after six hours of co-incubation. Figure 15B shows a similar reduction ($p<0.05$) after six hours co-incubation followed by 18 hours incubation in fresh PYG medium.

20 The inhibitory effect of monoclonal antiidiotypic antibody K20, tested over 6 days at 37°C in the same way as described for KM, is shown in Figure 16. The effect can be compared to that of the rat monoclonal K10 (Figure 17). After 6 days of incubation, the number of trophozoites per well using K20 was lower than when using K10 at 25µg (2700 vs. 3100) and 50µg (2800 vs. 3080).

Range of KM activity

25 KM shows potent anti-*C.albicans* and anti-*A.castellani* activity. KM was also found to be effective against other microorganisms which are very important from an epidemiological point of view, such as multidrug resistant strains of *Candida* spp. and *Mycobacterium tuberculosis*, *Cryptococcus neoformans* (Figure 10) and *Aspergillus fumigatus*, but also against methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* (Figure 11), and penicillin-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae*.

Surprisingly, KM was also found to have anti-viral activity against influenza A virus and HIV-1.

30 *Influenza A virus*

The effect of KM on influenza virus replication was compared to the scramble peptide SP control. As a further control, replication in maintenance medium alone was tested.

35 Two different strains of type A influenza virus (Ulster/73/H7N1, avian; NWS/33/H1N1, human neurovirulent) have been previously demonstrated to efficiently replicate in LLC-MK2 (Rhesus monkey kidney), MDCK (Madin Darby Canine Kidney) and AGMK-37RC (African Green Monkey Kidney) cell cultures. Confluent monolayers of the different cell lines were infected with the virus

(moi = 20 pfu, higher than a normal *in vivo* infection) in pre-warmed PBS (pH 7.4). After a 40 minute adsorption period, maintenance medium (MM) containing either KM or SP was added to the cell cultures and virus titre was determined after 24, 36, 48 or 72 hours of infection by haemagglutinin (HA) titration in triplicate samples on cell supernatant, after centrifugation at 2,000 x g to remove cellular debris.

The effect of KM and SP on HA titres 24 hours after infection of LLC-MK2 cells by Ulster/73 is shown in Figure 18. At 50 µg/ml or below, KM and SP had little or no effect on viral growth. Above 60 µg/ml, however, KM peptide interferes with viral growth, with complete blocking at 80 µg/ml. Similar effects were seen for the other virus, with the other cell lines, and at the other time points.

Thus KM can suppress viral replication in a dose-dependent manner.

In a different set of experiments, fresh MM containing either KM or SP was added to the cells at time 0 and then substituted with the same peptide/medium mixture every 12 hours starting at 24 hours and ending at 72 hours. KM at 80 µg/ml was able to completely block viral production at all time points tested. Using SP, viral titres were similar to those obtained by growth in MM only.

The effect of KM on influenza virus replication was also tested using haemadsorption assays. HA is synthesised during replication and inserted into the cell membrane before viral budding. Haemadsorption of red blood cells to infected cells correlates with the integrity of the glycosylated HA as well as with its correct insertion into the cell membrane.

Cell cultures were infected, treated with 80 µg/ml of either KM or SP, as described above, and haemadsorption assays were carried out after 48 hours. A significant reduction of OD_{420nm} was observed in infected cells treated with KM, demonstrating a significant reduction of viral HA molecules on the plasma membrane of those cells. Neither KM nor SP interferes with virus-specific receptors on red blood cells (RBC).

Finally, the effect of laminarin (β-1,3-glucan) on anti-influenza activity was determined. As shown above, Laminarin interferes with KM's candidacidal activity. KM or SP (80 µg/ml) was mixed with laminarin (320 µg/ml) and the mixture was added to infected cells at time 0, without preincubation or after 10 minutes of preincubation. Similar HA titres were obtained after 24 hours using KM/laminarin and SP/laminarin, suggesting that laminarin abolishes the antiviral activity of KM. This effect was not seen with pustulan.

HIV-1

The effect of KM on HIV-1 replication was compared to the scramble peptide SP control. HIV-1 can replicate in peripheral blood mononuclear cell (PBMC) cultures in the presence of exogenous IL-2 [73]. To test KM activity, PBMC cultures were obtained from patients in acute infection phase in whom HIV-1 proviral load was known.

PBMCs were cultured in 48-well plates at the concentration of 10⁶ cells/ml in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS in the presence of 50 U/ml of rIL-2. Half of the culture medium was added at day 8. Supernatants and cells were harvested for analysis of HIV RNA and proviral contents, respectively. Exogenous rIL-2 was added every 3 to 4 days, KM- or SP-peptide was added

44

every 7 days. HIV-1 expression was determined using HIV RNA branched kit (b-DNA, Bayer™), whereas HIV-1 proviral load was determined using gene-detective HIV-1 gag EOA kit (ZeptoMetrix™). For phenotype determination, cells were analysed by flow cytometry after staining with mAbs directed to CD antigens.

5 After PBMC isolation, the majority of PBMC of HIV cultures were T-lymphocytes, as shown by the expression of CD3 Ag (CD4+ = 41%; CD8+ = 36%). All primary PBMC cultures remained viable apparently for at least 20 days. In the presence of exogenous IL-2, all CD3+ T-cells expressed CD25 and HLA-DR cell surface activation markers after 7 days of culture.

Primary cultures were established from the patient's cryo-preserved PBMC in the presence of 1x and 10x concentration of KM peptide (1µg and 10µg, respectively). As controls, SP peptide was used at the same concentrations. Other control cultures (untreated cells) received medium only.

The kinetics of HIV RNA production at different time points of PBMC cultures are shown in Figure 19. The cultures showed early peaks of viral copies within 5 to 10 days of culture which then decreased in correspondence to the HIV-1-induced loss of CD4+ cells. HIV replication in these PBMC cultures was considerably lower in the presence of KM (< 44%, mean), with both concentrations of KM having similar effects on the levels and kinetics of HIV RNA production.

SP-treated cells showed the same levels and kinetics of HIV RNA production as untreated controls.

D-amino acid derivatives of KM and KM0

KM0 and KM were synthesised using the same amino acids residues, but in the D- rather than L- conformation (KM6 and KM7). Scramble peptide controls SP0 and SP were also synthesised using D-amino acids.

KM6 and KM7 each showed candidacidal activity in the CFU assay (Figure 12). Activity was slightly lower than the L-amino acid polypeptides, but this *in vitro* reduction does not take into account the *in vivo* increase in half life which would be expected.

25 A D-amino acid polypeptide with both the Glu? Ala and Cys? Ser substitutions (SEQ ID 33) is useful.

Toxicity

Toxicity of KM was assessed by *in vitro* incubation with LLC-MK2 rhesus monkey kidney cells. The cells were maintained in Eagle's Minimum essential Medium (MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. The cells were plated in triplicate in 6-well dishes at 4×10⁴ cells per well and cultured for 24 hours. Serial dilutions of peptides (final concentrations between 0 and 500 µg/ml) in medium containing 10% fetal bovine serum were then added to cells and incubated for 24 hours at 37°C. Cells were subsequently treated with MTT (50 µg per well) and incubated for another 2 hours. After solubilisation of the formazan dye in DMSO, the absorbance of each well was measured at 550 and 620 nm. Peptide SP was also tested.

45

Cell viability was expressed as T/C % where T represents the mean absorbance of the treated cells and C the mean absorbance of the controls (Figure 20).

The peptide displayed no toxic effects, even at 500 µg/ml.

Equivalent peptides from within H20

5 An alignment of H6 and H20 sequences is given below, with CDRs in bold:

```

      10      20      30      40      50      60      70
H6    MAQVKLQESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLTGTGVNVRQPPGKQLEWLGMWGD- GSTDTBALKSRL
10    H20  MAQVQLQQSGAKLVRSASVKLSCTTSGFNIXDYIMENVRQRPQGLEWIGWIDPFWGDTFTAFKPGQKT
      80      90      100     110     120     130     140
H6    SISKDMSKQVFLKMSLQITDDTARYYC-----LYANDYNGQGTFTVTCSSGGGGSGGGGGSGG
15    H20  TLTADTSSTAYLQLSSLTSEDYAVYYCKMNVYDGYSGDFFYYANDYNGQGTFTVTCSSGGGGSGGGGGSGG
      150     160     170     180     190     200     210
20    H6    GGSDIELTQSPALMSASPGKKVINTCSASSSVSYMYNYQQKPRSSPKFNIYLTENLASGVPARFSGSGSG
      H20    GGSDIELTQSPAIVSASPGKKVTITCSASSSVSYMYNYQQKPGTSPKLNISTENLASGVPARFSGSGSG
25
      220     230     240     250     260
H6    TSYSLTISRMEADAATYYCQQWSSSYTTFGGGTKLEIKRAAAGAPVPYPDPLEPR
      H20    TSYSLTISRMEADAATYYCQQWSSSYTTFGGGTKLEIKRAAAGAPVPYPDPLEPR
30
```

30 H20 peptide sequences corresponding to H6 peptides KM, KM0, KM1, KM2, KM4 and KM5 are:

H6	KM0	KM1	KM2	KM4	KM5	KM
H6 SEQ ID	3	23	24	26	27	4
H20 SEQ ID	34	35	36	37	38	39

It will be understood that the invention has been described by way of example only and modifications may be made whilst remaining within the scope and spirit of the invention.

REFERENCES (the contents of which are hereby incorporated in full)

- [1] Magliani *et al.* Clin. Microbiol. Rev., 10:369-400, 1997
- [2] Polonelli *et al.* J. Clin. Microbiol., 24:866-869, 1986
- [3] Aliouat *et al.* Serodiagn. Immunother. Infect. Dis., 5:102-106, 1993
- [4] Conti *et al.* J. Infect. Dis., 177:807-811, 1998
- [5] Polonelli & Morace J. Clin. Microbiol., 25:460-462, 1987
- [6] Polonelli & Morace J. Clin. Microbiol., 26, 602-604, 1988
- [7] Polonelli *et al.* Scan. J. Immunol., 37:105-110, 1993
- [8] Polonelli *et al.* J. Immunol., 152:3175-3182, 1994
- [9] Séguy *et al.*, FEMS Immunol. Med. Microbiol., 22:145-149, 1998
- [10] Polonelli *et al.*, J. Immunol. 156:1880-1885, 1996
- [11] Séguy *et al.* Mol. Med., 3:544-552, 1997
- [12] Polonelli *et al.*, Clin. Diagn. Lab. Immunol., 4:142-146, 1997
- [13] Magliani *et al.*, Nature Biotechnol., 15:155-158, 1997
- [14] Cenci *et al.* Infect Immun 2002 May;70(5):2375-2382
- [15] Conti *et al.*, Mol. Med., 6/7:613-619, 2000
- [16] Séguy *et al.*, J.Euk. Microbiol., 44:37S, 1997
- [17] Breedveld (2000) *Lancet* 355(9205):735-740.
- [18] Gorman & Clark (1990) *Semin. Immunol.* 2:457-466
- [19] Jones *et al.* *Nature* 321:522-525 (1986)
- [20] Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. US.A.*, 81:6851-6855 (1984)
- [21] Morrison & Oi, *Adv. Immunol.*, 44:65-92 (1988)
- [22] Verhoever *et al.*, *Science* 239:1534-1536 (1988)
- [23] Padlan, *Molec. Immun.* 28:489-498 (1991)
- [24] Padlan, *Molec. Immunol.* 31(3):169-217 (1994).
- [25] Kettleborough *et al.*, *Protein Eng.* 4(7):773-83 (1991).
- [26] WO 98/24893
- [27] WO 91/10741
- [28] WO 96/30498
- [29] WO 94/02602
- [30] US Patent 5,939,598.
- [31] Goletz *et al.* J Mol Biol 2002 Feb 1;315(5):1087-97
- [32] Morrison & Weiss (2001) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5:302-207.
- [33] Weiss *et al.* (2000) *PNAS USA* 97:8950-8954.
- [34] Carter (1994) *Methods Mol Biol* 36:207-223.
- [35] Li & Roller (2002) *Curr Top Med Chem* 2:325-341.
- [36] Bodanszky (1993) *Principles of Peptide Synthesis* (ISBN: 0387564314).
- [37] Fields *et al.* (1997) *Methods in Enzymology* 289: Solid-Phase Peptide Synthesis. ISBN: 0121821900

- [38] Chan & White (2000) *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis* ISBN: 0199637245.
- [39] Kullmann (1987) *Enzymatic Peptide Synthesis*. ISBN: 0849368413.
- [40] Ibba (1996) *Biotechnol Genet Eng Rev* 13:197-216.
- [41] Strugnell *et al.* (1997) *Immunol Cell Biol* 75(4):364-369.
- [42] Robinson & Torres (1997) *Seminars in Immunol* 9:271-283.
- [43] Donnelly *et al.* (1997) *Annu Rev Immunol* 15:617-648.
- [44] Brunham *et al.* (2000) *J Infect Dis* 181 Suppl 3:S538-43.
- [45] Svanholm *et al.* (2000) *Scand J Immunol* 51(4):345-53.
- [46] Beninati *et al.* (2000) *Nature Biotechnology* 18:1060-1064.
- [47] Bevan & Makower (1963) pages 202-203 of Goerts (ed.), *Genetics today, XIth International Congress on Genetics vol. 1*. Pergamon Press, Oxford, England.
- [48] Kazmiercki (1999) *Peptidomimetics Protocols*. ISBN: 0896035174.
- [49] Abell (1999) *Advances in Amino Acid Mimetics and Peptidomimetics*. ISBN: 0762306149.
- [50] US patent 5,331,573 (Balaji).
- [51] Goodman *et al.* (2001) *Biopolymers* 60:229-245.
- [52] Hruby & Balse (2000) *Curr Med Chem* 7:945-970.
- [53] Ribka & Rich (1998) *Curr Opin Chem Biol* 2:441-452.
- [54] Chakraborty *et al.* (2002) *Curr Med Chem* 9:421-435.
- [55] *Computer-Assisted Lead Finding and Optimization* (eds. Testra & Folkers, 1997).
- [56] Available from Molecular Simulations Inc (<http://www.msi.com/>).
- [57] Davic & Lawrence (1992) *Proteins* 12:31-41.
- [58] Caffish *et al.* (1993) *J. Med. Chem.* 36:2142-67
- [59] Eisen *et al.* (1994) *Proteins: Str. Funct. Genet.* 19:199-221.
- [60] Böhm (1992) *J. Comp. Aided Molec. Design* 6:61-78.
- [61] Gehlhaar *et al.* (1995) *J. Med. Chem.* 38:466-72.
- [62] Moon & Howe (1991) *Proteins: Str. Funct. Genet.* 11:314-328..
- [63] Available from <http://chem.leeds.ac.uk/ICAMS/SPROUT.html>.
- [64] Lauri & Bartlett (1994) *Comp. Aided Mol. Design* 8:51-66.
- [65] Available from Tripos Inc (<http://www.tripos.com>).
- [66] Rotstein *et al.* (1993) *J. Med. Chem.* 36:1700.
- [67] Lai (1996) *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 36:1187-1194.
- [68] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th ed., ISBN: 0683306472
- [69] Almeida & Alpar (1996) *J. Drug Targeting* 3:455-467.
- [70] Wills *et al.* (2000) *Emerging Therapeutic Targets* 4:1-32.
- [71] De Bernardis *et al.*, in *Handbook of animal models of infection* (eds. Zak, O. & Sande, M.A.) 735-740, Academic Press, New York, 1999
- [72] Mencacci *et al.*, *Infect. Immun.*, 62:5353-5360, 1994
- [73] Casoli *et al.* (2000) *Blood* 95: 2760-2769.

CLAIMS

1. A polypeptide comprising: at least one amino acid sequence which is a fragment of at least x amino acids from the amino acid sequence of a variable region of an anti-idiotypic antibody which recognises the idiotope of an antibody specific for a yeast killer toxin, optionally with y amino acids within said x amino acids being substituted by different amino acid(s), wherein x is at least 3 and y is at least 1.
2. The polypeptide of claim 1, consisting of at least 3 amino acids.
3. The polypeptide of claim 1 or claim 2, consisting of at most 90 amino acids.
4. The polypeptide of any one of claims 1 to 3, consisting of between 8 and 20 amino acids.
5. The polypeptide of claim 4, consisting of 10 amino acids.
6. The polypeptide of any one of claims 1 to 5, wherein x is at least 8.
7. The polypeptide of claim 6, wherein x is 10.
8. The polypeptide of any one of claims 1 to 7, wherein at least 1 amino acid within said x amino acids is substituted by different amino acid(s).
9. The polypeptide of any one of claims 1 to 8, wherein the fragment of at least x amino acids preferably includes at least 1 amino acid from a CDR within the antibody.
10. The polypeptide of any one of claims 1 to 9, comprising L amino acids and/or D amino acids.
11. The polypeptide of any one of claims 1 to 10, comprising sequence AA₁-AA₂-AA₃-AA₄-AA₅-AA₆-AA₇-AA₈-AA₉-AA₁₀, wherein: each of AA₁...AA₁₀ is independently a D- or L- amino acid; AA₁ is E, A or G; AA₂ is K, A or G; AA₃ is V, A or G; AA₄ is T, A or G; AA₅ is M, A or G; AA₆ is T, A or G; AA₇ is C, S, A or G; AA₈ is S, A or G; AA₉ is A or G; and AA₁₀ is S, A or G; provided that no more than 4 of AA₁, AA₂, AA₃, AA₄, AA₅, AA₆, AA₇, AA₈, AA₉, and AA₁₀ are A; and provided that no more than 2 of AA₁, AA₂, AA₃, AA₄, AA₅, AA₆, AA₇, AA₈, AA₉, and AA₁₀ are G.
12. The polypeptide of any one of claims 1 to 11, comprising amino acid sequence SEQ IDs: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 23, 24, 25, 26, 27, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70 & 71, with constituent amino acids in the D- and/or L- configuration.
13. The polypeptide of claim 12, consisting of SEQ ID 3, 4, 23, 27 or 33.
14. A polypeptide consisting of SEQ ID 4 or SEQ ID 33, and consisting of D-amino acids.
15. A microbicidal peptidomimetic compound which is isosteric with respect to the polypeptide of any one of claims 1 to 14.

16. An anti-idiotypic antibody which recognises the idiotope of an antibody specific for a yeast killer toxin, with the proviso that the anti idiotypic antibody is not the K10 rat monoclonal antibody.
17. An antibody which recognises the idiotope of an antibody of claim 16.
18. The antibody of claim 16 or claim 17, wherein the antibody is a single-chain Fv antibody.
- 5 19. The antibody of claim 18, wherein the antibody is H6 or H20.
20. The antibody of claim 15 or claim 16, wherein the antibody is a monoclonal antibody.
21. The antibody of claim 20, wherein the antibody is a human or humanised antibody.
22. The antibody of claim 21, wherein the antibody comprises one or more CDR from H6, H20 or K20.
- 10 23. The antibody of any one of claims 16 to 22, wherein the toxin is the killer toxin from *P.anomala*.
24. A polypeptide comprising: at least one amino acid sequence which is a fragment of at least *x* amino acids from the amino acid sequence of a variable region of an antibody of any one of claims 16 to 23, optionally with *y* amino acids within said *x* amino acids being substituted by different amino acid(s), wherein *x* is at least 3 and *y* is at least 1.
- 15 25. Nucleic acid that encodes a polypeptide of any one of claims 1 to 14 and 24, and/or an antibody of any one of claims 16 to 23.
26. The antibody of any one of claims 16 to 23, or the polypeptide of any one of claims 1 to 14, which has antimycotic activity and/or antibiotic activity.
27. A process for preparing the polypeptide of any one of claims 1 to 14, comprising chemical
20 synthesis of at least one peptide bond.
28. The process of claim 27, wherein the polypeptide is chemically synthesised in full.
29. The process of claim 27 or claim 28, further comprising the step of formulating the polypeptide in a pharmaceutical composition.
30. A pharmaceutical composition comprising (a) the antibody, polypeptide, peptidomimetic or
25 nucleic acid of any one of claims 1 to 26, and (b) a pharmaceutical carrier.
31. The pharmaceutical composition of claim 30, which is sterile, pyrogen-free and buffered at between pH 6 and pH 8.
32. The antibody, polypeptide, peptidomimetic or nucleic acid of any one of claims 1 to 26, for use as a medicament.
- 30 33. A method for treating a patient suffering from a microbial and/or viral infection, comprising administering to the patient the pharmaceutical composition of claim 30.
34. Use of the antibody, polypeptide, peptidomimetic or nucleic acid of any one of claims 1 to 26, in the manufacture of a medicament for treating microbial and/or viral infection.

ABSTRACT

Anti-idiotypic antibodies which recognise the idiotope of an antibody specific for a yeast killer toxin possess microbicidal activity. Fragments (e.g. decapeptides) of these anti-idiotypic antibodies, particularly those comprising CDR residues, also show microbicidal activity, as do peptides having
5 the same sequence but composed of D-amino acids, or including amino acid substitutions. Peptidomimetics of these microbicidal polypeptides are also provided. Antiviral activity is also seen.

SEQUENCE LISTING

<110> POLONELLI Luciano
CASSONE Antonio
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SIENA

<120> TOXIN-RELATED POLYPEPTIDES WITH
ANTIMICROBIAL & ANTIVIRAL ACTIVITY

<130> P030616WD

<150> GB-0210783.7

<151> 2002-05-10

<160> 71

<170> Seqwin99, version 1.03

<210> 1

<211> 756

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> scFv H6 nucleotide sequence

<400> 1
atggcccagg tgaagctgca ggagtcctgga cctggcctgg tggcgccctc acagagcctg 60
tccatcacat gcaccgtctc agggttctca ttaaccggct atgggtgtaa ctgggttcgc 120
cagcctccag gaaaggggtct ggagtggtct ggaatgatat ggggtgatgg aagcacagac 180
tataattcag ctctcaaatc cagactgagc atcagcaagg acaactccaa gagccaagtt 240
ttcttaaaaa tgaacagtct gcaaaactgat gacacagcca ggtactactg tctctatgct 300
atggactact ggggccaagg gaccacggct accttctcct caggtggagg cggttcaggc 360
ggaggtggct ctggcggtgg cggatcggac atcgagctca ctcagtctcc agcactcatg 420
tctgcatctc caggggagaa ggtcaccatg acctgcagtg ccagctcaag tgaagttac 480
atgtactggt accagcagaa gccaaagatcc tcc cccaac cctggattta tctcacatcc 540
aacctggctt ctggagtccc tgctcgcttc agtggcagtg ggtctgggac ctcttactct 600
ctcacaatca gcagcatgga ggctgaagat gctgccactt attactgcca gcagtggagt 660
agtaacccat acacgttcgg agggggcacc aagctggaaa tcaaactgac ggccgcaggt 720
gcgccggtgc cgtatccgga tccgctggaa ccgcgt 756

<210> 2

<211> 252

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> scFv H6 amino acid sequence

<400> 2
Met Ala Gln Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro
1 5 10 15
Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr
20 25 30
Gly Tyr Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Leu Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala
50 55 60
Leu Lys Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val
65 70 75 80
Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr
85 90 95
Cys Leu Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Cys
100 105 110
Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125
Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro
130 135 140
Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr
145 150 155 160

Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile
 165 170 175
 Tyr Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 180 185 190
 Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala
 195 200 205
 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Tyr
 210 215 220
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala Gly
 225 230 235 240
 Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu Glu Pro Arg
 245 250

<210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> KMO

<400> 3
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser
 1 5 10

<210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> KM

<400> 4
 Ala Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser
 1 5 10

<210> 5
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> KMO-derived peptide

<400> 5
 Glu Ala Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser
 1 5 10

<210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> KMO-derived peptide

<400> 6
 Glu Lys Ala Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser
 1 5 10

<210> 7
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> KMO-derived peptide

<400> 7
 Glu Lys Val Ala Met Thr Cys Ser Ala Ser
 1 5 10

<210> 8

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> KM0-derived peptide

 <400> 8
 Glu Lys Val Thr Ala Thr Cys Ser Ala Ser
 1 5 10

 <210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> KM0-derived peptide

 <400> 9
 Glu Lys Val Thr Met Ala Cys Ser Ala Ser
 1 5 10

 <210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> KM0-derived peptide

 <400> 10
 Glu Lys Val Thr Met Thr Ala Ser Ala Ser
 1 5 10

 <210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> KM0-derived peptide

 <400> 11
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ala Ala Ser
 1 5 10

 <210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> KM0-derived peptide

 <400> 12
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ala
 1 5 10

 <210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> SP0 scramble peptide

 <400> 13
 Met Ser Thr Ala Val Ser Lys Cys Glu Thr
 1 5 10

 <210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> KM-derived peptide

54

<400> 14
Ala Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala
1 5

<210> 15
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> KM-derived peptide

<400> 15
Ala Lys Val Thr Met Thr Cys Ser
1 5

<210> 16
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> KM-derived peptide

<400> 16
Ala Lys Val Thr Met Thr Cys
1 5

<210> 17
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> KM-derived peptide

<400> 17
Ala Lys Val Thr Met Thr
1 5

<210> 18
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> KM-derived peptide

<400> 18
Ala Lys Val Thr Met
1 5

<210> 19
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> KM-derived peptide

<400> 19
Ala Lys Val Thr
1

<210> 20
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> KM-derived peptide

<400> 20
Ala Lys Val
1

<210> 21
<211> 798
<212> DNA

63

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> scFv H2O nucleotide sequence

<400> 21

atggcccagg	tgcagctgca	gcagtcctggg	gcaaagcttg	tgaggtcagg	ggcctcagtc	60
aagttgtcct	gcacaacttc	tggcttcaac	attaaagact	actatatgca	ctgggtgaag	120
caaaggcctg	aacagggcct	ggagtggatt	ggatggattg	atcctgagaa	tggtgatact	180
gaatatgccc	cgaagttcca	gggcaagacc	actctgactg	cagacacatc	ctccaacaca	240
gcctacctgc	agctcagcag	cctgacatct	gaggacactg	ccgtctatta	ctgtaatgca	300
tgggtctatg	atggttactc	gggtgatttt	tattactatg	ctatggacta	ctggggccaa	360
gggaccacgg	tcaccttctc	ctcaggtgga	ggcggttcag	gcggagggtg	ctctggcggg	420
ggcggatcgg	acatcgagct	cactcagttc	ccagcaatcg	tgtctgcac	tccaggggag	480
aaggtcacca	taacctgcag	tgccagctca	agtgttaagt	acatgcactg	gttcca gcag	540
aagccaggca	cttctcccaa	actctggatt	tatagcacat	ccaacctggc	ttctggagtc	600
cctgctcgtc	tcagtggcag	tggatctggg	acctcttact	ctctcacaat	cagccgaatg	660
gaggctgaag	atgctgccac	ttattactgc	cagcaaaagg	gtagttaccc	gctcacgttc	720
gggtgctggc	ccaagctgga	aatcaaacgt	gcggccgcag	gtgcgccggg	gccgtatccg	780
gatccgctgg	aaccgcgt					798

<210> 22

<211> 266

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> scFv H2O amino acid sequence

<400> 22

Met	Ala	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Lys	Leu	Val	Arg	Ser
1			5						10					15	
Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Thr	Thr	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys
			20					25					30		
Asp	Tyr	Tyr	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Glu	Gln	Gly	Leu	Glu
		35					40					45			
Trp	Ile	Gly	Trp	Ile	Asp	Pro	Glu	Asn	Gly	Asp	Thr	Glu	Tyr	Ala	Pro
	50					55					60				
Lys	Phe	Gln	Gly	Lys	Thr	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Ser	Asn	Thr
65					70				75					80	
Ala	Tyr	Leu	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr
			85						90					95	
Tyr	Cys	Asn	Ala	Trp	Val	Tyr	Asp	Gly	Tyr	Ser	Gly	Asp	Phe	Tyr	Tyr
			100					105					110		
Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Cys	Ser	Ser
		115				120						125			
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	
	130				135					140					
Ile	Glu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Val	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu
145				150					155					160	
Lys	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	His
			165					170					175		
Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Thr	Ser	Pro	Lys	Leu	Trp	Ile	Tyr	Ser
		180						185					190		
Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly
		195					200					205			
Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Met	Glu	Ala	Glu	Asp
	210					215				220					
Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	Ser	Ser	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe
225					230					235				240	
Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Pro
			245					250					255		
Val	Pro	Tyr	Pro	Asp	Pro	Leu	Glu	Pro	Arg						

46

260

265

<210> 23
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> KM1

<400> 23
Glu Lys Val Thr Met Thr Ser Ser Ala Ser
1 5 10

<210> 24
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> KM2

<400> 24
Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Leu Tyr Ala
1 5 10

<210> 25
<211> 28
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> KM3

<400> 25
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15
Gly Ser Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Leu Tyr Ala
20 25

<210> 26
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> KM4

<400> 26
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr
1 5 10 15

<210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> KM5

<400> 27
Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp
1 5

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> IP

<400> 28
Thr Ser Thr Thr Ser Leu Glu Leu Asp
1 5

<210> 29
<211> 10

57

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> SP scramble peptide

 <400> 29
 Met Ser Thr Ala Val Ser Lys Cys Ala Thr
 1 5 10

 <210> 30
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Linker

 <400> 30
 Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

 <210> 31
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Peptide control

 <400> 31
 Tyr Met Trp Tyr Thr Trp Gly Thr Gly
 1 5

 <210> 32
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> KM derivative

 <220>
 <221> xaa is any amino acid except Cys
 <222> 7

 <400> 32
 Ala Lys Val Thr Met Thr Xaa Ser Ala Ser
 1 5 10

 <210> 33
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> KM derivative

 <400> 33
 Ala Lys Val Thr Met Thr Ser Ser Ala Ser
 1 5 10

 <210> 34
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> H2O KMO

 <400> 34
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser
 1 5 10

 <210> 35
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> H2O KM1
 <400> 35
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Ser Ser Ala Ser
 1 5 10
 <210> 36
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> H2O KM2
 <400> 36
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala Trp
 1 5 10
 <210> 37
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> H2O KM4
 <400> 37
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr
 1 5 10 15
 <210> 38
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> H2O KM5
 <400> 38
 Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp
 1 5
 <210> 39
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> H2O KM
 <400> 39
 Ala Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser
 1 5 10
 <210> 40
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> KM2-derived peptide
 <400> 40
 Ala Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Leu Tyr Ala
 1 5 10
 <210> 41
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> KM2-derived peptide
 <400> 41
 Asp Ala Ala Arg Tyr Tyr Cys Leu Tyr Ala
 1 5 10
 <210> 42

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> KM2-derived peptide

 <400> 42
 Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys Leu Tyr Ala
 1 5 10

 <210> 43
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> KM2-derived peptide

 <400> 43
 Asp Thr Ala Arg Ala Tyr Cys Leu Tyr Ala
 1 5 10

 <210> 44
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> KM2-derived peptide

 <400> 44
 Asp Thr Ala Arg Tyr Ala Cys Leu Tyr Ala
 1 5 10

 <210> 45
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> KM2-derived peptide

 <400> 45
 Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Ala Leu Tyr Ala
 1 5 10

 <210> 46
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> KM2-derived peptide

 <400> 46
 Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Ala Tyr Ala
 1 5 10

 <210> 47
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> KM2-derived peptide

 <400> 47
 Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Leu Ala Ala
 1 5 10

 <210> 48
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> KM2-derived peptide

<400> 48
 Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Ser Leu Tyr Ala
 1 5 10

<210> 49
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> KM5-derived peptide

<400> 49
 Ala Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp
 1 5

<210> 50
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> KM5-derived peptide

<400> 50
 Ser Ala Ser Val Ser Tyr Met Tyr Trp
 1 5

<210> 51
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> KM5-derived peptide

<400> 51
 Ser Ser Ala Val Ser Tyr Met Tyr Trp
 1 5

<210> 52
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> KM5-derived peptide

<400> 52
 Ser Ser Ser Ala Ser Tyr Met Tyr Trp
 1 5

<210> 53
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> KM5-derived peptide

<400> 53
 Ser Ser Ser Val Ala Tyr Met Tyr Trp
 1 5

<210> 54
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> KM5-derived peptide

<400> 54
 Ser Ser Ser Val Ser Ala Met Tyr Trp
 1 5

<210> 55
 <211> 9
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> KM5-derived peptide
 <400> 55
 Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ala Tyr Trp
 1 5
 <210> 56
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> KM5-derived peptide
 <400> 56
 Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Ala Trp
 1 5
 <210> 57
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> KM5-derived peptide
 <400> 57
 Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr Ala
 1 5
 <210> 58
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> KM4-derived peptide
 <400> 58
 Glu Lys Val Thr Met Thr Ser Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr
 1 5 10 15
 <210> 59
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> E-tag for scFv
 <400> 59
 Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu Glu Pro Arg
 1 5 10
 <210> 60
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> H6 CDR-H1
 <400> 60
 Gly Tyr Gly Val Asn
 1 5
 <210> 61
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> H6 CDR-H2
 <400> 61
 Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu
 1 5 10

<210> 62
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> H6 CDR-H3

 <400> 62
 Leu Tyr Ala Met
 1

 <210> 63
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> H6 CDR-L1

 <400> 63
 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr
 1 5 10

 <210> 64
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> H6 CDR-L2

 <400> 64
 Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5

 <210> 65
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> H6 CDR-L3

 <400> 65
 Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Tyr
 1 5

 <210> 66
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> H20 CDR-H1

 <400> 66
 Asp Tyr Tyr Met His
 1 5

 <210> 67
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> H20 CDR-H2

 <400> 67
 Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe
 1 5 10 15

 <210> 68
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <223> H20 CDR-H3

<400> 68
 Asn Ala Trp Val Tyr Asp Gly Tyr Ser Gly Asp Phe Tyr Tyr Tyr Ala
 1 5 10 15

Met

<210> 69
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> H20 CDR-L1

<400> 69
 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
 1 5 10

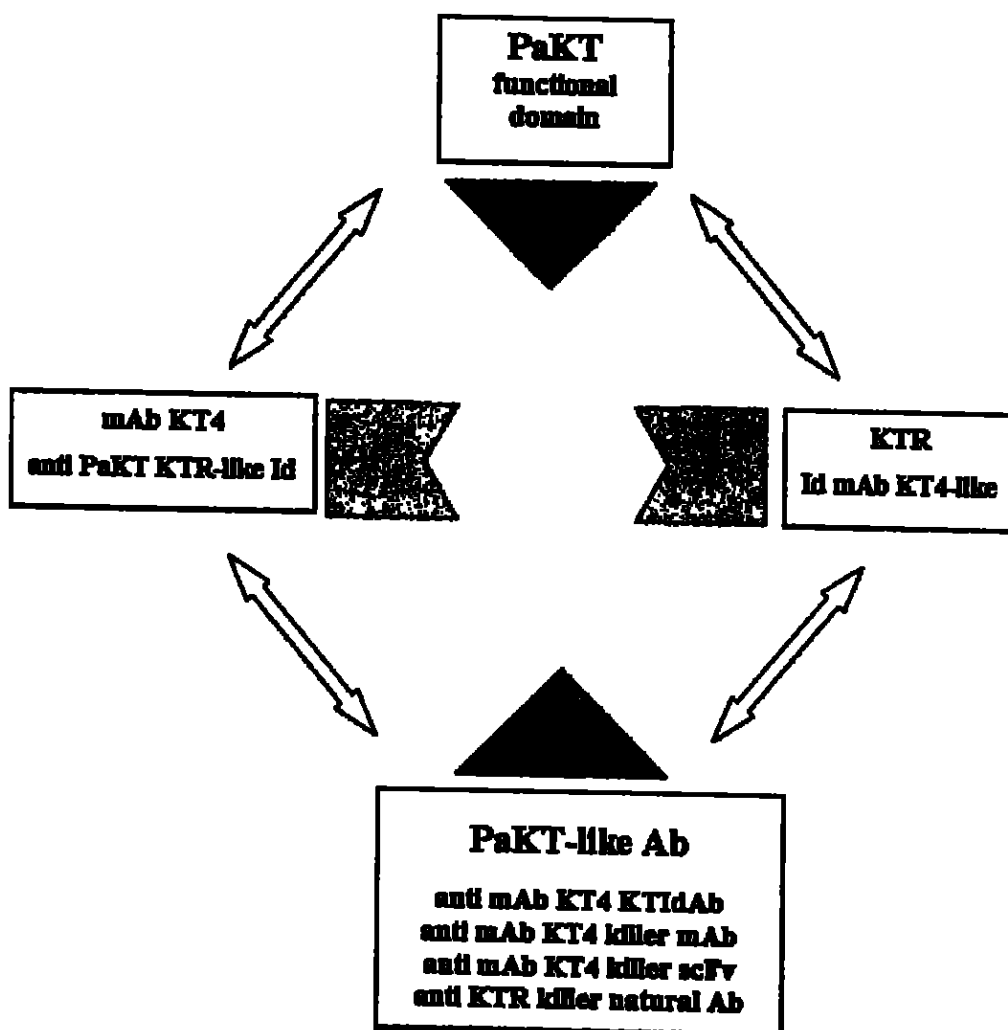
<210> 70
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> H20 CDR-L2

<400> 70
 Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5

<210> 71
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> H20 CDR-L3

<400> 71
 Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Leu
 1 5

FIGURE 1



65

2/12

FIGURE 2

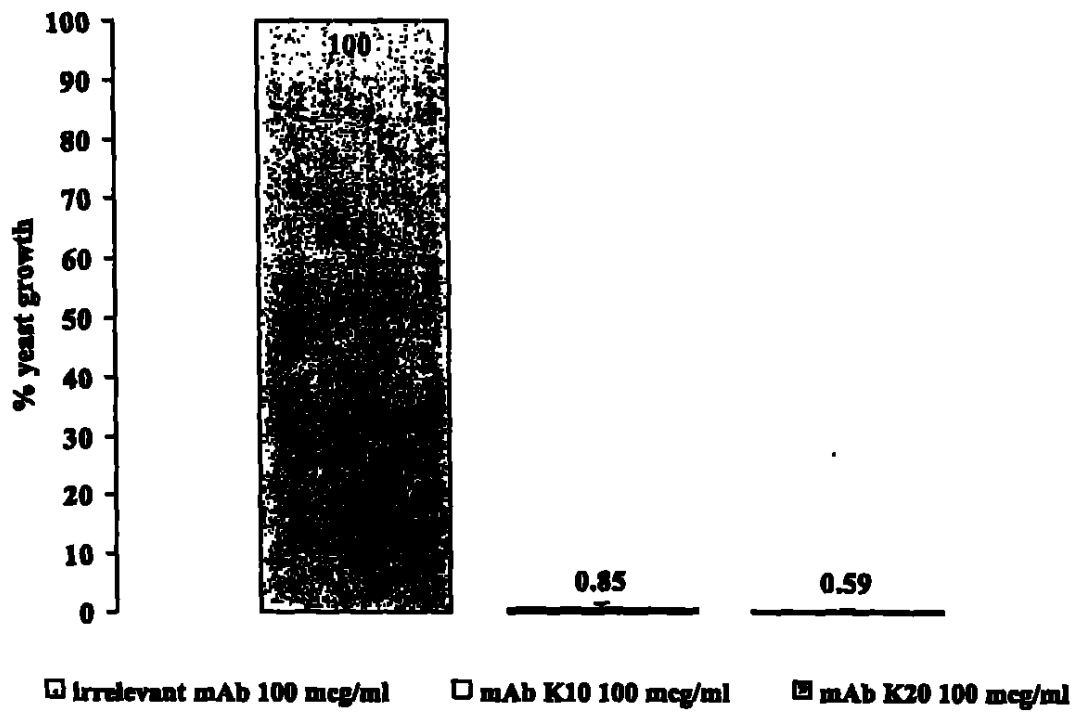
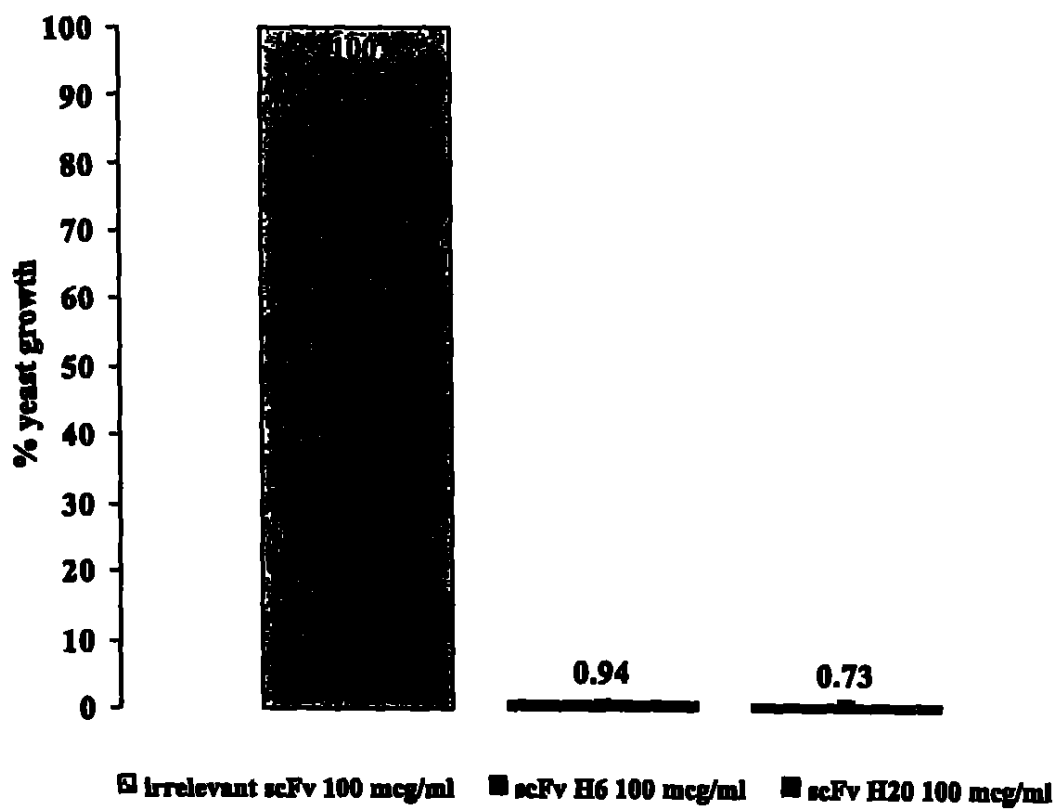


FIGURE 3



3/12

FIGURE 4

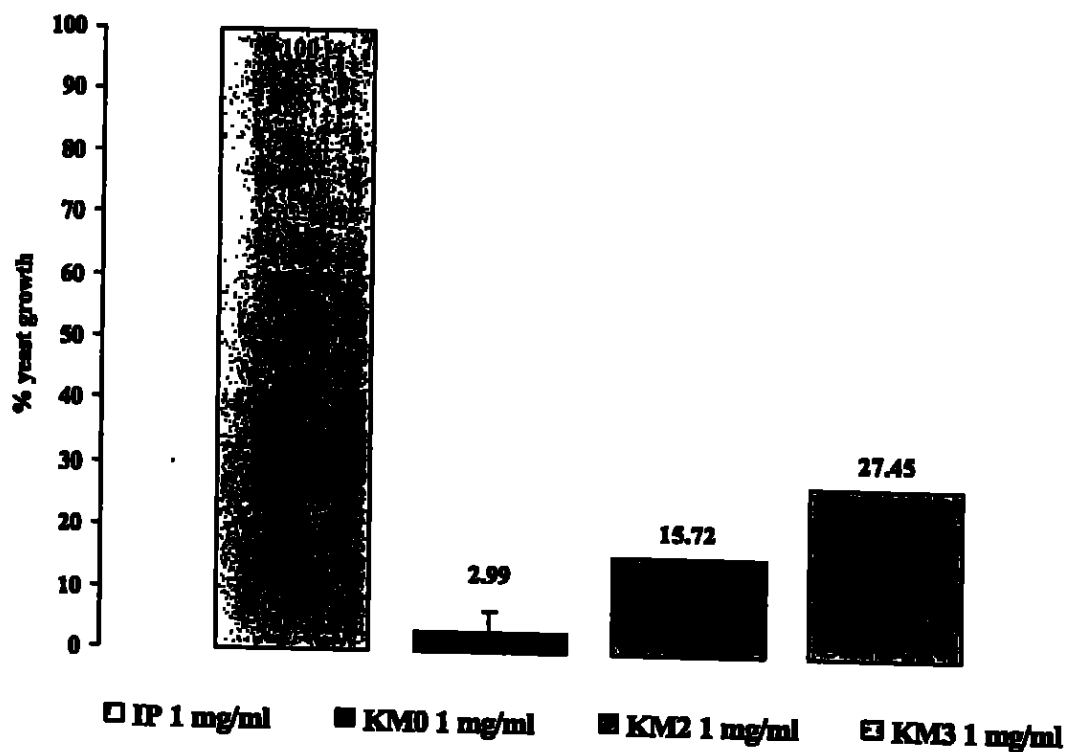
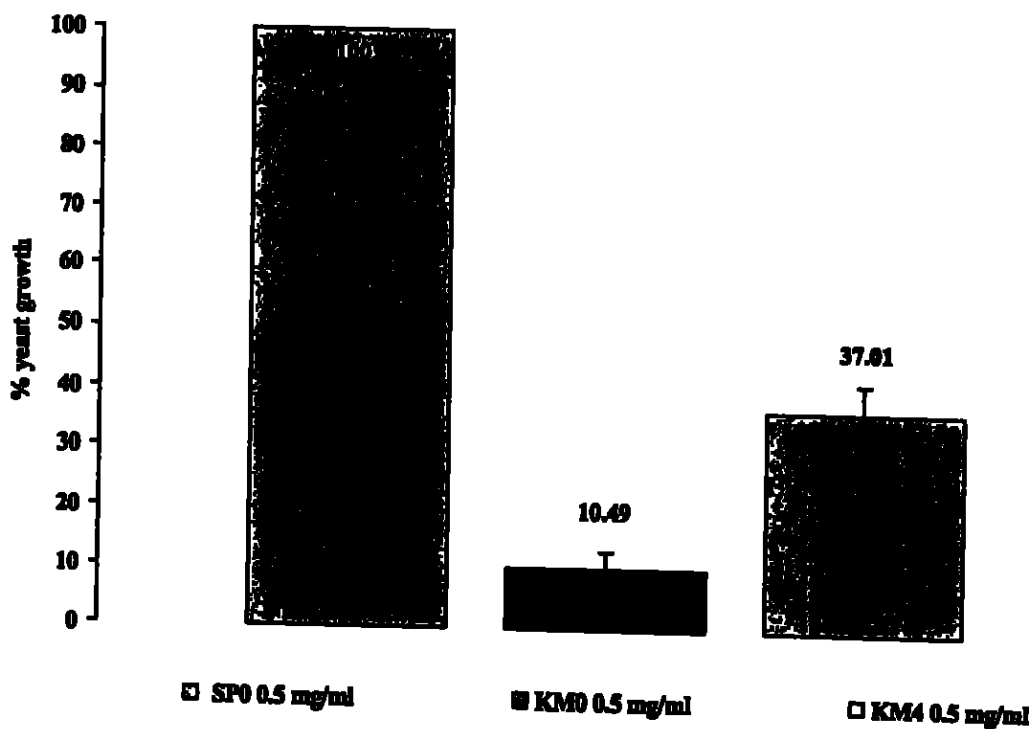


FIGURE 5



4/12

FIGURE 6

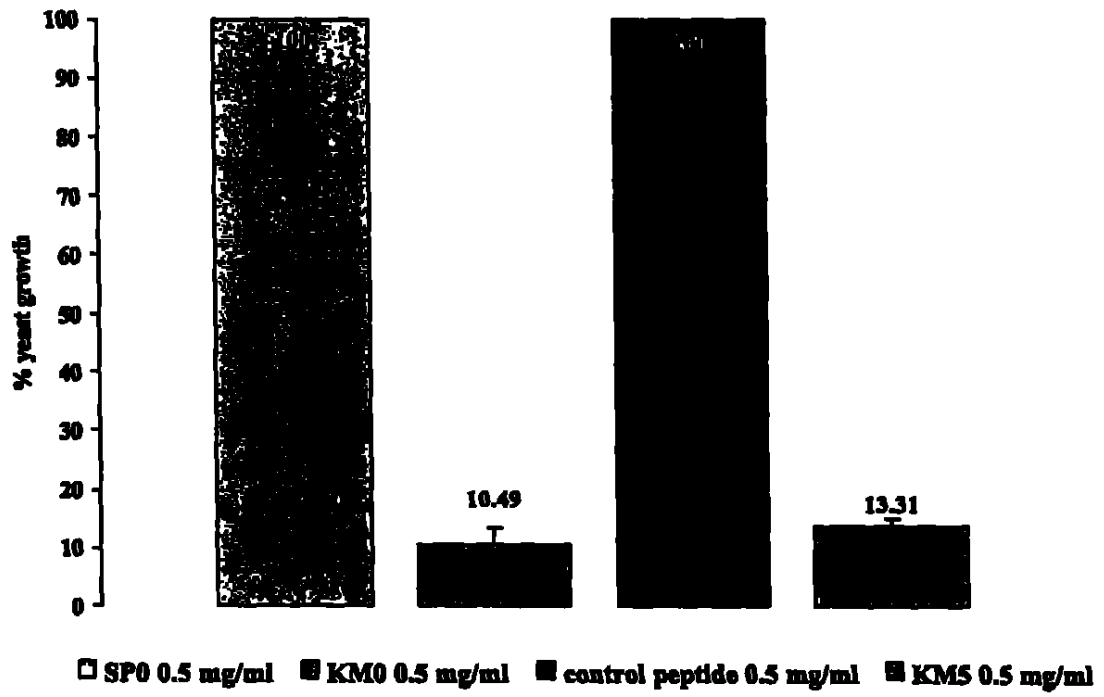
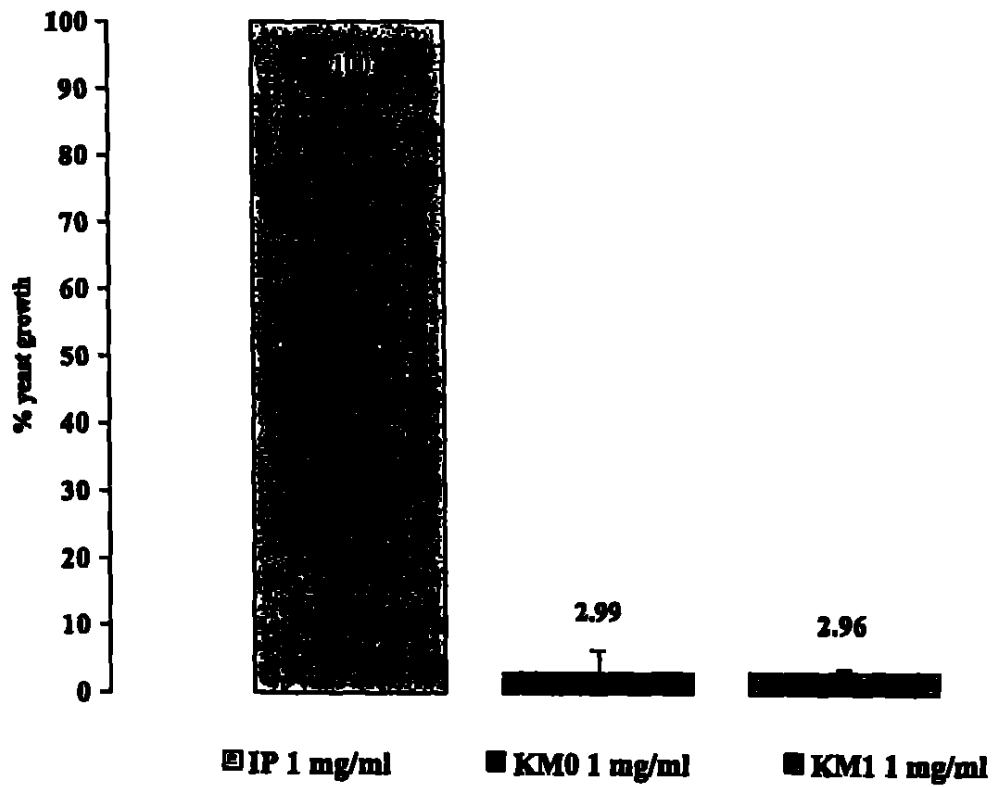
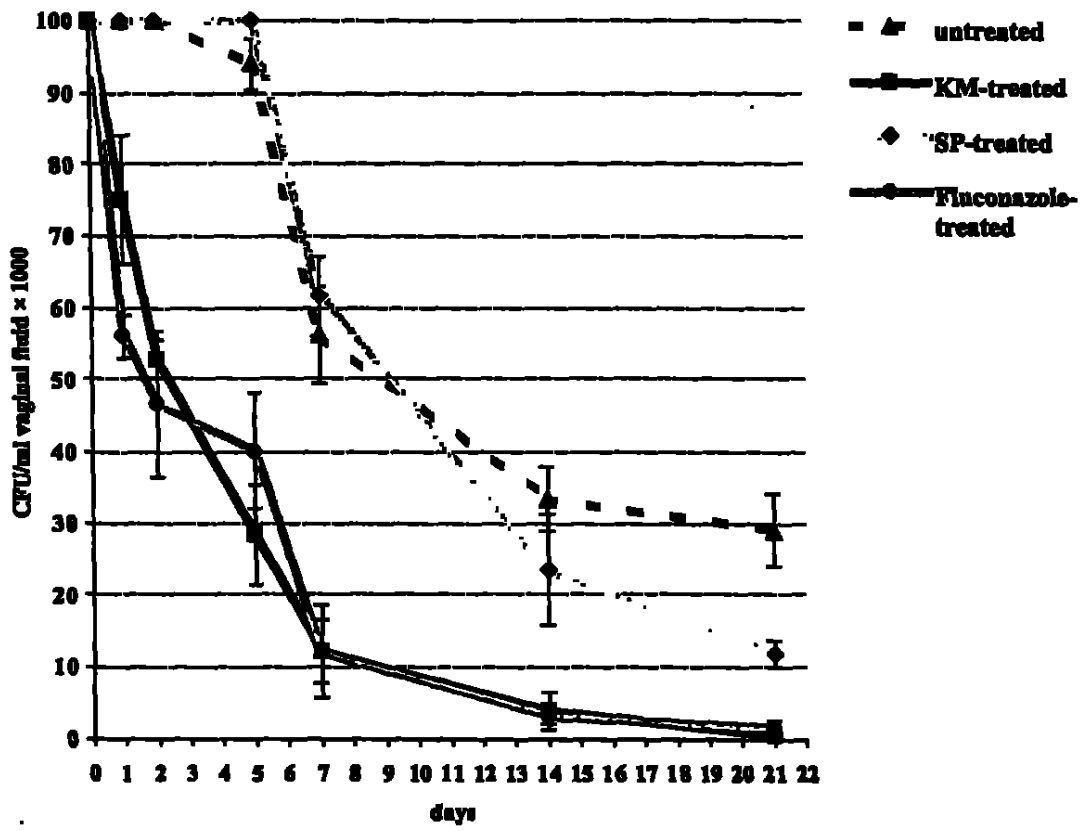


FIGURE 7



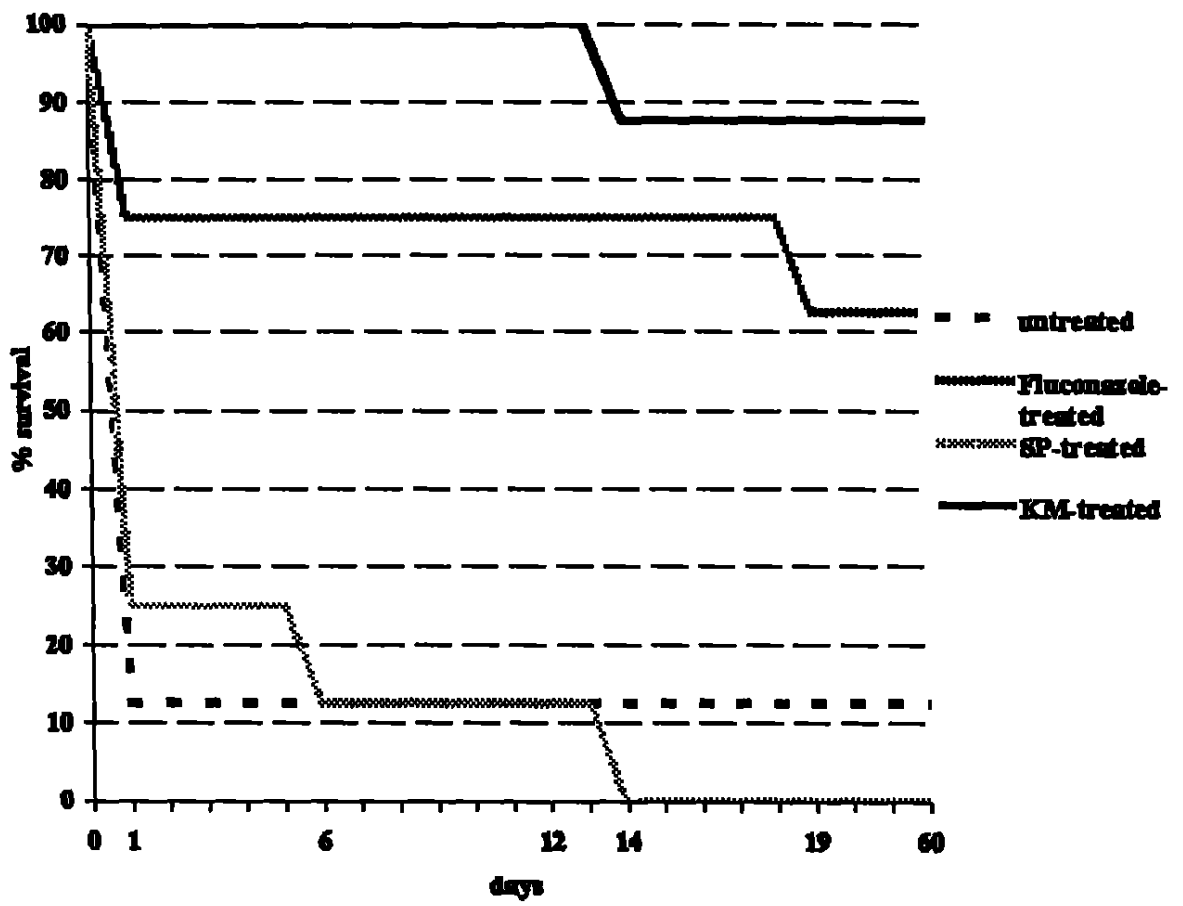
5/12

FIGURE 8



6/12

FIGURE 9



7/12

FIGURE 10

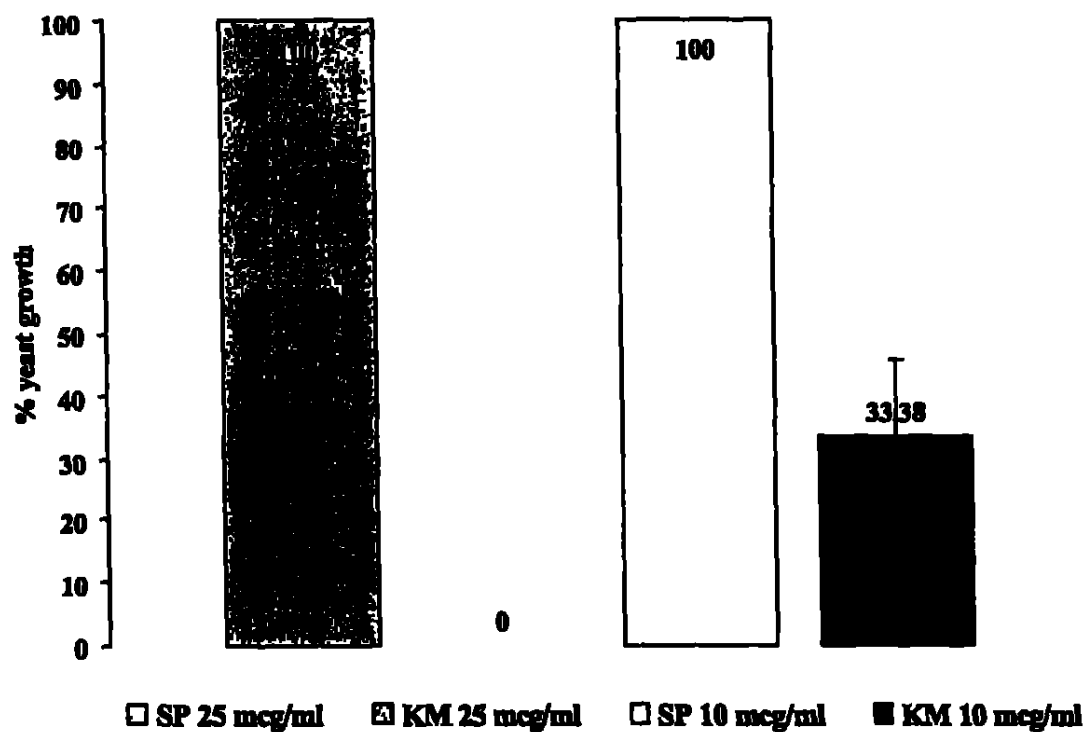
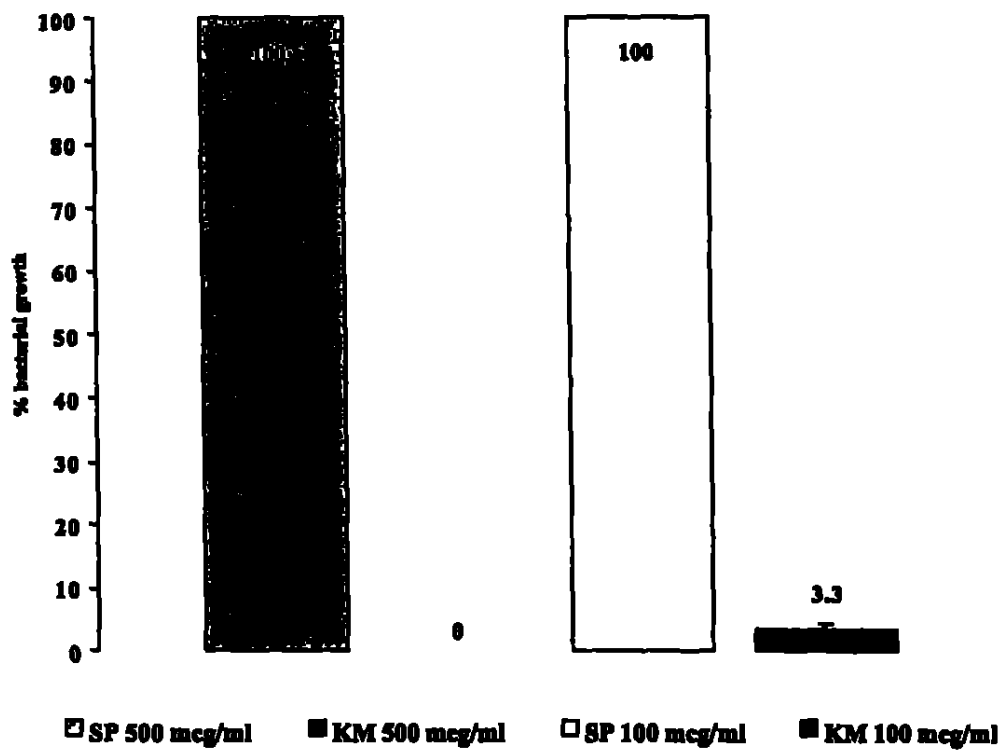


FIGURE 11



8/12

FIGURE 12

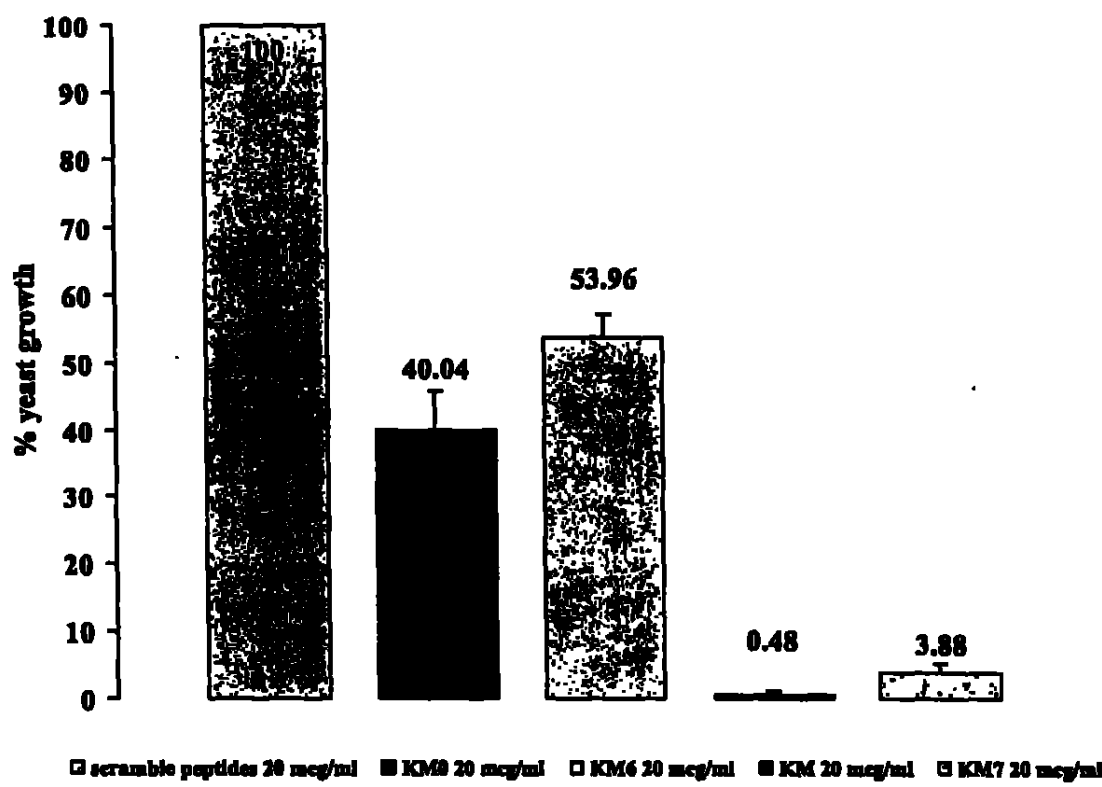
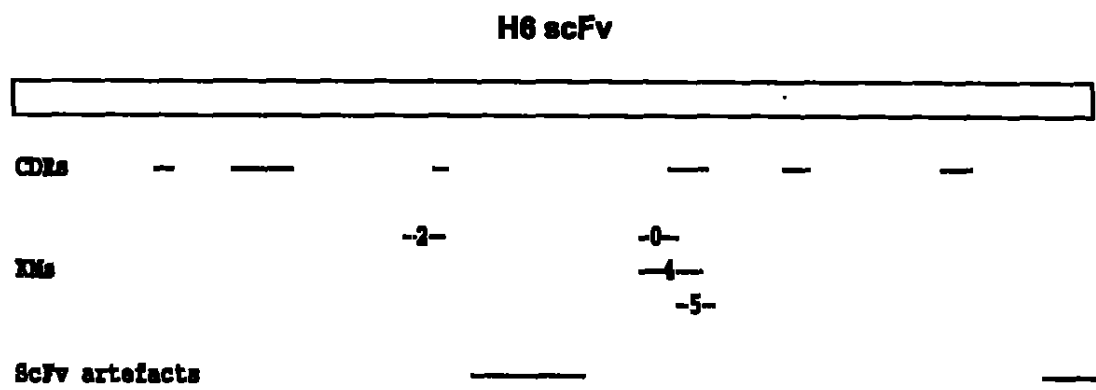


FIGURE 13



9/12

FIGURE 14

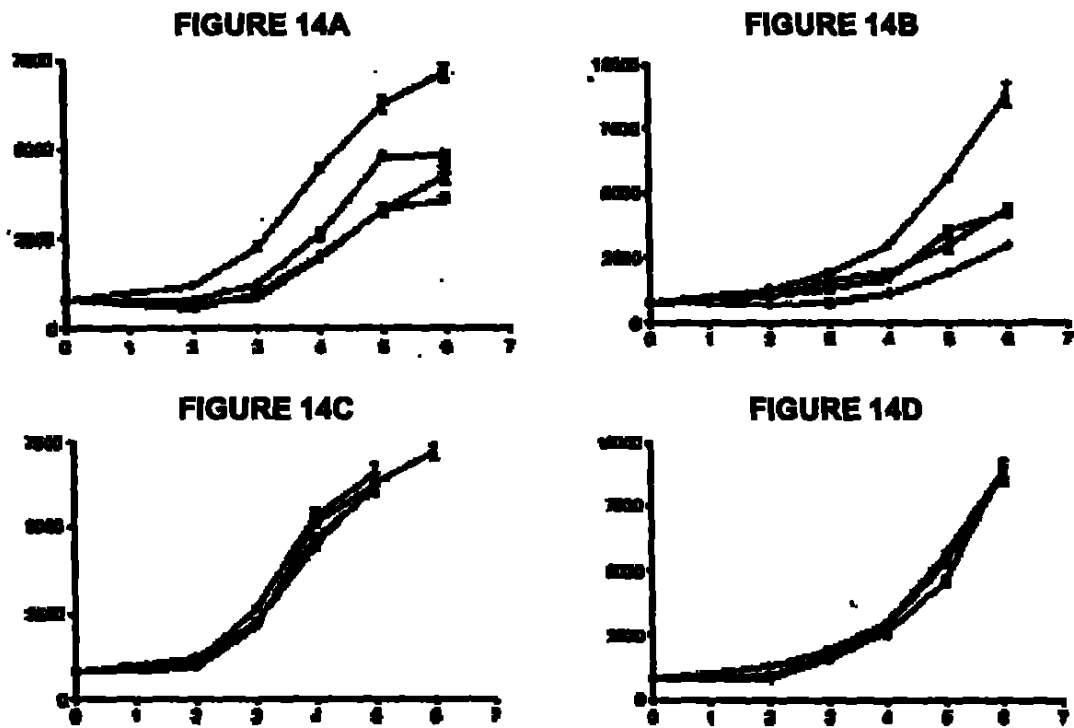


FIGURE 15

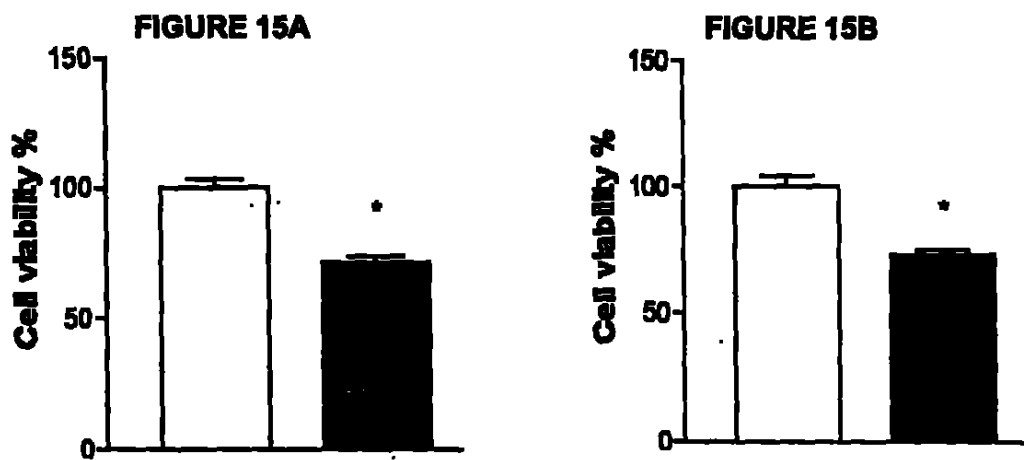
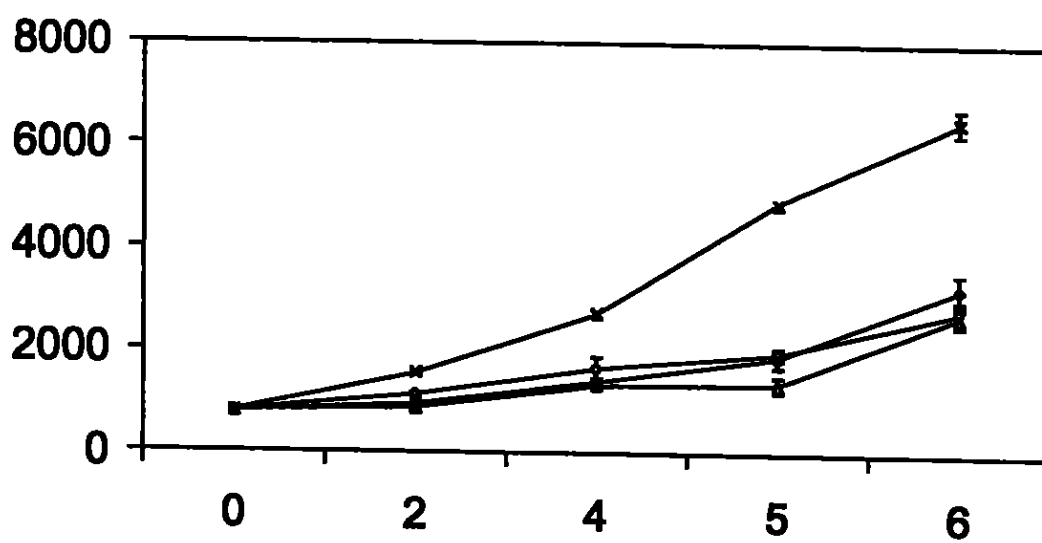
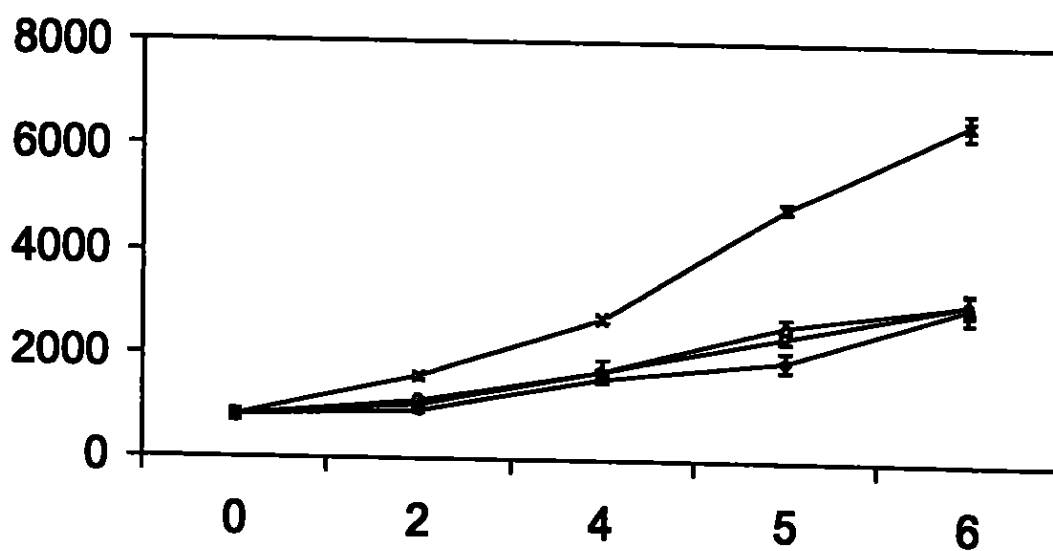


FIGURE 16**FIGURE 17**

11/12

FIGURE 18

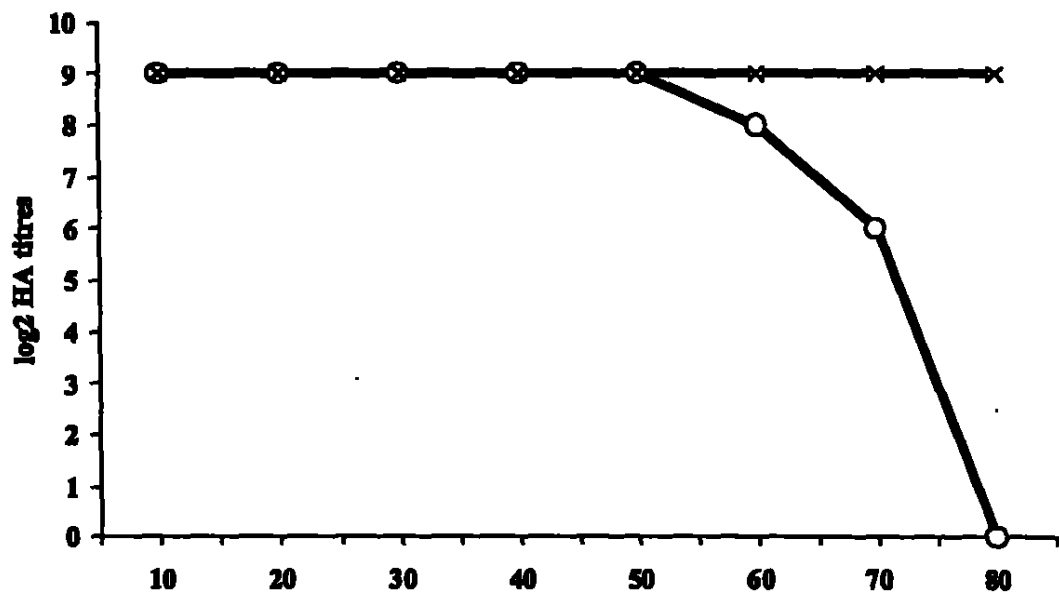
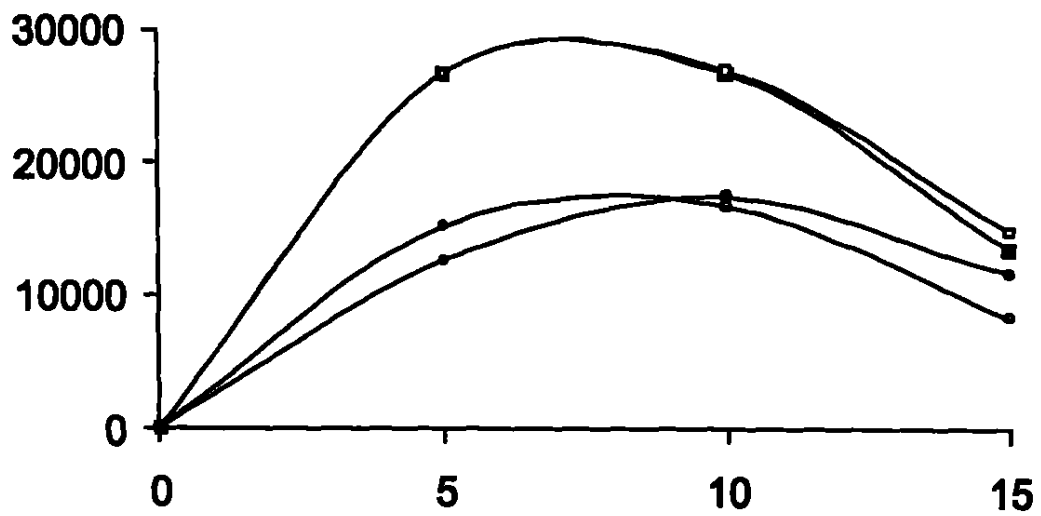


FIGURE 19



35

FIGURE 20

FIGURE 20A

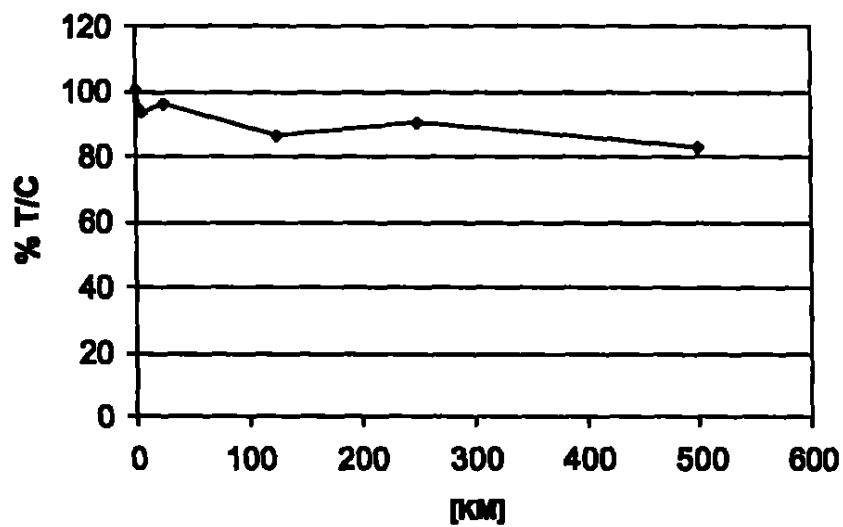
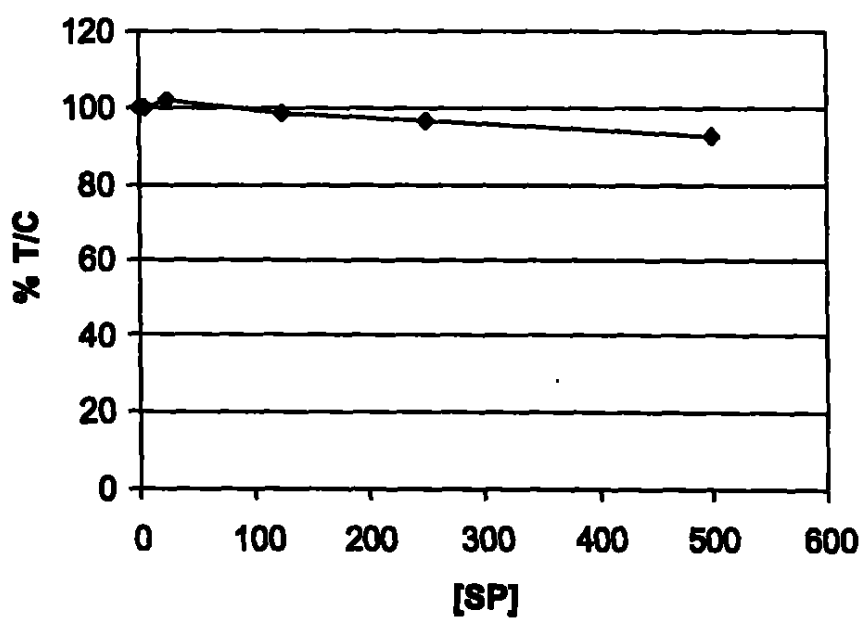


FIGURE 20B



76

Internally: Application No.

PCT/i_3/02348

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7	C07K16/42	C12N15/13	A61K39/395	A61P31/04	A61P31/12
	A61K38/08	A61K38/06	A61K38/07		

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELD SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K A61K

Documentation attached other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data bases consulted during the international search phase of data base rec. where practical, search terms used:

EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, WPI Data, PAJ, EMBASE, CHEM ABS Data, SEQUENCE SEARCH

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 130 032 A (BIOTECHNOLOGISCHE GES) 5 September 2001 (2001-09-05) claim 1	11,12
X	WO 00 47625 A (CELNIKER ABBIE CHERYL ;VASQUEZ MAXIMILIANO (US); CO MAN SUNG (US);) 17 August 2000 (2000-08-17) page 29	12
X	DE 100 19 967 A (FENNING BIONED GMBH DR) 25 October 2001 (2001-10-25) page 12 page 18	12,25
X	EP 1 199 565 A (KYOWA HAKKO KOGYO KK) 24 April 2002 (2002-04-24) page 47	12

-/-

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Searched indexing 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 doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim(s) or other special reason (as specified)
- *O* document relating 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" inter documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but aimed to understand 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 member of the same patent family**

Date of the actual completion of the international search

18 November 2003

Date of mailing of the International research report

21/01/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. Box 2018, Patenkam 2
NL - 2200 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-8040, Telex 31 891 apo nl,
Fax: (+31-70) 340-8018

Authorized officer

Wagner, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internet Application No

PCT/IB 03/02348

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 26671 A (FRIEDRICHS ULRIKE ;CONNEX GMBH (DE); HEPPNER PETRA (DE); RINGEIS A) 11 May 2000 (2000-05-11) claim 21	12
X	WO 01 54723 A (KERBEL ROBERT ;SUNNYBROOK HEALTH SCIENCE CT (CA); IMCLONE SYSTEMS) 2 August 2001 (2001-08-02) page 37	12, 30-32
X	US 5 693 761 A (SCHNEIDER WILLIAM P ET AL) 2 December 1997 (1997-12-02) figure 5A	11
X	POLONELLI L ET AL: "Monoclonal yeast killer toxin-like candidacidal anti-idiotypic antibodies" CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY, vol. 4, no. 2, 1997, pages 142-146, XP002261609 ISSN: 1071-412X page 143	16, 17, 20-23, 26, 30-34
X	BENINATI CONCETTA ET AL: "Therapy of mucosal candidiasis by expression of an anti-idiotypic in human commensal bacteria" NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 18, no. 10, October 2000 (2000-10), pages 1060-1064, XP002261610 ISSN: 1087-0156 page 1063	16-23, 30-34
X	MAGLIANI W ET AL: "Therapeutic potential of antiidiotypic single chain antibodies with yeast killer toxin activity" NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 15, no. 2, 1997, pages 155-158, XP001154788 ISSN: 1087-0156 page 157	16-23, 30-34
P, X	SIMONA VACCARI: "Tesi dottorale: Caratterizzazione strutturale e funzionale di peptidi ad attivita' antibiotica" 'Online! 24 February 2003 (2003-02-24) , UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA , PARMA XP002261614 Retrieved from the Internet: <URL: http://biocchimica.unipr.it/home/tesi/att/6 56c.testo.pdf> 'retrieved on 2003-11-14! the whole document	11-23, 25-34
	-/-	

78

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No.
PCT/10 U3/02348

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	MAGLIANI W ET AL: "Biotechnological approaches to the production of idiotypic vaccines and antiidiotypic antibiotics." CURRENT PHARMACEUTICAL BIOTECHNOLOGY. NETHERLANDS APR 2003, vol. 4, no. 2, April 2003 (2003-04), pages 91-97, XP001156155 ISSN: 1389-2010 page 92 -page 93	16-23, 25-34
A	POLONELLI L ET AL: "The efficacy of acquired humoral and cellular immunity in the prevention and therapy of experimental fungal infections" MEDICAL MYCOLOGY, vol. 38, no. Supplement 1, 2000, pages 281-292, XP009000668 ISSN: 1369-3786 page 287	11-23, 25-34
A	POLONELLI LUCIANO ET AL: "Idiotypic vaccination: Immunoprotection mediated by anti-idiotypic antibodies with antibiotic activity" SCANDINAVIAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 37, no. 1, 1993, pages 105-110, XP009020801 ISSN: 0300-9475 the whole document	1-23,25, 26,30-34
A	POLONELLI LUCIANO ET AL: "Idiotypic intravaginal vaccination to protect against candidal vaginitis by secretory, yeast killer toxin-like anti-idiotypic antibodies" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 152, no. 6, 1994, pages 3175-3182, XP002261612 ISSN: 0022-1767 the whole document	11-23, 25,26, 30-34
A	CASSONE A ET AL: "Antibodies, killer toxins and antifungal immunoprotection: a lesson from nature?" IMMUNOLOGY TODAY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 18, no. 4, 1 April 1997 (1997-04-01), pages 164-169, XP004058352 ISSN: 0167-5699 the whole document	11-23, 25,26, 30-34
	-/-	

Form PCT/DA/210 (continuation of annex sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/15 03/02348

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	SAVOIA DIANELLA ET AL: "In vitro leishmanicidal activity of a monoclonal antibody mimicking a yeast killer toxin" JOURNAL OF EUKARYOTIC MICROBIOLOGY, vol. 49, no. 4, July 2002 (2002-07), pages 319-323, XP009020872 ISSN: 1066-5234 the whole document	11-23, 25, 26, 30-34
A	POLONELLI LUCIANO ET AL: "Human natural yeast killer toxin-like candidacidal antibodies" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 156, no. 5, 1996, pages 1880-1885, XP002261613 ISSN: 0022-1767 the whole document	11-23, 25, 26, 30-34
A	WO 98 08090 A (BOSTON BIOMED RES INST ; CODINGTON JOHN F (US)) 26 February 1998 (1998-02-26) page 12	17
T	POLONELLI LUCIANO ET AL: "Therapeutic activity of an engineered synthetic killer anti-idiotypic antibody fragment against experimental mucosal and systemic candidiasis." INFECTION AND IMMUNITY. UNITED STATES NOV 2003, vol. 71, no. 11, November 2003 (2003-11), pages 6205-6212, XP009020875 ISSN: 0019-9567 page 6205 -page 6206	11-23, 25-35

Form PCT/IS 010 (continuation of second sheet) (July 1993)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB 03/02348

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claim 33 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☒ Claims Nos.: 1-10 (in part), 15, 24, 25-34 (in part)
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1-10 (in part), 15, 24, 25-34(in part)

Claims 1-10 comprise an extremely large number of possible combinations. Therefore said claim are not clear and concise (Article 6 PCT). No common structure can be deduced from the claim and not a single amino acid is defined.

For these reasons a meaningful search is not possible over the entire scope of claims 1-10.

Said claims were only searched regarding the subject-matter defined in dependent claim 11, in which a certain structure of the relevant peptide is specified. The sequences defined in claim 12 were also searched.

Claim 15 is not clear and not concise (Article 6 PCT) because of the exceedingly high number of possibilities of isosteric compounds of the already extremely high number of alternatives in the claims on which claim 15 is depending. Therefore said claim is not clear and not concise as required by Article 6 PCT and no meaningful search is possible.

Claim 24 comprises an extremely large number of possible polypeptides. Even if the antibodies were defined by sequences Seq. Id. Nos. 2 and 22 (see section 1 of further remarks) the number of possible polypeptides including an unlimited number of substitutions is exceedingly large. No common structure can be deduced from the claim and not a single amino acid is defined. Therefore said claim is not clear and not concise as required by Article 6 PCT and no meaningful search is possible.

Consequently claims 25-34, which are referring to polypeptides of claims 1-10 or 24 can only be searched in part i.e as far as referring to the polypeptides of claims 11 and 12.

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 66.1(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.

82

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/JP 03/02348

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
EP 1130032	A	05-09-2001	EP	1130032 A1	05-09-2001
WO 0047625	A	17-08-2000	US	2002176855 A1	28-11-2002
			AU	3998800 A	29-08-2000
			BR	0008209 A	19-02-2002
			CA	2362592 A1	17-08-2000
			CN	1360596 T	24-07-2002
			CZ	20012925 A3	16-01-2002
			EP	1159300 A2	05-12-2001
			HU	0301208 A2	28-08-2003
			JP	2002540764 T	03-12-2002
			NO	20013911 A	10-10-2001
			PL	350909 A1	10-02-2003
			WO	0047625 A2	17-08-2000
			ZA	200106982 A	11-12-2002
DE 10019967	A	25-10-2001	DE	10019967 A1	25-10-2001
			AU	7395001 A	07-11-2001
			WO	0181423 A1	01-11-2001
EP 1199565	A	24-04-2002	AU	5250200 A	09-01-2001
			EP	1199565 A1	24-04-2002
			WO	0079275 A1	28-12-2000
WO 0026671	A	11-05-2000	AU	1157100 A	22-05-2000
			WO	0026671 A1	11-05-2000
			EP	1125130 A1	22-08-2001
			JP	2002529705 T	10-09-2002
WO 0154723	A	02-08-2001	AU	3122301 A	07-08-2001
			CA	2398503 A1	02-08-2001
			EP	1261370 A1	04-12-2002
			JP	2003520826 T	08-07-2003
			WO	0154723 A1	02-08-2001
US 5693761	A	02-12-1997	US	5530101 A	25-06-1996
			AT	251639 T	15-10-2003
			AU	7548196 A	20-02-1997
			AU	671949 B2	19-09-1996
			AU	9172691 A	22-07-1992
			CA	2098404 A1	20-06-1992
			DE	69133326 D1	13-11-2003
			EP	0566647 A1	27-10-1993
			JP	6503963 T	12-05-1994
			JP	3276369 B2	22-04-2002
			KR	231090 B1	15-11-1999
			WO	9211018 A1	09-07-1992
			US	5585089 A	17-12-1996
			US	6180370 B1	30-01-2001
			US	5693762 A	02-12-1997
			AT	133452 T	15-02-1996
			AT	183753 T	15-09-1999
			AU	647383 B2	24-03-1994
			AU	5153290 A	13-08-1990
			BG	61095 B2	31-10-1996
			CA	2006865 A1	28-06-1990
			CA	2328851 A1	28-06-1990
			CN	1043875 A , 8	18-07-1990

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

83

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/IB 03/02348

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5693761	A	CZ 9104186 A3	13-10-1993
		DE 10075005 I1	23-11-2000
		DE 68925536 D1	07-03-1996
		DE 68925536 T2	20-06-1996
		DE 68929061 D1	30-09-1999
		DE 68929061 T2	27-04-2000
		DK 94198 A	16-07-1998
		DK 119191 A	19-06-1991
		EP 0451216 A1	16-10-1991
		EP 0682040 A1	15-11-1995
		EP 0939127 A2	01-09-1999
		ES 2081974 T3	16-03-1996
		ES 2136760 T3	01-12-1999
		FI 108797 B1	28-03-2002
		HK 1014718 A1	14-07-2000
		HR 920500 A1	30-04-1996
		HU 9500236 A3	28-09-1995
		IE 20000331 A1	21-02-2001
		JP 11004694 A	12-01-1999
		JP 2828340 B2	25-11-1998
		JP 4502408 T	07-05-1992
		JP 2003245090 A	02-09-2003
		JP 2003245091 A	02-09-2003
		KR 178385 B1	01-04-1999
		LU 90411 A9	02-09-1999
WO 9808090	A	US 5808005 A	15-09-1998
	26-02-1998	WO 9808090 A1	26-02-1998

PATENT COOPERATION TREATY

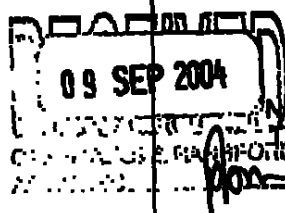
✓ 4-4
8x

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

PCT

To:

MARSHALL, Cameron, John
Carpmaels & Ransford
43-45 Bloomsbury Square
London WC1A 2RA
GRANDE BRETAGNE



NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 71.1)

Date of mailing
(day/month/year)

07.09.2004

Applicant's or agent's file reference
P030616WO

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/IB 03/02348

International filing date (day/month/year)
09.05.2003

Priority date (day/month/year)
10.05.2002

Applicant
POLONELLI, Luciano 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.

The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed inventions are patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

Name and mailing address of the International
preliminary examining authority:



European Patent Office
D-80286 Munich
Tel. +49 89 2369 - 0 Tlx 523855 epmu d
Fax +49 89 2369 - 4485

Authorized Officer

Cleere, C

Tel. +49 89 2369-7713



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT (PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference P030616WO		FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/PEA/416)	
International application No. PCT/IB 03/02348	International filing date (day/month/year) 09.05.2003	Priority date (day/month/year) 10.05.2002	
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC C07K1642			
Applicant POLONELLI, Luciano 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 9 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 sheets. 3. This report contains indications relating to the following items: - I ☒ Basis of the opinion - 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 Rule 66.2(a)(II) 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 02.10.2003		Date of completion of this report 07.09.2004	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80289 Munich Tel. +49 89 23699 - 0 Tlx 523656 epmu d Fax +49 89 23699 - 4465		Authorized Officer Wagner, R Telephone No. +49 89 2369-7357 	

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

 International application No. **PCT/IB 03/02348**
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

1-41 as originally filed

Sequence listings part of the description, Pages

1-13 as originally filed

Claims, Numbers

1-34 as originally filed

Drawings, Sheets

1/12-12/12 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:

- ☐ the description, pages:
- ☐ the claims, Nos.:
- ☐ the drawings, sheets:

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. **PCT/IB 03/02348**

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.)*
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. 1-10(all in part), 15,24,25-34 (in part)
because:
 - ☒ the said international application, or the said claims Nos. 33 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. 1-10(all in part), 15,24,25-34 (in part)
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

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	13,14,16-23,26-29,33,34
	No: Claims	11,12,25,30-32
Inventive step (IS)	Yes: Claims	13,14
	No: Claims	11,12,16-23,25,26,27-29,30-32,33-34
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	11-32,34
	No: Claims	

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. **PCT/B 03/02348**

2. Citations and explanations

see separate sheet

O

()

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/IB 03/02348

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

- ▶ Claims 1-10 comprise an extremely large number of possible combinations. Therefore said claim are not clear and concise (Article 6 PCT). No common structure can be deduced from the claim and not a single amino acid is defined. The subject-matter of the claim is not limited by its origin - i.e. coming from an anti-idiotypic antibody - because if the skilled person is presented with 2 identical peptides she/he is not able to determine whether the peptide is originating from a precise antibody or not.

Said claims were only searched regarding the subject-matter defined in dependent claim 11, in which a certain structure of the relevant peptide is specified. The sequences defined in claim 12 were also searched.

Said claims have only been searched in part and are thus only examined regarding the searched subject-matter (rule 66.1 (e) PCT).

- ▶ Claim 15 is not clear and not concise (Article 6 PCT) because of the exceedingly high number of possibilities of isosteric compounds of the already extremely high number of alternatives in the claims on which claim 15 is depending.

Claim 15 has not been searched and is thus not examined (Rule 66.1 (e) PCT).

- ▶ Claim 24 comprises an extremely large number of possible polypeptides. Even if the antibodies were defined by sequences Seq. Id. Nos. 2 and 22 (see section 1 of further remarks) the number of possible polypeptides including an unlimited number of substitutions is exceedingly large. No common structure can be deduced from the claim and not a single amino acid is defined. Therefore said claim is not clear and not concise (Article 6 PCT).
- ▶ Claims 25-34 refer also directly to the polypeptides of claims 1-10 and 24 and were therefore also searched only in part. Thus only the parts referring to the polypeptides of claims 11 and 12 are examined (Rule 66.1 (e)PCT).
- ▶ Claim 33 relates to subject-matter considered by this Authority to be covered by

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/IB 03/02348

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).

Re Item V

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

Reference is made to the following documents:

- D1: EP1130032
- D2: WO 0047625
- D3 : DE 10019967
- D4: 1199565EP
- D5: WO 0026671
- D6: WO 0154723
- D7: US5693761
- D8: Polonelli et al., Clinical and Diagnostic Lab. Immun., Mar. 1997, p.142-146.
- D9: Beninatie et al., Nature Biotechnology, vol. 18, October 2000, pp.1060-1064.
- D10: Magliani et al., Nature Biotechnology, vol 15, Feb. 1997, pp.155-158.
- D11: Thesis. Simona Vaccari, Università Parma, 24.02.2003
- D12: Magliani et al., Current Pharm. Biotech. vol. 4, April 2003

1. Claim 11 is directed to a polypeptide comprising the peptide EKVTMTCSAS and a large number of variants thereof. Said polypeptide is not new (Article 33(2) PCT) because D1 discloses in claim 1 (the third sequence) a polypeptide sequence comprising the above decapeptide. In addition D7 discloses in Figure 5a a polypeptide which comprises EKVTMTCSGS and thus falls also within the scope of claim 11.
2. Claim 12 is directed to a large number of polypeptides comprising peptides identified by their sequence. Seq. Id. No. 3 is the sequence EKVTMTCSAS defined in claim 11. Therefore D1 anticipates (Article 33(2) PCT) also the subject-matter of claim 12.
D2 (Seq. Id. No.6, page 29) discloses the exact peptide corresponding to the CDRH1 of antibody H20, identified as Seq. Id. No. 66.

D3 (Fig. 1, Seq. Id. No. 5) also discloses the peptide identified by the Seq. Id. N 66.

D4 (Seq. Id. No. 8) discloses the peptide identified by Seq. Id. No. 69, which corresponds to the CDRL1 of the antibody H20.

D5 (CDR2 in claim 21) discloses the peptide identified by Seq. Id. No. 69.

D6 (Seq. Id. No. 5) discloses the peptide identified by Seq. Id. No. 69.

Therefore D2-D6 anticipate the subject-matter of claim 12 (Article 33(2) PCT).

3. The subject-matter of claims 13 and 14 is new (Article 33(2) PCT) because the prior art does not disclose said polypeptides. The prior art does not give any indication that decapeptides, or variants in which one amino acid is replaced) originating from anti-idiotypic antibodies, which mimic an epitope of a Yeast Killer Toxin have an anti-fungal activity. Therefore the subject-matter of claims 13 and 14 involves an inventive step (Article 33(3) PCT).
4. The subject-matter of claims 16 to 23 is directed to anti-idiotypic antibodies mimicking a yeast killer toxin. The antibodies in claims 19 and 20 have to be defined by their respective Seq. Id. Nos (see Further Remarks). Claim 16 comprises a disclaimer in regard to a monoclonal antibody referred to as K10. It seems that the applicant wants to refer to the antibody appearing in its own publication D8. D8 does not disclose the sequence of K10 or a deposited hybridoma producing K10, therefore D8 cannot be regarded as being an enabling disclosure and thus the disclaimer is not clear (Article 6 PCT). As said K10 antibody is only defined by functional features and cannot be differentiated from any other anti-idiotypic antibody which recognises the idiotope of an antibody specific for a yeast killer toxin. In D9 and D10 the applicant discloses an anti-idiotypic antibody called scFv-H6. Said antibody might be identical with the scFv referred to in claim 19 (Seq. Id. No. 2). However neither D9 nor D10 enable the skilled person to produce said precise antibody. Therefore the subject-matter of claims 16-23 has to be considered as being new (Article 33(2) PCT).

D8 discloses in detail (page 143) a method by which anti-idiotypic antibodies recognizing the idiotope of an antibody directed against a killer toxin from *P. anomala* can be obtained by the hybridoma technique. D9 and D10 disclose the methods how to produce an anti-idiotypic scFv antibody. The production of humanized antibodies is state of the art. Therefore the subject-matter of claims

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/IB 03/02348

- 16,18-21, 23 does not involve an inventive step (Article 33(3) PCT). As the system of the idiotypic network is generally known, an antibody directed against the idiotypic antibody does not have any surprising effects. Thus the subject-matter of claim 17 does not involve an inventive step (Article 33(3) PCT). As single CDRs are not having a technical effect on their own, i.e. do not specifically bind to an antigen or do not represent an idiotypic antigen, the features of claims 22 does not confer an inventive step on the antibodies (Article 33(3) PCT).
5. The nucleic acids of claim 25, as far as being clearly defined (i.e. being considered as dependent only on claims 11 to 14) are not new (Article 33(2) PCT) because D3 discloses the nucleic acid sequence (Seq. Id. No. 18) encoding the peptide identified by the Seq. Id. No 66 in the present application.
6. Claim 26 specifies that the antibodies of claims 16-23 must have an antimycotic activity. As the method of producing anti-idiotype antibodies disclosed in D8 involves a step consisting of screening the antibodies for their anti-mycotic activity, the subject-matter of claim 26 does not involve an inventive step (Article 33(3) PCT).
7. The processes of claims 27 to 29 as far as referring to the polypeptides of claims 11 to 14 do not involve an inventive step because the chemical synthesis and the formulation in a pharmaceutical composition of known polypeptides (see sections 1 and 2 above) is a standard procedure.
8. The subject-matter of claim 30-32 is not new (Article 33(2) PCT) because the D6 (Seq. Id. No. 5) discloses a medical use and pharmaceutical compositions of the antibody comprising the peptide identified by Seq. Id. No. 69 (see also section 1 above).
9. As far as referring to claims directed to polypeptides and antibodies which are clearly defined (see section III) the subject-matter of claims 33-34 is new (Article 33(2) PCT). Said subject-matter does however not involve an inventive step (Article 33(3) PCT) because D8, which discloses the method for producing the anti-idiotype antibody of claim (see section 4 above) clearly intends a use of said antibodies for the treatment of candidiasis.

Further Remarks:

INTERNATIONAL PRELIMINARY

International application No. PCT/IB 03/02348

EXAMINATI N REPORT - SEPARATE SHEET

1. Claims 16-23 are not clear (Article 6 PCT) because the antibodies are not unambiguously defined by the Internal denominations K10, H6 or H20. Antibodies H6 and H20 have to be identified by there respective sequences (Seq. Id. No. 2 and 22). There appears to be no basis in the present application for an unambiguous definition of the K10 rat monoclonal antibody.
2. For the assessment of the present claim 33 on the question whether it is 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.
3. As the priority claimed for the present application is considered to be valid for the establishment of this written opinion, the theses by Dr. Vaccari and D12 are not considered as being part of the prior art.

94

TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES
PCT
INFORME DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL
(Artículo 36 y Regla 70 del PCT)

Referencia del expediente del agente o solicitante 030816WO	PARA ACTUACIONES ADICIONALES Ver notificación de Transmisión del Reporte de Examen Preliminar (Formato PCT/IPEA416)	
Solicitud Internacional No. PCT/IB03/02348	Fecha de presentación Internacional (día/mes/año) 08/05/2003	Fecha de prioridad (día/mes/año) 10/05/2002
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC C07K 16/42		
Solicitante POLONELLI, Luciano et al.		

1. Este Informe de examen preliminar internacional ha sido preparado por esta Administración encargada del Examen Preliminar Internacional y se envía al solicitante en concordancia con el artículo 36. 2. Este INFORME consta de una total de <u>9</u> hojas, incluyendo la portada ☐ Este Informe también se acompaña de ANEXOS, esto es documentos de la descripción, reivindicaciones y/o dibujos que han sido corregidos y que son la base de este Informe y/o documentos que contienen rectificaciones realizadas ante esta Administración (Ver Regla 70.16 y Sección 607 de las Instrucciones Administrativas según el PCT) Estos anexos constan de un total de _____ hojas. 3. Este Informe contiene indicaciones relativas a los siguientes aspectos: I ☒ Fundamentos del Informe II ☐ Prioridad III ☒ No se establece concepto relativo a la novedad, nivel inventivo y aplicación Industrial IV ☐ Carencia de unidad de la invención V ☒ Declaración razonada según el artículo 35(2), en relación con la novedad, nivel inventivo o aplicación Industrial; citaciones y explicaciones que soportan dicha declaración VI ☐ Ciertos documentos citados VII ☐ Ciertos defectos de la solicitud internacional VIII ☐ Ciertas observaciones respecto a la solicitud internacional
--

Fecha de presentación de la demanda 02/10/2003	Fecha de terminación de este reporte 07/09/2004
Nombre y dirección de correo de la autoridad encargada del examen preliminar Oficina de Patentes Europea D-80298 Munich Tel. + 49 89 23990 Tx.: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Funcionario Autorizado Wagner, R. Teléfono No. +49 89 2399 - 7357

Formato PCT/IPEA/409 (portada) (enero 2004)

25

I. Base del Informe

1. Respecto a los elementos de la solicitud internacional (Las hojas de reemplazo que han sido entregadas a la Oficina receptora en respuesta a la invitación bajo el Artículo 14 se refieren en este informe como "originalmente presentadas" y no se anazan a este informe ya que ellos no contienen modificaciones (Regla 70.16 y 70.17).

- ☒ La descripción:
páginas 1-41, como se presentaron originalmente
- ☒ La parte de listado de secuencias de la descripción:
páginas 1-13, como se presentaron originalmente
- ☒ Las reivindicaciones:
páginas 1-34, como se presentaron originalmente
- ☒ Los dibujos:
páginas 1/12-12/12, como se presentaron originalmente

2. Respecto al lenguaje, todos los elementos marcados anteriormente estuvieron disponibles o fueron enviados a a Administración en el lenguaje en que se presentó la solicitud internacional, a menos que se indique otra cosa en este punto.

Estos elementos estuvieron disponibles o fueron enviados a esta Administración en el siguiente lenguaje _____ el cual es:

- ☐ el lenguaje de la traducción enviada para propósitos de la búsqueda internacional (bajo Regla 23.1 (b)).
- ☐ el lenguaje de la publicación de la solicitud internacional (bajo Regla 48.3(b)).
- ☐ el lenguaje de la traducción entregada con propósitos del examen preliminar internacional (bajo Regla 55.2 y/o 55.3).

3. Respecto a cualquier secuencia de nucleótido y/o amino ácidos divulgada en la solicitud internacional, el examen preliminar internacional se llevó a cabo con base en el listado de secuencias:

- ☐ contenido en la solicitud internacional en forma escrita
- ☐ presentado junto con la solicitud internacional en forma legible por computador
- ☐ entregado posteriormente a esta Administración en forma legible por computador
- ☐ La declaración de que el listado de secuencias posteriormente entregado no va más allá de lo divulgado en la solicitud internacional originalmente presentada, ha sido entregada.
- ☐ La declaración de que la información grabada en la forma legible por computador es idéntica al listado de secuencias escrito que se ha entregado.

4. Las modificaciones han dado como resultado la cancelación de:

- ☐ la descripción, páginas _____,
- ☐ las reivindicaciones, Nos. _____,
- ☐ los dibujos, página _____.

5. ☐ Este reporte ha sido establecido como si (parte de) las modificaciones no se hubieran realizado, ya que éstas han sido consideradas como una ampliación de lo inicialmente divulgado como se indica en la Casilla Suplementaria (Regla 70.2(c)).

(Cualquier hoja de reemplazo que contenga dichas modificaciones deberá ser referida bajo el punto I y anexada a este informe.)

6. Observaciones adicionales, en caso sea necesario:

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

1. La pregunta de si la invención reivindicada parece tener novedad, nivel inventivo (que no sea obvia), o que sea aplicable industrialmente no ha sido examinada con respecto a:

- ☐ la solicitud internacional completa
☒ las reivindicaciones Nos. 1 – 10 (todas en parte), 15, 24, 25 – 34 (en parte).

Porque

- ☒ la solicitud internacional, o las mencionadas reivindicaciones Nos. 33 se relacionan con los siguientes objetos, los cuales no requieren examen preliminar internacional (*especifique*):

ver hoja aparte

- ☐ la descripción, las reivindicaciones o los dibujos (*indique los elementos particulares abajo*) o las mencionadas reivindicaciones Nos. _____ son demasiado confusas que no se puede formar ninguna opinión significativa (*especifique*):
- ☐ la descripción, o las mencionadas reivindicaciones Nos. _____ no están adecuadamente soportadas por la descripción que no se puede formar ninguna opinión significativa.
- ☒ no se ha establecido un reporte de búsqueda para las mencionadas reivindicaciones Nos. 1 – 10 (todas en parte), 15, 24, 25 – 34 (en parte)

2. No se pudo realizar un examen preliminar internacional significativo debido a fallas en el listado de nucleótidos y/o aminoácidos para dar cumplimiento con los estándares del Anexo C de las Instrucciones Administrativas:

- ☐ El formato escrito no ha sido suministrado o no cumple con los estándares.
- ☐ El formato de lectura por computador no ha sido suministrado o no cumple con los estándares.

V. Declaración motivada según el Artículo 35(2) en cuanto a la novedad, el nivel inventivo y la aplicación industrial; citas y explicaciones que apoyan esta declaración.

1. Declaración

Novedad (N)	Reivindicaciones	<u>13,14,16-23,26-29,33,34</u>	SI
	Reivindicaciones	<u>11,12,25,30-32</u>	NO
Nivel inventivo (NI)	Reivindicaciones	<u>13,14</u>	SI
	Reivindicaciones	<u>11,12,16-23,25,26,27-29,30-32,33,34</u>	NO
Aplicación industrial (AI)	Reivindicaciones	<u>11-32, 34</u>	SI
	Reivindicaciones	_____	NO

2. Citas y explicaciones

Ver hoja aparte

Referente al punto III

No establecimiento de opinión con respecto a la novedad, nivel inventivo y aplicabilidad Industrial.

- Las reivindicaciones 1 a 10 comprenden un numero extremadamente grande de posibles combinaciones. Por lo tanto dicha reivindicación no es clara y concisa (artículo 6 del PCT). No se puede deducir ninguna estructura en común de la reivindicación y no se define un único amino ácido La materia objeto de la reivindicación no esta limitada por su origen – es decir, que viene de un anticuerpo anti-idiotípico- porque si a una persona versada se le presentan 2 péptidos idénticos el/ella no es capaz de determinar si el péptido se origina de un anticuerpo preciso o no.

Dichas reivindicaciones fueron solamente buscadas con relación a la materia definida en la reivindicación dependiente 11, en la cual una cierta estructura del péptido relevante es especificado. Las secuencias definidas en la reivindicación 12 también fueron buscadas.

Dichas reivindicaciones han solamente sido buscadas en parte y por lo tanto son solamente examinadas con relación a la materia objeto buscada (regla 66.1 (e) del PCT).

- La reivindicación 15 no es clara y no es concisa (artículo 6 de PCT) porque del excesivo alto numero de posibilidades de compuestos isostéricos de los ya extremadamente altos números de alternativas en las reivindicaciones de las cuales la reivindicación depende.

La reivindicación 15 no ha sido buscada y por lo tanto no es examinada (regla 6.1 (e) del PCT).

- La reivindicación 24 comprende un numero extremadamente alto de posibles polipéptidos. Aun cuando los anticuerpos fueran definidos por las secuencias Id. Nos. 2 y 22 (ver sección 1 y notas adicionales) el número de polipéptidos posibles incluyendo un numero ilimitado de sustituciones es excesivamente alto. No se puede deducir una estructura común de la reivindicación y no se define un sólo amino ácido. Por lo tanto, la reivindicación no es clara y no es concisa (artículo 6 del PCT).
- Las reivindicaciones 25 a 34 también se refieren directamente a los polipéptidos de las reivindicación 1 a 10 y 24 y por lo tanto también fueron buscadas solo en parte. De este modo hacer referencia a los polipéptidos de las reivindicaciones 11 y 12 son examinadas (regla 66.1 (e) del PCT).
- La reivindicación 33 se relaciona con la materia objeto que es considerada por esta Autoridad que esta cubierta por las salvedades de la regla 67.1(iv) del PCT. En consecuencia, no se va a formular ninguna opinión con respecto a la aplicabilidad industrial de la materia objeto de estas reivindicaciones (artículo 34(4)(a)(i) del PCT).

Referente al punto V

Declaración motivada según el Artículo 35(2) en cuanto a la novedad, el nivel inventivo y la aplicación industrial; citas y explicaciones que apoyan esta declaración.

Se hace referencia a los siguientes documentos:

- D1: EP 1130032
- D2: WO 0047625
- D3: DE10019967
- D4: 1199565EP
- D5: WO 0026671
- D6: WO 0154723
- D7: US 5693761
- D8: Polonelli et al., Clinical and Diagnostic Lab. Immun., Mar.1997, p.142-146.
- D9: Beninatie et al., Nature Biotechnology, vol. 18, October 2000, pp. 1060-1064.
- D10: Magliani et al., Nature Biotechnology, vol. 15, Feb.1997, pp. 155-158.
- D11: Thesis. Simona Vaccari, Universita Parma, 24.02.2003
- D12: Magliani et al., Current Pharm. Biotech.vol. 4, April 2003

1. La reivindicación 11 está dirigida a un polipéptido que comprende el péptido EKVTMTCSAS y un gran número de variantes del mismo. Dicho polipéptido no es nuevo (artículo 33(2) del PCT) porque D1 revela en la reivindicación 1 (la tercera secuencia) una secuencia de polipéptido que comprende el deca-péptido de arriba. Adicionalmente el documento D7 revela en la figura 5ª un polipéptido que comprende EKVTMTCSGS y por lo tanto también cae dentro del alcance de la reivindicación 11.

2. La reivindicación 12 está dirigida a un número grande de polipéptidos que comprenden péptidos identificados por su secuencia. Sec. Id. No. 3 es la secuencia EKVTMTCSAS definida en la reivindicación 11. Por lo tanto, D1 anticipa (artículo 33(2) del PCT) también la materia objeto de la reivindicación 12.

El documento D2 (Sec.Id.No. 6, página 29) revela el péptido exacto correspondiente al CDRH1 del anticuerpo H20, identificado como Sec.Id.No. 66.

El documento D3 (figura 1, Sec.Id.No. 5) también revela un péptido identificado por la Sec.Id.No. 66.

El documento D4 (Sec.Id.No. 8) revela el péptido identificado por la Sec.Id.No. 69, la cual corresponde al CDRL1 del anticuerpo H20.

El documento D5 (CDR2 en la reivindicación 21) revela el péptido identificado por la Sec.Id.No. 69.

El documento D6 (Sec.Id.No. 5) revela el péptido identificado por la Sec.Id.No. 69.

Por lo tanto los documentos D2 a D6 anticipan la materia objeto de la reivindicación 12 (artículo 33(2) del PCT).

3. La materia objeto de las reivindicaciones 13 y 14 es nueva (artículo 33(2) del PCT) porque el arte previo no revela dichos polipéptidos. EL arte previo no da ninguna indicación que deca-péptidos, o variantes en las cuales un amino ácido es reemplazado, originando de anticuerpos anti-idiotipos, los cuales mimetizan un epítipo de una Toxina Asesina de Levadura tiene una actividad anti-hongos. Por lo tanto la materia objeto de las reivindicaciones 13 y 14 comprende un nivel inventivo (artículo 33(3) del PCT).

4. La materia objeto de las reivindicaciones 16 a 23 está dirigida a anticuerpos anti-idiotipos que mimetizan una toxina asesina de levadura. Los anticuerpos de las

reivindicaciones 19 y 20 tienen que ser definidas por su respectiva Sec.Id.No. (ver notas adicionales). La reivindicación 16 comprende una excepción con respecto al anticuerpo que aparece en su propia publicación D8. El documento D8 no revela la secuencia de K10 o un hibridoma depositado que produce K10, por lo tanto D8 no puede ser referida como que es una revelación que incapacita y por ende la excepción no es clara (artículo 6 del PCT). Como dicho el anticuerpo K10 solo está definido por características funcionales y no puede ser diferenciada de cualquier otro anticuerpo anti-idiotípico, el cual reconoce el idiotipo de un anticuerpo específico para una toxina asesina de levadura. En los documentos D9 y D10 el solicitante revela un anticuerpo anti-idiotipo llamado scFv-H6. Dicho anticuerpo puede ser idéntico con el scFv sobre el que se hace referencia en la reivindicación 19 (Sec.Id.No. 2). Sin embargo, ni D9 ni D10 posibilitan a una persona versada a producir preciso dicho anticuerpo.

Por lo tanto, la materia objeto de las reivindicaciones 16 a 23 tiene que ser considerada como que es nueva (artículo 33(2) del PCT).

El documento D8 revela en detalle (pagina 143) un método por medio del cual anticuerpos anti-idiotipo que reconocen el idiotipo de un anticuerpo que está dirigido contra una toxina asesina de *P. anomala* puede ser obtenida mediante la técnica de hibridoma. Los documentos D9 y D10 revelan los métodos, como producir un anticuerpo scFv anti-idiotipo. La producción de anticuerpos humanizados es estado del arte. Por lo tanto la materia objeto de las reivindicaciones 16, 18 – 21, 23, no envuelve un nivel inventivo (artículo 33(3) del PCT). Como el sistema de la red idiotípica es conocida de manera general, un anticuerpo dirigido contra el anticuerpo idiotípico no tiene ningún efecto sorprendente. Por lo tanto la materia objeto de la reivindicación 17 no comprende un nivel inventivo (artículo 33(3) del PCT). Como CDRs solos no tiene un efecto técnico por si solos, es decir, no se unen específicamente a un antígeno o no representan un antígeno idiotipo, las características de la reivindicación 22 no confiere un nivel inventivo sobre los anticuerpos (artículo 33(3) del PCT).

5. Los ácidos nucleicos de la reivindicación 25, hasta donde están definidos de manera clara (es decir siendo consideradas como dependientes son de las reivindicaciones 11 a 14) no son nuevas (artículo 33(2) del PCT) porque el documento D3 revela la secuencia de ácido nucleico (Sec.Id.No. 18) que codifica para el péptido identificado por la Sec.Id.No. 66 en la presente solicitud.

6. La reivindicación 26 especifica que los anticuerpos de las reivindicaciones 16 a 23 tienen que tener una actividad antimicótica. Como el método de producir anticuerpos anti-idiotipo revelado en el documento D8 involucra un paso que consiste en tamizar los anticuerpos por su actividad antimicótica, la materia objeto de la reivindicación 26 no envuelve un nivel inventivo (artículo 33(3) del PCT).

7. Los procesos de las reivindicaciones 27 a 29 hasta donde se refieren a los polipéptidos de las reivindicaciones 11 a 14 no envuelven un nivel inventivo porque la síntesis química y la formulación en una composición farmacéutica de polipéptidos conocidos (ver secciones 1 y 2 arriba) es un procedimiento estándar.

8. La materia objeto de las reivindicación 30 a 32 no es nueva (artículo 33(2) del PCT) porque el documento D6 (Sec. Id.No. 5) revela un uso medico y composiciones farmacéuticas del anticuerpo que comprende el péptido identificado por Seq. Id.No. 69 (ver también sección 1 arriba).

9. Hasta donde se hace referencia a las reivindicaciones dirigidas a polipéptidos y anticuerpos, los cuales están definidos claramente (ver sección III) la materia objeto de las reivindicaciones 33 a 34 es nueva (artículo 33(2) del PCT). Sin embargo, dicha materia objeto no envuelve un nivel inventivo (artículo 33(3) del PCT) porque el documento D8, el cual revela el método para producir el anticuerpo anti-idiotipo de la reivindicación (ver sección 4 arriba) claramente busca un uso de dichos anticuerpos para el tratamiento de candidiasis.

bservaciones Adicionales:

1. Las reivindicaciones 16 a 23 no son claras (artículo 6 del PCT) porque los anticuerpos no están definidos de manera no ambigua por la denominación interna K10, H6 o H20. Los anticuerpos H6 y H20 tienen que ser identificados por sus respectivas secuencias (Sec.Id.No. 2 y 22). Parece no haber base en la presente solicitud para una definición no ambigua de la K10 anticuerpo monoclonal de rata.

2. Para la evaluación de la presente reivindicación 33 sobre la pregunta de si es industrialmente aplicable, no existe un criterio unificado entre los Estados Contratantes del PCT. La patentabilidad puede también depender de la formulación de las reivindicaciones. La OPE, por ejemplo, no reconoce como aplicable industrialmente la materia objeto de las reivindicaciones para el uso de un compuesto en tratamiento medico, pero puede permitir, sin embargo, reivindicaciones de un compuesto conocido para su primer uso en tratamiento medico y el uso de dicho compuesto para la elaboración de un medicamento para un tratamiento medico nuevo.

3. Como la prioridad reivindicada para la presente solicitud es considerada como valida para el establecimiento de esta opinión escrita, la tesis de Dr. Vaccari y el documento D12 no son considerados como que hacen parte del estado del arte.

PATENT COOPERATION TREATY

103

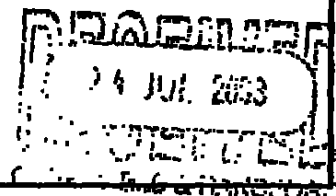
PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

MARSHALL, Cameron, John
Carpmsels & Ransford
43 Bloomsbury Square
London WC1A 2RA
United Kingdom

Date of mailing (day/month/year) 14 July 2003 (14.07.03)	IMPORTANT NOTIFICATION RECEIVED 24 JUL 2003 PCT/IB03/0234
Applicant's or agent's file reference P030616WO/CJM	
International application No. PCT/IB03/02348	International filing date (day/month/year) 09 May 2003 (09.05.03)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 10 May 2002 (10.05.02)
Applicant POLONELLI, Luciano et al	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
10 May 2002 (10.05.02)	0210783.7	GB	14 July 2003 (14.07.03)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 338-7080	Authorized officer Sonnia GARCIA MELLITI Telephone No. (41-22) 338 8919
---	---

104

POLIPÉPTIDOS RELACIONADOS CON TOXINA CON ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA Y ANTIVIRAL

Todos los documentos citados aquí se incorporan como referencia en su totalidad.

CAMPO TÉCNICO

Esta invención se encuentra en el campo de los microbiocidas y antivirales, en particular aquellos derivados de las toxinas destructoras de levadura.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las toxinas destructoras (KT) son proteínas secretadas por levaduras que son capaces de destruir otras levaduras o microorganismos que compiten en naturaleza por el mismo nicho ecológico [1]. Aunque ellas son herramientas terapéuticas atractivas, debido a su amplio espectro de actividad microbiana, ellas no son de uso práctico por su inestabilidad en el medio fisiológico del huésped así como su antigenicidad y toxicidad. En su lugar, el uso de anticuerpos anti-idiotipicos que se asemejan a los KT se ha mostrado como efectivo.

La toxina destructora de *Pichia anomala* ("PAKT") tiene un amplio espectro de actividad microbiocida contra patógenos incluyendo *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Neumocystis carinii*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Seudomonas aeruginosa*, y *Staphylococcus aureus* [2,3, 4]. Esta observación ha sido explotada mediante la generación de un anticuerpo monoclonal que neutraliza PaKT en ratones (mAb KT4) [5] cuyo idiotipo (Id) es capaz de inducir la producción de anticuerpos anti-ideotípicos (antiIds) [6,7, 8].

Estos anti ID representan la imagen interna del dominio PaKT activo y como tales ejercen sus actividades biológicas, incluyendo la unión a un receptor PaKT (KTR) de microorganismos susceptibles y amplia espectro de actividad microbiocida que traslapa aquella del PaKT (Figura 1).

Los animales experimentales en los cuales estos anticuerpos ("KTIdAb) son levantados mediante vacunación idio típica con mAb KT4 han mostrado repetidamente ser protegidos contra inducciones de actividad de mucosa o sistémica por *C. albicans* [7,8]. Existe también amplia

evidencia de susceptibilidad in vitro a KTIdAb por diversos patógenos microbianos tales como M. Tuberculosis (que incluye cepas resistentes a multidroga), P. carinii, y otros [4,9].

La teoría ideotípica (Figura 1) también predijo que los anticuerpos contra los receptores PaKT semejarían la actividad PaKT. Esto ha sido demostrado en animales y humanos durante el curso de infecciones experimentales y naturales originadas por microorganismos PaKT-sensibles [10]. Los anticuerpos anti-KTR naturales en humanos han mostrado tener actividad microbiocida in vitro contra C. albicans, M. tuberculosis, y P. carinii, para inhibir la infectividad P. carinii de ratas desnudas, y C protectoras contra transferencia pasiva in vivo, en un modelo experimental de candidiasis vaginal en ratas [4,10, 11].

Con base en estos resultados, y con el fin de obtener KTIdAb estándar en cantidades suficientes, IGM monoclonal de rata (MABKL0) y anticuerpos microbiocidas Fv de cadena simple de ratón (SCFVH6) se han obtenido [12,13]. Estos dos anticuerpos tienen fuertes efectos microbiocidas in vitro contra importantes microorganismos

patógenos que incluyen: *C. albicans* [12,13] ; *C. krusei* y *C. glabrata* (incluyendo sepas resistentes al fluconazol); *Criptococcus neoformans* ; *A. fumigatus* [14]; *M. Tuberculosis* [4]; *S. aureus*, *Enterococcus fecales*, *E. fecium*, y *Streptococcus Neumonia* (incluyendo sepas resistentes a meticilina, vancomicina-y penicilina) [15], *S. mutans*, *Leishmania major*, *L. infantum* y *Acantamoeba castellanii*. Adicionalmente, ellas mostraron actividad terapéutica específica en un modelo experimental de candidiasis vaginal en ratas mediante administración intravaginal [13]. Además, el K10 provee ser terapéutico contra neumonía por *P. carinii* en ratas infectada mediante administración con aerosol [16], y en ratones transplantados con medula espinal vaciada de células T contra aspergiliosis causada por instilación nasal [14].

Aunque se ha reportado la existencia de Scfv H6, no ha sido previamente descrito un método para su elaboración, ni lo ha sido su secuencia de aminoácido.

Es un objeto de la invención suministrar compuestos antimicrobianos y/o antivirales adicionales y mejorados.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Anticuerpos de la invención

La invención suministra un anticuerpo anti-ideotipico que reconoce el ideotipo e un anticuerpo específico para una toxina destructora de levadura, con la condición de que el anticuerpo anti-ideotipico no sea el anticuerpo monoclonal de rata K10. El anticuerpo preferiblemente tiene actividad microbiocida (por ejemplo este retiene la actividad de toxina destructora de levadura) y/o la actividad antiviral.

Un anticuerpo anti-ideotipico de la invención se puede utilizar para generar anticuerpos anti-ideotipicos adicionales (anti-anti-anti-ideotipico con respecto a la toxina destructora original). El anticuerpo anti-anti-anti-ideotipico de la invención puede a su vez ser utilizado para generar anticuerpos anti-ideotipicos adicionales (anti-anti-anti-anti-anti-idiotypic con respecto a la toxina destructora original). Así la actividad antimicrobiana de la toxina destructora se puede transferir a través de generaciones sucesivas de

anticuerpos anti-ideotipicos, y esta varias generaciones estar dentro del alcance de la invención.

Así la invención suministra un anticuerpo que reconoce el ideotipo de un anticuerpo anti-ideotipico de la invención (es decir suministra un anticuerpo anti-anti-anti-ideotipico), un anticuerpo que reconoce el ideotipo de tal anticuerpo anti-anti-anti-ideotipico (es decir un anticuerpo anti-anti-anti-anti-anti-ideotipico) etc. En general, por lo tanto, la invención suministra un anticuerpo que reconoce el ideotipo de un anticuerpo (ANTI-) n -ideotipico de la invención, en donde n es un número impar (por ejemplo 1, 3, 5, 7, 9 etc.).

Estos anticuerpos generalmente se unirán al ideotipo del anticuerpo de anti-toxina tal como el KT4 y preferiblemente tiene actividad microbocida y/o antiviral.

Para la producción de estos anticuerpos (ANTI-) n -ideotipicos, la invención suministra anticuerpos (ANTI-) m -Ideotipicos, en donde m es un número impar (por ejemplo 2, 4, 6, 8 etc.). Estos anticuerpos generalmente se unirán a la toxina destructora.

El termino 'anticuerpo' incluye cualquiera de varios anticuerpos naturales y artificiales y proteínas derivadas de anticuerpo que sean disponibles. Así el termino "anticuerpo" incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, fragmentos Fab, fragmentos, F (ab')₂, fragmentos, Fv, anticuerpos de cadena simple Fv (scFV), oligocuerpos, etc.

Para incrementar la compatibilidad con el sistema inmune de humano, se prefiere utilizar anticuerpos humanos. Como una alternativa los anticuerpos de la invención pueden ser versiones quiméricas o humanizadas de anticuerpos no humanos [por ejemplo. referencias. 17 y 18].

En anticuerpos quiméricos, las regiones constantes no humanas son sustituidas por regiones constantes humanas pero las regiones variables permanecen no humanas.

Los anticuerpos humanizados pueden ser logrados por una variedad de métodos que incluyen, por ejemplo: (1) injertar regiones complementariamente determinantes (CDRS) de la región variable no humana sobre una estructura humana ("injerto CDR"), con la transferencia adicional opcional de uno o más residuos de estructura el



anticuerpo no humano ("humanizante"); (2) transplantar dominios variables no humanos completos, pero "encubriéndolos" con la superficie similar a humana mediante el reemplazo de residuos de superficie("disfraz"). En la presente invención, los anticuerpos humanizados incluyen aquellos obtenidos mediante injertos CDR- , humanización, y disfrazamiento o regiones variables. [Por ejemplo referencias. 19 a 25].

Las regiones constantes de los anticuerpos humanizados son derivadas de inmunoglobulinas humanas. Regiones constantes de cadena pesada se pueden seleccionar de cualquiera de los cinco isótopos: a, d, e, γ o μ

Los anticuerpos humanizados o completamente humanos también se pueden producir utilizando animales transgénicos que sean trabajados con ingeniería o contengan locus de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, la referencia. 26 describe animales transgénicos que tienen un locus de Ig humano en donde los animales no producen inmunoglobulinas endógenas funcionales debido a la inactivación de los locus de cadena pesada y ligera endógena. La referencia 27 también describe huéspedes

mamíferos no primates transgénicos capaces de montar la respuesta inmune a un inmunogeno, en donde los anticuerpos tienen regiones constantes y/o variables de primate, y en donde los locus que codifican la inmunoglobulina endógena son sustituidos o inactivados. La referencia. 28 describe el uso del sistema CRE/LOX para modificar los locus de inmunoglobulina en un mamífero, tales como reemplazarlos todo o porciones de región constante o variable para formar una molécula de anticuerpo modificado. La referencia 29 describe huéspedes de mamíferos no humanos que tiene locus IG endógenos inactivados y locus IG humanos funcionales. La referencia. 30 describe métodos para elaboración de ratones transgénicos en los cuales a los ratones les falta la cadena pesada endógena, y expresan un locus de inmunoglobulina exógena una o más regiones constantes xenogeneicas.

Los anticuerpos de la invención pueden incluir un marcador. El marcador puede detectable directamente, tal como un marcador radioactivo o fluorescente. Alternativamente, el marcador puede ser detectable indirectamente, tal como una encima cuyos productos son detectables (por ejemplo luciferasa, β -Galactosidasa,

peroxidasa etc.) o un compañero de unión atal como biotina y avidina o etreptavidina.

Los anticuerpos de la invención se pueden unir a un soporte sólido.

Los anticuerpos de la invención se pueden producir mediante cualquier medio adecuado (por ejemplo mediante expresión recombinante).

Los anticuerpos preferidos de la invención son anticuerpos Fv de cadena simple. Estos pueden producir mediante unión de regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo monoclonal de partida de interés, o se pueden identificar mediante la selección de una librería SCFV (por ejemplo mediante despliegue de fagos). La referencia 31 describe un método de despliegue de fago para producción de anticuerpos anti-ideotipicos scFv.

Los anticuerpos scFv particularmente preferidos de la invención son H6 (ID DE SEC 1 & 2) y H20 (ID DE SEC 21 & 22). Los anticuerpos que comprenden uno o más (por ejemplo 2,3, 4,5 o 6) de los CDRs de H6 y H20 son también preferidos, como son los derivados de H6 y H20 en los

114

cuales: (a) uno o más (por ejemplo 2,3, 4,5, 6,7, 8,9, 10,11,12,13,14,15) residuos de estructuras son sustituidos con otros aminoácidos; (b) la secuencia ligadora (ID DE SEC 30) se reemplaza con una secuencia ligadora alternativa; (c) la secuencia "E-tai"; (ID DE SEC 59) se omite o se reemplaza. Las proteínas de fusión que comprenden H6 o H20, o los derivados (a) a (c), en el N-o C-terminal también son útiles. Los CDRs H6 y H20 pueden contener opcionalmente 1,2,3 o 4 sustituciones de aminoácido.

Otros anticuerpos preferidos de la invención no son anticuerpos humanizados. Particularmente, los anticuerpos humanizados preferidos de la invención comprenden uno o más (por ejemplo 2,3, 4,5 o 6) CDRs de H6, H20 o K20.

Los Polipéptidos y los fragmentos de anticuerpo

Se ha encontrado de manera sorprendente que los fragmentos cortos (por ejemplo los fragmentos 10meos) de las regiones variables de los anticuerpos anti-ideotípicos de la invención pueden retener los anticuerpos de actividad microbiocida similar a KT. Aún más sorprendentemente, los L-aminoácidos en estos



fragmentos pueden ser reemplazados con D-aminoácidos sin remover la actividad microbiocida, y los aminoácidos dentro de los fragmentos pueden ser sustituidos con otros aminoácidos sin remover la actividad microbiocida. Además, los fragmentos se ha encontrado que poseen actividad antiviral.

Así la invención suministra un polipéptido que comprende: al menos una secuencia de aminoácido que es un fragmento de al menos x aminoácidos de la secuencia de aminoácido de una región variable de un anticuerpo de la invención opcionalmente con y aminoácido (s) dentro de dichos x aminoácidos siendo sustituidos por diferentes aminoácido (s). El polipéptido preferiblemente tiene actividad microbiocida y/o antiviral.

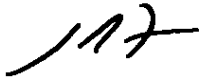
El polipéptido preferiblemente consiste de no más de 250 aminoácidos (por ejemplo no más de 225, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 95, 90, 80, 70, 60, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 o aún 5 aminoácidos). Los polipéptidos que consisten de entre 5 y 90 aminoácidos son los preferidos (por ejemplo consisten de entre 5 y 80, 5 y 70, 5 y 60

aminoácidos etc.). Los particularmente preferidos son los polipéptidos que consisten de entre 8 y 25 aminoácidos.

El polipéptido preferiblemente consiste de al menos 3 aminoácidos (por ejemplo al menos 4,5, 6,7, 8,9, 10, 11, 12, 13,14, 15,16, 17,18, 19,20, 25,30, 35,40, 45,50, 55,60, 70,80, 90,100, 125, 150, 175, o a la menos 200 aminoácidos).

El valor de X es preferiblemente al menos 3 (por ejemplo al menos 4,5, 6,7, 8,9, 10, 11, 12,13, 14,15, 16,17, 18, 19,20, 25,30, 35,40, 45, 50, 55,60, 70,80, 90,100, 125,150, 175, o al menos 200).

El valor de Y será menor que x y, dependiente de el valor de X, este puede ser X-1, X-2, X-3, X-4, X-5, X- 6, X-7, X-8, x-9, X-10, X-L L, X-12, X-13, X-14, o X-15. Los valores preferidos de y 1, 2,3, 4 y 5. Los aminoácidos ya son típicamente sustituidos por A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o. Cada una de las sustituciones y puede ser igual o diferente que las otras. La sustitución es preferiblemente por G o, más preferiblemente, por A [32, 33]. El aminoácido sustituyente puede ser un aminoácido L-o D pero, donde



los otros aminoácidos x todos comparten una configuración estero simple (es decir todos los -o todos L-), este preferiblemente tiene esas estereo configuraciones (aunque, por supuesto, G no tiene estereoisómeros).

Donde el fragmento de los aminoácidos x incluyen una C, el valor de Y es preferiblemente al menos 1 de tal forma que la C es sustituida por otro aminoácido tal como ese. La remoción de C de esta manera mejora la resistencia a la oxidación.

El fragmento de al menos x aminoácidos preferiblemente incluye al menos z aminoácidos de un CDR dentro del anticuerpo. El valor de Z es preferiblemente al menos 1 (por ejemplo 2,3, 4,5, 6,7, 8,9 o 10 o más).

El polipéptido puede comprender más de una secuencia de aminoácido (por ejemplo 2,3, 4,5, 6) cada una de las cuales es un fragmento de al menos x aminoácidos (por ejemplo ID DE SEC 25). En tales polipéptidos, el valor de x en cada fragmento puede ser igual o diferente, el valor de y dentro de cada x puede ser igual o diferente, y el valor de z dentro de cada x puede ser igual o diferente. Los fragmentos pueden estar unidos mediante péptidos

118

ligadores tales como las secuencias de ligado ricas en glicina (por ejemplo ID DE SEC 30).

La invención también suministra un polipéptido que tiene la formula $\text{NH}_2\text{-A-B-C-COOH}$, donde: A es una secuencia de polipéptido que consiste de A aminoácidos; C es una secuencia de polipéptido que consiste de C aminoácidos; B es una secuencia de polipéptido que es, como se definió anteriormente, un fragmento de al menos x aminoácidos de la secuencia de aminoácido de una región variable de un anticuerpo de la invención, opcionalmente con y aminoácidos dentro de dichos x aminoácidos siendo sustituidos por diferente aminoácido (s). El polipéptido preferiblemente tiene actividad microbicida y/o antiviral.

El valor de a es generalmente al menos 1 (por ejemplo al menos 2,3, 4,5, 6,7, 8,9, 10, 11, 12,13, 14,15, 16,17, 18,19, 20,21, 22,23, 24,25, 26,27, 28,29, 30,35, 40,45, 50,60, 70,80, 90,100, 150,200, 250, 300,350, 400,450, 500 etc.). El valor de C es generalmente al menos 1 (por ejemplo al menos 2,3, 4,5, 6,7, 8,9, 10, 11, 12,13, 14,15, 16,17, 18,19, 20,21, 22,23, 24,25, 26,27, 28,29, 30,35, 40,45, 50,60, 70, 80,90, 100,150, 200,250,

300,350, 400,450, 500 etc.). El valor de a+c es al menos 1 (por ejemplo al menos 2, 3,4, 5,6, 7,8, 9,10, 11, 12,13, 14, 15, 16,17, 18,19, 20,21, 22,23, 24,25, 26,27, 28,29, 30,35, 40,45, 50,60, 70,80, 90,100, 150,200, 250,300, 350,400, 450,500 etc.). se prefiere que el valor de a+c sea máximo 1000 (por ejemplo máximo 900,800, 700,600, 500,450, 400,350, 300,250, 200,190, 180,170, 160,150, 140,130, 120,110, 100,90, 80,70, 60,50, 40,30, 25,20, 19,18, 17,16, 15,14, 13,12, 11, 10,9, 8,7, 6,5, 4,3, 2).

La secuencia de aminoácido de-A-típicamente comparte menos de m% de identidad de secuencia con los aminoácidos A que son N-terminales de la secuencia-B-en una región variable de un anticuerpo de la invención (por ejemplo in ID DE SEC 2), y la secuencia de aminoácido de-C-típicamente comparte menos de n% de la secuencia de identidad con los aminoácidos c que son C-terminal de secuencia-B-en una región variable de un anticuerpo de la invención (por ejemplo en la ID DE SEC 2).en general, los valores de m y n son ambos 60 o menos (por ejemplo 50,40, 30,20, 10 o menos). Los valores de m y n pueden ser iguales o diferentes uno del otro.

El polipéptido puede comprender un mimotopo de una toxina de estructura de levadura.

Los polipéptidos preferidos comprenden la secuencia AA1-AA2-AA3-AA4-AA5-AA6-AA7-AA8-AA9-AA10, en donde: cada A₁... A₁₀ es independientemente un -aminoácido D-o L; AA₁ es E, A o G; AA₂ es K, A o G; AA₃ es V, A o G; AA₄ es T, A o G; AA₅ es M, A o G; AA₆ es T, A o G; AA₇ es C, S, A o G; AA₈ es S, A o G; AA₉ es A o G; y AA₁₀ es S, A o G; siempre y cuando no más de p de AA₁, AA₂, AA₃, AA₄, AA₅, AA₆, AA₇, AA₈, AA₉, y AA₁₀ sean A; y siempre y cuando no más de q de AA₁, AA₂, AA₃, AA₄, AA₅, AA₆, AA₇, AA₈, AA₉, y AA₁₀ son G. El valor de p es 1,2,3 o 4, y es preferiblemente 1 o 2. El valor de Q es 0,1 o 2 y es preferiblemente 0 (es decir sin residuos de glicina) o 1.

Los polipéptidos particularmente preferidos comprenden de secuencias de aminoácido ID DE SEC: 3,4, 5,6, 7,8, 9,10, 11, 12,14, 15,16, 17,18, 19,20, 23,24, 25,26, 27,32, 33,34, 35,36, 37,38, 39,40, 41, 42,43, 44,45, 46,47, 48,49, 50,51, 52,53, 54,55, 56,57, 58,60, 61,62, 63,64, 65,66, 67,68, 69, 70 & 71, con constituyentes de aminoácidos en las configuraciones D-y/o L. La ID DE SEC 3,4, 23,27 y 33 son las más preferidas.

Para referencia, los valores de x, y y z para varios de estas secuencias de polipéptido son como sigue:

ID de Sec.	x	y	z
3	10	0	3
4	10	1	3
5	10	1	3
6	10	1	3
7	10	1	3
8	10	1	3
9	10	1	3
10	10	1	3
11	10	1	3
12	10	1	3
14	9	1	2
15	8	1	1
16	7	1	0
17	6	1	0
18	5	1	0
19	4	1	0
20	3	1	0
23	10	2	3
24	10	0	3
26	15	0	8
27	9	0	8
32	10	2	3
33	10	2	3

los fragmentos microbiocidas y/o antivirales adicionales se pueden identificar al seleccionar paneles de fragmentos de péptido traslapantes una vez que la secuencia de un anticuerpo anti-ideotípico (por ejemplo H6, H20, K20) es conocida por ejemplo al utilizar un método PepScan [34]. Los fragmentos traslapantes 4meros, 5meros, 6meros, 7meros, 8meros, 9meros, 10meros, 11 Meros, 12meros, 13meros etc. Se pueden ensayar para su capacidad microbiciada sin dificultad por ejemplo utilizando ensayos in vitro descritos en los ejemplos de aquí.

Los Polipéptidos de la invención pueden ser lineales, ramificados o cíclicos [35] pero ellos son preferiblemente cadenas lineales de aminoácidos. Donde los residuos de cisteína están presentes, los polipéptidos de la invención pueden estar ligados a otros polipéptidos por vía de puentes disulfuro (y, in particular, ligados a otros polipéptidos de la invención para formar homodímeros o heterodímeros). Los polipéptidos de la invención pueden comprender L-aminoácidos y/o D-aminoácidos. La inclusión de D-

aminoácidos se prefiere con el fin de conferir resistencia a las proteasas de mamífero.

Producción de Polipéptido

Los polipéptidos de la invención se pueden producir mediante varios medios.

Un método preferido para la producción involucra la síntesis química in vitro [36,37]. La síntesis de péptido de fase sólida es particularmente preferida, tal como los métodos basados en química t-Boc o Fmoc [38]. La síntesis enzimática [39] también se puede utilizar en parte o completamente.

Como una síntesis alternativa a la química, la síntesis biológica se puede utilizar por ejemplo los polipéptidos se pueden producir mediante traducción. Esto se puede llevar a cabo in vitro o in vivo. Los métodos biológicos están en general restringidos a la producción de polipéptidos basados en L-aminoácidos, pero la manipulación de la maquinaria de traducción (por ejemplo de las moléculas aminoacil-tRNA) se pueden utilizar para permitir la introducción D-aminoácidos (o de otros

aminoácidos no naturales, tales como yodotirosina o Methyلفenylalanina, azidohomoalanina, etc.) [40]. donde los D-aminoácidos están incluidos en los polipéptidos de la invención, sin embargo, se prefiere utilizar síntesis química. Detalles adicionales sobre la expresión de polipéptido son dados adelante.

Para facilitar la síntesis biológica de péptidos, la invención suministra ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de la invención. La invención también suministra ácido nucleico que codifica un anticuerpo de la invención.

El ácido nucleico puede ser ADN o ARN (o híbridos de estos), o sus análogos, tales como aquellos que contiene estructuras modificadas (por ejemplo fosforotioatos) o ácidos nucleicos péptidos (PNA). Estos pueden ser de hebra simple (por ejemplo MARN) o de hebra doble, y la invención incluye tanto hebras individuales de ácidos nucleicos de hebra doble (por ejemplo para propósitos de contra sentido, iniciación o sondeo). Estos pueden ser lineales o circulares. Estos pueden ser marcados. Estos pueden estar unidos a un soporte sólido.

El ácido nucleico, de acuerdo con la invención puede, por supuesto, ser preparado de muchas maneras, por ejemplo mediante síntesis química (por ejemplo síntesis fosforamidita de ADN) en todo o en parte, mediante digestión de nucleasa de moléculas más largas, mediante ligación de moléculas más cortas, de bibliotecas geonómicas o de CADN, mediante el uso de polimeasas etc.

La invención suministra vectores (por ejemplo plasmidos) que comprenden ácido nucleico de la invención (por ejemplo vectores de expresión y vectores de clonación) y células huéspedes (prokarióticas o eucarióticas) transformadas con tales vectores.

Estos vectores también se pueden utilizar para inmunización de ácido nucleico [por ejemplo referencias. 41,42, 43,44, 45 etc.]. Los Péptidos pueden ser expresados in vivo de esta manera, como lo pueden ser los anticuerpos terapéuticos. También es posible expresar idiotopos (por ejemplo el idiotopo KT4) para elicitar anticuerpos anti-idiotípicos de la invención en un paciente in vivo.

Las células huésped que contienen ácido nucleico de la invención y que expresan polipéptido o anticuerpo de la invención se pueden utilizar como vehículos de suministro por ejemplo bacterias comensales [46]. esto es particularmente útil para suministrar superficies de mucosa.

La toxina destructora de levadura.

Las toxinas destructoras fueron originalmente identificadas en *Saccharomyces cerevisiae* [47] y desde entonces han sido identificadas en otros géneros de levaduras que incluyen *Pichia* (tales como *P. anómala*, *P. kluyveri* y *P. farinosa*), *Hanseniaspora* (tales como *H. UVARUM*), *Williopsis* (tal como *W. Mrakii*), *Candida* (tal como *C. Maltosa*), *Debaryomyces* (tal como *D. hansenii*), *Schwanniomyces* (tal como *S. occidentalis*), *Cryptococcus* (tal como *C. HUMICOLA*), *TORULOPSIS* (tal como *T. glabrata*), *Ustilago* (tal como *U. maydis*), *Zygosaccharomyces* (tal como *Z. Bailii*) y *Kluyveromyces* (tal como *K Lactis* y *Kphaffii*).

Cualquiera de estas varias toxinas se puede utilizar con la presente invención. Las toxinas preferidas son (a)

aquellas con amplio rango de actividad microbiocida y (b) aquellas de Pichia. Una toxina particularmente preferida es la toxina destructora de Pichia anómala ("PAKT").

Actividad Microbicida

El polipéptido o anticuerpo de la invención preferiblemente tiene actividad microbiocida.

Preferiblemente, este tiene actividad anti-micótica y/o actividad anti-bacterial. La actividad anti-bacterial puede ser contra bacterias que Gram negativas o Gram-positivas.

Más preferiblemente, este tiene actividad contra un microbio que tiene una pared celular basada en Glucano.

Los Microbios que son susceptibles a los polipéptidos y anticuerpos de la invención incluyen bacterias, hongos y protozoos, e incluyen, pero no están limitados a: especies de Candida, tal como C. albicans ; especies de Cryptococcus, tales como C. neoformans ; especies de Enterococcus, tal como E. faecalis ; especies de Streptococcus, tal como S. Neumonia, S. Mutans, S.

Agalactie y *S. piogenes* ; especies de *Leishmania*, tales como *L. major* y *L. infantum* ; especies de *Acantomebas*, tales como *A. castellani* ; especies de *Aspergillus*, tal como *A. Fumigatus* ; especies de *neumocistis*, tal como *P. carinii* ; especies de *Micobacterium*, tal como *M. tuberculosis* ; especies de *Pseudomonas*, tal como *P. aeruginosa* ; especies de *Stafylococcus*, tal como *S. aureus* ; especies de *Salmonella*, tal como *S. Tyfimurium*; y especies de *Escheriquia*, tal como *E. coli*.

Actividad Antiviral

El polipéptido o anticuerpo de la invención preferiblemente tiene una actividad antiviral.

Preferiblemente este tiene actividad antiviral contra los virus humanos, tal como un mixovirus (por ejemplo un orthomixovirus) o retrovirus (por ejemplo del Lentivirus).

Los virus que son susceptibles a los polipéptidos y anticuerpos de la invención incluyen, pero no están limitados a: virus de la influenza (A o B), virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1, HIV-2, HIV-0), virus

respiratorio sincital (RSV), virus de la fiebre amarilla, etc.

Diseño de droga y péptidomiméticos

Los polipéptidos de la invención son microbiocidas y antivirales útiles en su propio derecho. Sin embargo, ellos pueden ser refinados para mejorar la actividad microbicida y/o antiviral (general o específica) o mejorar las características farmacológicamente importantes tales como bio-disponibilidad, toxicología, metabolismo, farmacocinéticas etc. Los polipéptidos pueden por lo tanto ser utilizados como compuestos conductores para investigación y refinamiento refinamiento posteriores.

Los Polipéptidos de la invención pueden ser utilizados para diseñar moléculas péptidomiméticas [por ejemplo referencias. 48 a 53] con actividad microbicida y/o antiviral. Estos típicamente serán isostéricos con respecto a los polipéptidos de la invención pero les faltara uno o más de sus uniones péptido. Por ejemplo, la estructura de los péptidos puede ser reemplazada por una

estructura de no péptido aunque reteniendo cadenas laterales de aminoácido importantes.

Las moléculas péptidomiméticas pueden comprender aminoácidos de azúcar [54]. Los Péptoides pueden ser utilizados.

Para ayudar a los diseños de moléculas péptido miméticas, un fármaco foro (por ejemplo una colección de características químicas de restricciones 3D que expresan características específicas responsables de la actividad) se pueden definir en péptidos KM. El fármaco foro preferiblemente incluye características accesibles a la superficie más preferiblemente que incluyen donadores y aceptadores de en lace de hidrógeno, grupos, Cargados/Ionizables, y/o parches hidrófobos. Estos pueden ser pesados dependiendo de su importancia relativa en la actividad confiriente para [55].

Los fármaco foros se pueden determinar utilizando software tales como Catalyst (que incluye HypoGen o HipHop) [56], CERIOUS², o contruidos a mano de una conformación conocida de a polipéptido de la invención. El fármaco foro se puede utilizar para seleccionar

librería estructurales, utilizando un programa tal como Catalyst. El programa CLIX [57] también se puede utilizar, que busca las orientaciones de moléculas candidatas en las bases de datos estructurales que producen coincidencia espacial máxima con grupos químicos que interactúan con el receptor.

La superficie de unión del farmacofore se puede utilizar para mapear las posiciones de interacción favorables para los grupos funcionales (por ejemplo protones, grupos hidroxilo, grupos amino, grupos, hidrófobos) o fragmentos de moléculas pequeñas. Los compuesto pueden entonces ser diseñados de novo en los cuales los grupos funcionales relevantes están localizados sustancialmente la misma relación espacial que los polipéptidos de la invención.

Los grupos funcionales se pueden ligar en un compuesto simple utilizando fragmentos de puente con el tamaño correcto y la geometría o estructuras que pueden soportar los grupos funcionales en orientaciones favorables, suministrando de está manera un compuesto péptidomimético de acuerdo con la invención. Aunque el ligado de los grupos funcionales de está manera se puede hacer manualmente, quizás con la ayuda de software tal como

Quanta o Sybyl, las aproximaciones de diseño automatizadas o semiautomatizadas de novo también están disponibles tales como:

-MCSS/HOOK [58,59, 56], los cuales enlazan múltiples grupos funcionales con moldes moleculares tomados de una base de datos.

-LUDI [60, 56], que computa los puntos de interacción que idealmente serían llevados por un ligando, ubica fragmentos en el sitio de unión con base en su capacidad para interactuar con el receptor y entonces los conecta para producir un ligando.

- MCDLNG [61], que llena un sitio de unión de receptor con una disposición de paquete cerrado de átomos genéricos y utiliza un procedimiento montecarlo para variar aleatoriamente los tipos de átomo, las posiciones, las disposiciones de unión y otras propiedades.

- GROW [62], que inicia con un fragmento "semillas" (ubicado manual o automáticamente) y crece el ligando hacia fuera.

- SPROUT [63], serie que incluye módulos para: identificar uniones de hidrógeno favorables y regiones hidrófobas con un bolsillo de unión (modulo Hippo); seleccionar grupos funcionales y ubicarlos en sitios objetivos para formar fragmentos de partida para generación de estructuran (Elefant) ; generar esqueletos que satisfagan las restricciones esteritas del bolsillo de unión al hacer crecer fragmentos espaciadores sobre los fragmentos de inicio y luego conectar las partes resultantes de esqueletos(SPIDeR); sustituir heteroátomos en los esqueletos para generar moléculas con propiedades electroestáticas que sean complementarias a aquellas del sitio de receptor (MARABOU). Las soluciones pueden ser agrupadas y calificadas utilizando un modelo aligeitor.
- CAVEAT [64], que diseñan unidades ligadoras para constreñir las moléculas acilicas.
- LEAPFROG [65], que evalúa los ligandos para hacer pequeños cambios estructurales paso a paso y evaluando rápidamente la energía de unión del nuevo compuesto. Los cambios son mantenidos o descartados con base en la energía de unión alterada, y las estructuras evolucionan

para implementar la energía de interacción con el receptor.

- GROUPBUILD [66], que utiliza una librería de moldes orgánicos comunes y una descripción de campo de fuerza implica completa de interacciones no unidas entre un ligando y receptor para construir ligandos que tengan estructura químicamente razonable y tenga propiedades estéricas y electroestáticas complementarias a l sitio de unión de receptor.

- RASSE [67]

Estos métodos identifican compuestos microbicidas. Estos compuestos pueden ser diseñados de novo, pueden ser compuestos conocidos, o pueden estar basados en compuestos conocidos. Los compuestos pueden ser microbicidas y/o antivirales ellos mismos, o ellos pueden ser prototipos que se pueden utilizar para refinamiento farmacéutico ulterior (es decir compuestos conductores) con el fin de mejorar la afinidad de unión u otras características farmacológicamente importantes (por ejemplo bio-disponibilidad, toxicología, metabolismo, farmacocinética etc.).

la invención suministra así : (i) un compuesto identificado utilizando estos métodos de diseño de droga; (ii) un compuesto identificado utilizando estos métodos de diseño de droga, para uso como farmacéutico ; (iii) el uso de un compuesto identificado utilizando estos métodos de diseño de droga en la elaboración de un microbicida y/o un antiviral ; y (iv) un método para tratar a un paciente con una infección microbicida o viral, que comprende administrar una cantidad efectiva de un compuesto identificado utilizando estos métodos de diseño de droga.

Así como son compuestos individualmente útiles, los ligandos identificados en cílico por las técnicas de diseño basadas en estructura también se pueden utilizar para sugerir librerías de compuestos para métodos de selección "tradicional" in vitro o in vivo. los motivos farmacéuticos importantes en los ligandos pueden ser identificados y semejados en las librerías de compuestos (por ejemplo librerías combinatorias) para la selección de actividad microbicida y/o antiviral.

Composiciones farmacéuticas

La invención suministra una composición farmacéutica que comprende (a) polipéptidos, péptidomiméticos, ácidos nucleicos y/o anticuerpos de la invención y (b) un portador farmacéutico.

El componente (a) es el ingrediente activo de la composición y este está presente en una cantidad terapéuticamente efectiva es decir una cantidad suficiente para inhibir el crecimiento microbial / viral superviviente en un paciente y preferiblemente una cantidad suficiente para eliminar la infección microbiana. La cantidad precisa efectiva para un paciente dado dependerá de su tamaño y salud, la naturaleza y extensión de la infección, y la composición o combinación de las composiciones seleccionadas para la administración. La cantidad efectiva se puede determinar mediante experimentación de rutina y está dentro del juicio del médico. Para los propósitos de la presente invención, una dosis efectiva generalmente será de aproximadamente 0,01. MG/KG a aproximadamente 5 mg/kg, o aproximadamente 0.01 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg o aproximadamente 0.05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg.

Las composiciones farmacéuticas basadas en polipéptidos, anticuerpos y ácidos nucleicos son bien conocidos en la técnica. Los polipéptidos pueden estar incluidos en la composición en la forma de sales y/o esteres.

El portador (b) puede ser cualquier sustancia y lo induce en si mismo la producción de anticuerpos dañinos para el paciente que recibe la composición, y que puede ser administrada sin toxicidad indebida. Los portadores adecuados pueden ser macromoléculas grandes, lentamente metabolizadas tales como proteínas, polisacáridos, ácidos poli lácticos, ácidos poliglicolicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácido, y partículas de virus inactivas. Tales portadores son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Los portadores farmacéuticamente aceptables pueden incluir líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Las sustancias auxiliares tales como los agentes humectantes y emulsificantes, las sustancias amortiguadoras de pH, y similares, también puede estar presentes en tales vehículos. Los liposomas son portadores adecuados. Una discusión completa de los portadores farmacéuticos está disponible en la re ref. 68.

Las infecciones virales y microbidas afectan varias áreas del cuerpo y así las composiciones de la invención se pueden preparar en varias formas. Por ejemplo, las composiciones se pueden preparar como inyectables bien sea como soluciones o suspensiones líquidas. Las formas sólidas adecuadas para suspensiones en, vehículos líquidos antes de la inyección también se pueden preparar. La composición puede ser preparada para la administración tópica por ejemplo en un ungüento crema o polvo. La composición es preparada para administración oral, por ejemplo, como una tableta o cápsula, o una melaza (opcionalmente saborizada). La composición se puede preparar para administración pulmonar por ejemplo como un inhalador, utilizando un polvo o rociado fino. La composición puede ser preparada como supositorio o pesario. La composición puede ser preparada para administración nasal, oral u ocular, por ejemplo como gotas, o como polvo [por ejemplo 69].

La composición puede estar incluida en lavados de boca. La composición puede ser Liofilizada.

La composición farmacéutica es preferiblemente estéril. Es preferiblemente libre de pirógeno. Es preferiblemente

amortiguada por ejemplo entre pH 6 y pH 8, generalmente alrededor de pH 7.

La invención también proporciona un dispositivo de suministro que contiene una composición farmacéutica de la invención. El dispositivo puede ser, por ejemplo, una jeringa o un inhalador.

Las composiciones de la invención pueden ser usadas en conjunto con anti-fungosos. Conocidos. Los anti- Fungosos adecuados incluyen, pero no están limitados a, azoles (por ejemplo fluconazol, itraconazol), polienos (por ejemplo amfotericina B), flucitosina, y inhibidores de epoxidasa esqualina (por ejemplo terbinafina) [ver también referencias 70]. Las composiciones también se pueden utilizar en conjunto con antivirales conocidos por ejemplo inhibidores de proteasa HIV, 2', 3'-Dideoxynucleosido (por ejemplo DDC, DDI), 3'-azido-2', 3'-dideoxynucleosidos (AZT), 3'-fluoro-2', 3'-dideoxynucleosidos (FLT), 2', 3'-didehidro-2', 3'-Dideoxynucleosidos (por ejemplo D4C, D4T) y derivados carbocíclicos de estos (por ejemplo carbovir), 2'-fluoro-ara-2', 3'-dideoxynucleosidos, derivados de 1,3-dioxolano (por ejemplo 2', 3'-dideoxil-3'-thiacitidina),

análogos de oxetanocina y derivados carbocíclicos de estos (por ejemplo CYCLOBUT-G) y los derivados 9- (2-fosfonilmethoxiethyl) adenina (PMEA) y 9- (3-FLUORO-2-fosfonilmethoxipropil) adenina (FPMPA) los derivados, tetrahidro-imidazol [4,5, 1-JK] [1, 4] - benzodiazepin-2 (1H) ona (TIBO), 1-[(2-Hidroxiethoxi)-METHYL]-6-(fenyltio) timina (HEPT), dipirido [3,2-b : 2', 3'-E]-[1, 4] diazepin-6-ona (nevirapina) y Piridin-2 (1H) ona, 3TC, etc.

Los tratamiento médicos y los usos

La invención suministra anticuerpos, anticuerpos, polipéptidos, péptidomiméticos o ácido nucleico de la invención para uso como un medicamento. La invención también suministra un método para tratar a un paciente que sufre de una infección microbiana y/o viral que comprende administrar al paciente una composición farmacéutica de la invención. La invención también suministra el uso de anticuerpos, polipéptidos, péptidomiméticos o ácidos nucleicos de la invención en la elaboración de un medicamento para tratar a un paciente.

El paciente es preferiblemente un humano. El humano puede ser un adulto, o, preferiblemente un niño. El humano puede ser inmunocomprometido.

Estos usos y métodos son particularmente útiles para tratar infecciones de: especies de *Candida*, tales como *C. albicans* ; especies de *Cryptococcus*, tales como *C. neoformans* ; especies de *Enterococcus*, tales como *E. faecalis* ; especies de *Streptococcus*, tales como *S. Neumonia*, *S. Mutans*, *S. Agalactiae* y *S. Piogenes* ; especies de *Leishmania*, tal como *L. major* y *L. infantum* ; especies de *Acantomeba*, tal como *A. castellani* ; especies de *Aspergillus*, tal como *A. Fumigatus* y *A. Flavus* ; especies de *neumocistis*, tal como *P. carinii* ; especies de *Micobacterium*, tal como *M. Tuberculosis* ; especies de *Pseudomonas*, tal como *P. aeruginosa* ; especies de *Staphylococcus*, tal como *S. aureus* ; especies de *Salmonella*, tal como *S. tifimurium* ; especies de *Coccidioides* tales como *C. Immitis* ; especies de *Trichofiton* tal como *T. verrucosum* ; especies de *Blastomices* tal como *B. dermatidis* ; especies de *Histoplasma* tal como *H. capsulatum* ; especies de *Paracoccidioides* tales como *P. brasiliensis* ; especies de *Pithium* tales como *P. insidiosum* ; y especies de

Esqueriquia, tal como E. Coli. Ellos también son útiles para tratar infecciones de: virus de influencias y HIV.

Los usos y métodos son particularmente útiles para tratar enfermedades que incluyen pero no se limitan a: candidosis, aspergiliosis, criptococcosis, dermatomycosis, esporotricosis y otras micosis subcutáneas, blastomycosis, histoplasmosis, coccidiomycosis, paracoccidiomycosis, neumocistosis, ubrera, tuberculosis, micobacteriosis, infecciones respiratorias, fiebre escarlata, neumonía, impetigo, fiebre reumática, sepsis, septicemia, Leishmaniasis cutánea y Visceral, acantomebiasis Cornea, keratitis, fibrosis quística, fiebre tifoidea, gastroenteritis y síndrome hemolítico-urémico, gripe y sida. La actividad Anti-C. albicans es particularmente útil para tratar infecciones de pacientes con Sida.

La eficacia del tratamiento puede ser ensayada al monitorear la infección microbiana /viral después de la administración de la composición farmacéutica de la invención.

Las composiciones de la invención serán generalmente administradas directamente a un paciente. El suministro directo puede ser logrado mediante inyección parenteral (por ejemplo Subcutánea, Intraperitoneal, intravenosa, intramuscularmente, o al espacio intersticial de un tejido), o por administración rectal, oral, vaginal, tópica, Transdermal, ocular, nasal, aural, o pulmonar. La administración por inyección o intranasal es la preferida.

El tratamiento de dosis puede ser un esquemas de dosis simple o un esquema de dosis múltiple.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden utilizar Profilácticamente por ejemplo en una situación donde el contacto con microbios se espera y donde el establecimiento de la infección va a ser prevenido. Por ejemplo, la composición puede ser administrada antes de cirugía.

Expresión de Polipéptido y otras técnicas generales

La práctica de la presente invención empleara, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de

biología molecular, microbiología, ADN, recombinante, e inmunológica, que están dentro de la técnica. tales técnicas son explicadas completamente en la literatura, por ejemplo Sambrook Molecular Cloning ; A Laboratory Manual, Second Edition (1989) ; DNA Cloning, Volumes I y ii (D. N GLOVER ED. 1985); Oligonucleotide synthesis (M. J. Gait ed, 1984) ; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984) ; Transcription y Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984) ; Animal cell culture (R.I. Freshney ed. 1986) ; Immobilized Cells y Enzymes (IRL Press, 1986) ; B. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984) ; the methods in enzymology series (Academic Press, INC.), especially volumes 154 & 155 ; Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. H. Miller y M. P. Calos eds. 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Mayer y Walker, eds. (1987), Immunochemical Methods in Cell y Molecular Biology (Academic Press, London); Scopes, (1987) Protein Purification: Principles y Practice, Second Edition (Springer-Verlag, N. Y.), y Handbook of Experimental immunology, volumes I-IV (Weir & Blackwell eds 1986).

Las abreviaturas estándar para los nucleótidos y los aminoácidos son utilizadas en está especificación:

Nucleotidos

A Adenina C Citosina G Guanina T Timina

U Uracilo

Códigos de nucleótidos degenerados en adición a los cinco
códigos anteriores:

N cualquiera (A/C/G/T) R puRina (G/A) Y pYrimidina (T/C)
K Keto (G/T) M aMino (A/C) S "Strong" fuerte (G/C) W
"Weak" débil (A/T) B no A (C/G/T) D no C (A/G/T) H no G
(A/C/T) V no T (A/C/G)

Amino ácidos

A Alanina C Cysteina D Aspartato E Glutamato F
phenilalanina G Glycina H Histidina I Isoleucina K Lysina
L Leucina M Metionina N Asparagina P Prolina Q Glutamina
R Arginina S Serina T Tirosina V Valina W Tryptophan Y
Tyrosina

La invención suministra un polipéptido o ácido nucleico
que comprende o consiste de cualquiera uno de los

aminoácidos o secuencias de nucleótidos dados en la lista de secuencia.

Definiciones

El termino "que comprende" significa "que incluye" así como también "que consiste" por ejemplo una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente de X o puede incluir algo adicional a X, tal como X+Y.

Una composición que contiene X es "substancialmente libre de " Y cuando al menos 85% en peso del total de X+Y de la composición es X. Preferiblemente, X comprende al menos aproximadamente 90% en peso del total de X+Y en la composición, más preferiblemente al menos aproximadamente 95% o aún 99% en peso.

El termino "heterologous" se refiere a dos componentes biológicos que no son encontrados juntos en la naturaleza. Los componentes pueden ser células hospederas, genes, o regiones regulatorias, tales como promotores. Aunque los componentes Heterologous no se encuentran juntos en la naturaleza, ellos pueden funcionar juntos, como cuando un promotor heterologo a

un gene está operablemente ligado al gene. Otro ejemplo es cuando una secuencia de influenza es Heterologa a una célula huésped de ratón. Ejemplos adicionales serían dos epitopos de las mismas o diferentes proteínas que han sido ensambladas en una proteína simple en una disposición no encontrada en la naturaleza.

Un "origen de replicación" es una secuencia de polinucleótido que inicia y regula la replicación de polinucleótidos, tales como un vector de expresión. El origen de la replicación se comporta como una unidad autónoma de replicación de polinucleótido dentro de una célula capaz de replicarse bajo su propio control. Un origen de replicación puede ser necesario para que un vector se replique en una célula huésped particular. Con ciertos orígenes de replicación, un vector de expresión se puede reproducir con un número de copia alto en la presencia de proteínas apropiadas dentro de la célula. Los ejemplos de orígenes de las secuencias autónomamente replicables que son efectivas en levadura; y el antígeno T viral efectivo en células COS-7.

Una secuencia "Mutante" se define como una secuencia de ADN, ARN o aminoácido que difiere pero que tiene

identidad de secuencia con la secuencia nativa o descrita. Dependiendo de la secuencia particular, el grado de identidad de la secuencia entre la secuencia nativa o descrita y la secuencia mutante es preferiblemente mayor del 50% (por ejemplo 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más, calculada utilizando el algoritmo Smith-Waterman como se describió anteriormente). Como se utiliza aquí una "variante allelica" de una molécula de ácido nucleico, o región para lo cual se suministra una secuencia de ácido nucleico aquí es una molécula de ácido nucleico o región, que ocurre esencialmente en el mismo locus en el genoma de otra o segundo aislado, y que , debido las variaciones naturales utilizadas mediante, por ejemplo, mutaciones o recombinaciones, tiene una secuencia de ácido nucleico similar pero no idéntica. Una variante allelica de región codificante típicamente codifica una proteína que tiene actividad similar a aquella de la proteína que codifica el gen con el cual este es comparada. Una variante allelica puede comprender una alteración en las regiones no traducidas 5' o 3' del, gen, tal como en regiones de control regulatoria (por ejemplo ver patente US 5,753, 235).

Expresión de polipéptido

Las secuencias de nucleótidos se pueden expresar en una variedad de sistemas de expresión diferentes; por ejemplo aquellas utilizadas en células de mamífero, baculovirus, plantas, bacterias, y levaduras.

Generalmente, cualquier sistema o vector que es adecuado para mantener, propagar o expresar moléculas de ácido nucleico para producir un polipéptido en el huésped requerido se puede utilizar. La secuencia de nucleótido apropiada puede ser insertada en un sistema de expresión mediante cualquiera variedad de técnicas bien conocidas y de rutina, tales como, por ejemplo, aquellas descritas en Sambrook et al. Generalmente el gen codificante puede ser ubicado bajo el control de un elemento de control tal como un sitio de unión de promotor, ribosoma (para expresión bacterial) y opcionalmente un operador, de tal forma que la secuencia de ADN que codifica el polipéptido deseado es transcrito en el ARN en la célula huésped transformado.

Ejemplos de sistemas de expresión adecuados incluyen, por ejemplo, sistemas cromosómicos, episomales y derivados de

virus, que incluyen, por ejemplo, vectores derivados de: plásmidos de bacterias, bacteriófagos, transposones, episomas de levadura, elementos de inserción, elementos de cromosoma de levadura, virus tales como baculovirus, virus papova tales como SV40, virus de vacuna, adenovirus, virus de pústula de gallo, virus y retrovirus "pseudorabies", o combinaciones de estos, tales como derivados de elementos genéticos de plásmidos y bacteriófagos que incluyen cosmidos y fagemidos. Los cromosomas artificiales humanos (HACs) también se pueden emplear para suministrar grandes fragmentos de ADN que pueden ser obtenidos y expresados en un plásmido.

Los sistemas de expresión particularmente adecuados incluyen microorganismos tales como bacterias transformadas con bacteriófagos recombinantes, plásmidos o vectores de expresión de ADN de cosmido; levaduras transformadas con vectores de expresión de levadura; sistema de célula de insecto infectadas con vectores de expresión de virus (por ejemplo, baculovirus); sistemas de célula de planta transformadas con vectores de expresión (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus de mosaico del tabaco TMV) o con vectores de expresión bacterial (por ejemplo, Ti o plásmidos pBR322);

o sistemas de célula animal. Los sistemas de traducción libres de célula también se pueden emplear para producir los polipéptidos de la invención.

La introducción de moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido de la presente invención en células huésped se puede afectar mediante los métodos descritos en muchos manuales de laboratorio estándar, tales como Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology (1986) y Sambrook et al., (supra). Los métodos particularmente apropiados incluyen transfección de fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transvección, microinyección, transfección mediada por lípido catiónico, electroporación, transducción, carga de raspadura, introducción balística o infección (ver Sambrook et al., 1989 [supra]; "Current Protocols in Molecular Biology", Ausubel et al. (eds). Greene Publishing Association and John Wiley Interscience, New York, 1989, 1992; Spector, Goldman & Leinwald, 1989). En células eucarióticas, los sistemas de expresión pueden ser transitorios, (por ejemplo, episomal) o permanentes (integración cromosomal) de acuerdo a las necesidades del sistema.

Para producción de largo plazo, de alto rendimiento de un polipéptido recombinante, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan establemente el polipéptido de interés se pueden transformar utilizando vectores de expresión que pueden contener orígenes virales de replicaciones y/o elementos de expresión endógena y un gen marcado seleccionable sobre el mismo o sobre un vector separado. Luego de la introducción del vector, las células se les puede permitir crecer durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de ser cambiadas a un medio selectivo. El propósito del marcador selectivo es conferirle resistencia a la elección, y su presencia permite el crecimiento y recuperación de células que expresan exitosamente las secuencias introducidas. Los clones resistentes a las células establemente transformadas pueden ser proliferantes utilizando técnicas de cultivo de tejido apropiadas al tipo de célula.

i. Sistema de mamíferos

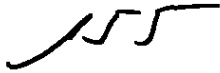
Los sistemas de expresión de mamíferos son conocidos en la técnica. Un promotor de mamífero es cualquier secuencia de ADN capaz de unirse a la polimerasa de ARN de mamífero e iniciar la transcripción corriente abajo (3')

de una secuencia codificante (por ejemplo, gen estructural) en m ARN. Un promotor tendrá una región de iniciación de transcripción, que está usualmente ubicada próxima al extremo 5' de la secuencia codificante y una caja TATA usualmente localizada 25-30 pares base (bp) corriente arriba del sitio de la iniciación de la transcripción. La caja TATA se cree que dirige la ARN polimerasa II para iniciar la síntesis de ARN en el sitio correcto. Un promotor de mamífero también contendrá un elemento promotor corriente arriba usualmente localizado dentro los 100 a 200 bp corriente arriba de la caja TATA. Un elemento promotor corriente arriba determina el índice en el cual la transcripción se inicia y puede actuar en cualquier orientación [Sambrook et al. (1989) "Expresión of Cloned Genes in; Mammalian Cells." In Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed]

Los genes de virales de mamífero son a menudo altamente expresados y tiene un amplio rango de huésped; por lo tanto las secuencias que codifican los genes virales de mamífero proporcionan secuencias promotoras particularmente útiles. Ejemplos incluyen el promotor temprano SV40, el promotor LTR de virus de tumores mamario de ratón, el promotor tardío principal de adenovirus (Ad

MLP), y el promotor de virus de herpes simple. Además, las secuencias derivadas de genes no virales, tales como los genes de metaloteioneína de murino, también suministran secuencias promotoras útiles. Las expresiones pueden ser constitutivas o reguladas (inducibles), dependiendo de que el promotor pueda ser inducido con glucocorticoide en células con respuesta a hormona.

La presencia de un elemento mejorador (mejorador) combinada con los elementos promotores descritos anteriormente, usualmente incrementarán los niveles de expresión. Un mejorador es una secuencia de ADN regulatoria que puede estimular la transcripción hasta de 100 veces cuando se liga a unos promotores homólogos o heterólogos, son la síntesis iniciando en el sitio de inicio de ARN normal. Los mejoradores también son activos cuando ellos son ubicados corriente arriba o corriente abajo del sitio de iniciación de transcripción. En cualquiera orientación normal o tironeada, o a una distancia de más de 1000 nucleótidos del promotor [Maniatis et al. (1987) Science 236:1237; Alberts et al. (1989) Molecular Biology of the Cell, 2nd ed.]. Los elementos mejoradores derivados de los virus pueden ser particularmente útiles porque ellos usualmente tienen un



más amplio rango de huésped. Los ejemplos incluyen el mejorador de gen temprano SV40 [Dijkema et al (1985) EMBO J. 4:761] y los mejoradores/promotores derivados de la repetición del terminal largo (LTR) de el Rous Sarcoma Virus [Gorman et al. (1982b) PNAS usa 79:6777] y de un citomegalovirus humano [Boshart et al. (1985) Cell 41:251]. Adicionalmente, algunos mejoradores son regulables y se vuelven activos solamente en la presencia de un inductor, tal como una hormona o un ion metálico [Sassone-Corsi and Borelli (1986) Trends Genet. 2:215; Maniatis et al. (1987) Science 236:1237].

Una molécula de ADN se puede expresión intracelularmente en células de mamífero. Una secuencia promotora puede ser directamente ligada ala molécula de AD en cuyo caso el primer aminoácido en el terminal N de la proteína recombinante siempre será una metionina, que es codificada por un codon de inicio ATG. Si se desea, el N-terminal puede ser clivado mediante una incubación in vitro con bromuro cianógeno.

Alternativamente, las proteínas extrañas también se pueden secretar de la célula en un medio de crecimiento al crear moléculas de ADN quimérico que codifican una

proteína de fusión comprendida de un fragmento de secuencia líder que suministra la secreción de la proteína extraña en células de mamífero. Preferiblemente, existen sitios de procesamiento codificados entre el fragmento líder y el gen extraño que puede ser clivado bien sea in vivo o in vitro. El fragmento de secuencia líder usualmente codifica un péptido de señal comprendido de aminoácidos hidrófobos que dirigen la secreción de la proteína desde la célula. El líder tripáritico de adenovirus es un ejemplo de una secuencia líder que suministra la secreción de una proteína extraña en células de mamífero.

Usualmente, la terminación de la transcripción y las secuencias de poliadenilación reconocidas por las células de mamíferos son regiones regulatorias localizadas 3' al codón de parada de la traducción y así, junto con los elementos promotores, flanquean la secuencia codificante. El terminal 3'. En el mRNA maduro se forma mediante clivaje y poliadenilización post transcripcional específica [Birnstiel et al. (1985) Cell 41:349; Proudfoot and Whitelaw (1988) "Termination 3' end processing of eukaryotic RNA. In Transcription and splicing" (ed B.D.Hames and D.M. Glover) Proudfoot (1989)

Trends Biochem. Sci. 14:105]. Estas secuencias dirigen la transcripción de un mRNA que puede ser traducido en el polipéptido codificado por el ADN. Ejemplos de señales de terminador de transcripción/poliadenilización incluyen aquellos derivados de SV40 [Sambrook et al (1989) "Expressions of cloned genes in cultured mammalian cells." In Molecular Cloning: A Laboratory Manual).

Usualmente, los componentes anteriormente descritos comprenden un promotor, una señal de poliadenilización, y una secuencia de terminación de transcripción que son puestas en construcciones de expresión. Los mejoradores, intrones son donadores de empalmo funcional y sitios aceptadores y secuencias líder pueden también ser incluidas en la construcción de transcripción si se desea. Las construcciones de expresión son a menudo mantenidas en un replicon, tal como elementos extracromosomales (por ejemplo plásmido) capaces de mantenimiento estable en un huésped, tal como células o bacterias de mamífero. Los sistemas de replicación de mamífero incluyen aquellos derivados de virus de animales que requieren factores de transacción para replicarse. Por ejemplo, los plásmidos que contienen los sistemas de replicación de papopapvirus, tales como SV40 [Gluzman (1981) Cell 23:175] o

poliomavirus, se replican a un número extremadamente alto de copias en la presencia del antígeno de viral apropiado. Los ejemplos adicionales de replicones de mamífero incluyen aquellos derivados de papilpnavirus de bovino y virus de Epstein-barr. Adicionalmente, el replicon puede tener dos sistemas de replicación, permitiendo así que este sea mantenido por ejemplo, en células de mamífero para la expresión y en un huésped procariótico para clonación y amplificación. Ejemplos de tales vectores transportadores de pMT2 [Kaufman et al. (1989) Mol. Cell. Biol. 9:946] y pHEBO [Shimizu et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6:1074].

El procedimiento de transformación utilizado depende del huésped a ser transformado. Los métodos para introducción de polinucleótidos heterólogos en células de mamíferos son conocidos en la técnica e incluyen transfección mediada por dextrano, precipitaciones de fosfato de calcio, transfecciones mediadas por polibreno, fusiones de protoplasto, electroporación, encapsulación de los polinucleótidos en liposoma, y micro inyección directa al ADN en el núcleo.

Las líneas celulares de mamífero disponibles como huéspedes para la expresión son conocidas en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC) que incluye, pero no está limitado, a ovario de Hamster chino (CHO), HeLa, riñón de hamster bebe (BHK), riñón de mico (COS), C1, 27. 3T3, BHK, HEK 293, Células de melanoma Bowes y de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo HEp G2) y un número de otras líneas celulares.

ii. Sistema Baculovirus

El polinucleótido que codifica la proteína también se puede insertar en un vector de expresión de insecto adecuado, y es operablemente ligado a los elementos de control dentro del vector. La construcción del vector emplea técnicas que son conocidas en el arte. Generalmente, los componentes del sistema de expresión incluyen un vector de transferencia, usualmente un plásmido bacterial, que contiene tanto un fragmento del genoma de baculovirus, y un sitio de restricción conveniente para la inserción del gen o genes heterólogos a ser expresados; un baculovirus tipo silvestre con una secuencia homóloga a los fragmentos específicos de

baculovirus en el vector de transferencia (esto permite las recombinaciones homólogas de el gen heterólogo en el genoma de baculovirus); y las células huésped de insecto apropiadas y los medios de crecimiento.

Después de insertar la secuencia de ADN codifica la proteína en el vector de transferencia, los genomas virales tipo silvestre son transfectados en una célula huésped de insecto donde el vector y el genoma viral se les permiten recombinarse. El virus recombinante empacado es expresado y las plaquetas recombinantes son identificadas y purificadas. Los materiales y métodos para los sistemas de expresión baculovirus/célula de insecto son comercialmente disponibles en forma de kit por ejemplo de la Invitrogen, San Diego CA (kit "MaxBaC"). Estas técnicas son generalmente conocidas por aquellos expertos en el arte y se describen completamente en Summers & Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987) (aquí en adelante "Summers Smith").

Antes de insertar la secuencia de ADN que codifica la proteína en el genoma de baculovirus, los componentes anteriormente descritos, que comprenden un promotor,

JBI

líder (si se desea) codifican secuencias de interés y secuencias de terminación de transcripción, son usualmente ensamblados en una construcción de transubicación intermedia (vector de transferencia). Esta construcción puede contener un gen simple y elementos regulatorios operablemente ligados; genes múltiples, cada uno con su propio conjunto de elementos regulatorios, operablemente ligados; o genes múltiples, regulados por el mismo conjunto de elementos regulatorios. Las construcciones de transubicación intermedia son a menudo mantenidas en replicones, tales como un elemento extracromosomal (por ejemplo, plásmido) capaces de mantenimiento estable en un huésped tal como una bacteria. El replicón tendrá un sistema de replicación, permitiendo así que sea mantenido en un huésped adecuado para clonación y amplificación.

Habitualmente, el vector de transferencia más comúnmente utilizado para introducir los genes extraños en el AcNP V es pAc373. Muchos otros vectores, conocidos por aquellos expertos en la técnica, también han sido diseñados. Estos incluyen, por ejemplo, pVL985 (que alteran el codon de inicio de polihedrina de ATG o ATT, y que introducen 32

pares de base de clonación BamHI corriente abajo del ATT; ver Luckow and Summers, Virology (1989) 17:31.

El plásmido usualmente también contiene una señal de poliadenilación de polihedrina (Miller (1988) Ann. Rev. Microbiol. 42:177) y el gen de resistencia de ampicilina procariótica (amp) y origen de replicación para la selección y propagación de E. coli.

El baculovirus transfiere vectores que usualmente contiene un promotor de baculovirus. Un promotor de baculovirus es cualquier secuencia de ADN capaz de unir una ARN polimerasa de baculovirus e iniciar una transcripción corriente abajo (5' a 3') de una secuencia codificante (por ejemplo, gen estructural) en mRNA. Un promotor tendrá una región de iniciación de transcripción que está usualmente ubicada próxima al extremo 5' de la secuencia de codificación. Esta región de iniciación de transcripción usualmente incluye un sitio de unión de ARN polimerasa y un sitio de iniciación de transcripción. Un vector de transferencia de baculovirus también puede tener un segundo dominio denominado un mejorador, que, si está presente, es usualmente distante al gen estructural. La expresión puede ser regulada constitutiva.

Los genes estructurales, abundantemente transcritos en momentos tardíos en un ciclo de infección viral, suministran secuencias promotoras particularmente útiles. Ejemplos incluyen secuencias derivadas del gen que codifica las proteínas de poliedros virales, Friesen et al., (1986) "The Regulation of Baculovirus Gene Expression," en The Molecular Biology of Baculoviruses (ed. Walter Doerfler); EP-127839 & EP-155476; y el gen que codifica la proteína p10, Vlak et al. (1988), J. Gen Virol. 69:765.

El ADN que codifica las secuencias de señal adecuadas se puede para ser derivadas de genes para proteínas de insecto o baculovirus secretadas, tales como el gen de polihedrina de baculovirus (Carbonell et al. (1988) Gene, 73:409). Alternativamente, en razón a que las señales para las modificaciones post transduccionales de células de mamífero (tales como el clivage de péptido de señal, el clivage proteolítico, una d fosforilación) para ser reconocida en las células de insecto, y las señales requeridas para la secreción y la acumulación nuclear también parecen ser conservadas entre las células de invertebrados y células de vertebrados, líderes de un

origen diferente a insecto, tal como aquellos derivados de los genes que codifican interferon humano?, Maeda et al., (1985), Nature 315:592; el péptido de liberación de gastrin humano, Lebacq-Verheyden et al., (1988), Molec. Cell. Biol. 8:3129; IL-2 humano, Smith et al., (1985) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 82:8404; IL-3 ratón, (Miyajima et al., (1987) Gene 58:273; glucocerebrosidasa de humano, martin et al. (1988) dna, 7:99, también se puede utilizar para suministrar la secreción en insectos.

Un polipéptido o poli proteína recombinante se puede expresar intracelularmente o, si se expresa con las secuencias regulatorias adecuadas, esta puede ser secretada. La buena expresión intracelular de proteínas extrañas no fusionadas usualmente requiere genes heterólogos que idealmente tengan una secuencia líder corta que contenga señales de iniciación de traducción adecuadas que preceden una señal de partida ATG. Si se desea, la metionina en el n-terminal puede clivada de la proteína madura mediante incubación in vitro con bromuro cianógeno. Alternativamente, las poliproteínas o proteínas recombinantes que no son naturalmente secretadas se pueden secretar de una célula de insecto mediante la creación de moléculas de ADN quimérico que

165

codifiquen una proteína de fusión comprendida de un fragmento de secuencia líder que suministre la secreción de una proteína extraña en insectos. El fragmento de secuencia líder usualmente codifica un péptido de señal comprendido de aminoácidos hidrófobos que dirigen la translocación de la proteína en el retículo endoplasmático.

Después de la inserción de la secuencia de ADN y/o el gen que codifica el precursor de producto de expresión de la proteína, un huésped de célula de insecto es co-transformado con el ADN heterólogo del vector de transferencia y el ADN geonómico del baculovirus tipo silvestre usualmente mediante co-transfección. La secuencia de terminación del promotor y la transcripción de la construcción usualmente comprenderá una sección de 2 a 5 kb del genoma del baculovirus. Los métodos para la introducción de ADN heterólogo en el sitio deseado del virus de baculovirus son conocidos en la técnica. (Ver Summers & Smith supra; Ju et al. (1987); Smith et al., Mol Cell Biol (1983) 3:2156; y Luckow and Summers (1989)). Por ejemplo, la inserción puede ser en un gen tal como el gen de polihedrina, mediante combinación doble cruzada homóloga; la inserción también puede ser en

un sitio de enzima de restricción trabajada por ingeniería en el gen de baculovirus deseado. Miller et al., (1989), Bioessays 4:91. La secuencia de ADN cuando se clona en el lugar del gen de polihedrina en el vector de expresión, es flanqueado tanto en 5' como en 3' por secuencias específicas de polihedrina y está ubicado corriente abajo del promotor de polihedrina.

El vector de expresión de baculovirus recientemente formado es subsecuentemente empacado en un baculovirus recombinante infeccioso. La recombinación homóloga ocurre a baja frecuencia (entre aproximadamente 1% y aproximadamente 5%); así, la mayoría del virus producido después de co-transfección es aun un virus tipo silvestre. Por lo tanto, es necesario un método para identificar los virus recombinantes. Una ventaja del sistema de expresión una selección visual que permita distinguir los virus recombinantes. La proteína polihedrina, que es producida por el virus nativo, es producida a muy altos niveles en los núcleos de las células infectadas en momentos tardíos después de la infección viral. Las proteínas de polihedrina acumuladas forman cuerpos de oclusión que también contienen partículas embebidas. Estos cuerpos de oclusión, hasta de 15 μ m de tamaño, son altamente retráctiles, dándoles una

apariciencia brillante que es fácilmente visualizada bajo el microscopio de luz. Las células infectadas con virus recombinante les falta los cuerpos de oclusión. Para distinguir los virus recombinantes de los virus tipo silvestre, el supernadante de transfección es puesto en placas sobre una monoplaca de células de insecto mediante técnicas conocidas por aquellos expertos en el arte. A saber, las palcas son seleccionadas bajo el microscopio de luz para la presencia (indicativa de virus tipo silvestre) o ausencia (indicativa de virus recombinante) de cuerpos de oclusión. Current Protocols in Microbiology Vol. 2 (Ausubel et al. Eds) at 16.8 (Supp. 10, 1990); Summer Smith, supra; Miller et al. (1989).

Los vectores de expresión de baculovirus recombinante han sido desarrollados para infección en varias células de insecto. Por ejemplo, los baculovirus recombinantes han sido desarrollados para, entre otros: *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombix mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda*, y *Trichoplusia ni* (WO 89/046699; Carbonell et al., (1985) J. Virol. 56:153; Wright (1986) Nature 321:718; Smith et al., (1983) Mol. Cell. Biol. 3:2156; y ver generalmente, Fraser, et al. (1989) In Vitro Cell. Dev. Biol. 25:225).

Las células y los medios de cultivo de células son comercialmente disponibles tanto para expresión directa y de fusión de polipéptidos heterólogos en un baculovirus/sistema de expresión; la tecnología de cultivo de células es generalmente conocida por aquellos expertos en la técnica. Ver, por ejemplo, Summers & Smith supra.

Las células de insecto modificadas pueden entonces ser crecidas en un medio de nutrientes apropiado, que permite el mantenimiento estable del o los plásmidos presentes en el huésped de insecto modificado. Donde el gen de producto de expresión está bajo control inducible, el huésped puede crecer en alta densidad, y expresión inducida. Alternativamente, donde la expresión es constitutiva, el producto será continuamente expresado en el medio y el medio de nutriente debe ser continuamente circulado, aunque removiendo el producto de interés y aumentando los nutrientes vaciados. El producto puede ser purificado mediante tales técnicas como cromatografía, por ejemplo HPLC, y cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio de iones, etcétera; electroforesis; configuración del gradiente de densidad;

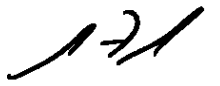
extracción de solvente, o similar. Según sea apropiado, el producto se puede purificar adicionalmente según se requiera para remover substancialmente cualquiera proteína de insectos que será también secretada en el medio o resulte de lisis de célula de insecto, con el fin de suministrar un producto que sea al menos substancialmente libre de desechos de huésped, por ejemplo, proteínas, lípidos y polisacáridos.

Con el fin de obtener expresiones de proteína, las células huésped de recombinantes derivadas de los transformantes son incubados bajo condiciones que permitan la expresión de la secuencia que codifica la proteína recombinante. Estas condiciones variaran, dependiendo de la célula huésped seleccionada. Sin embargo, las condiciones son fácilmente discernibles para aquellos expertos en la técnica, con base en lo que es conocido en el arte.

iii. Sistemas de Planta

Existen muchos cultivos de células de planta y sistemas de expresión genético completos de plantas en la técnica. Ejemplos de sistemas de expresión genética celulares de

planta incluyen aquellos descritos en las patentes, tales como: US 5,693,506; US 5,659,122; y US 5,608,143. Ejemplos adicionales de expresión genética en cultivo de célula de planta han sido descritos por Zenk, *Phytochemistry* 30:3861-3863 (1991). Las descripciones de los péptidos de señal de proteína de planta se pueden encontrar además de las referencias de citas anteriormente en Vaulcombe et al., *Mol. Gen. Genet.* 209:33-40 (1987); Chandler et al., *Plant Molecular Biology* 3:407-418 (1984); Rogers, J. *Biol. Chem.* 260:3731-3738 (1985); Rothstein et al., *Gene* 55:353-356 (1987); Whittier et al., *Nucleic Acids Research* 15:2515-2535 (1987); Wirsel et al., *Molecular Microbiology* 3:3-14 (1989); Yu et al., *Gene* 122:247-253 (1992). Una descripción de la regulación de la expresión del gen de planta mediante la fitohormona, ácido giberelico y enzimas secretadas inducidas por ácido giberelico pueden ser encontradas en R. L. Jones y J. MacMillin, *Gibberellins: en: Advanced Plant Physiology*, Malcolm B. Wilkins, ed., 1984 Pitman Publishing Limited, London, pp 21-52. Las referencias que describen otros genes reguladores metabólicos: Sheen, *Plant Cell*, 2:1027-1038 (1990); Maas et al., *Emboj.* 9:3447-3452 (1990); Benkel & Hickey, *PNAS USA* 84:1337-1339 (1987).



Típicamente, utilizando técnicas conocidas en el arte, una secuencia de polinucleótido deseada se inserta en un cartucho de expresión que comprende elementos regulatorios genéticos diseñados para operación en plantas. El cartucho de expresión es insertado en un vector de expresión deseado con secuencias de compañía corriente arriba y corriente abajo del cartucho de expresión adecuado para la expresión en un huésped vegetal. Las secuencias de compañía serán de origen plásmido o viral y suministra las características necesarias al vector para permitirle a los vectores mover el ADN desde un huésped de clonación original, tal como bacteria, al huésped de planta deseado. La construcción del vector bacterial/planta básico suministrará preferiblemente un amplio rango de origen de replicación procariótico; un marcador seleccionable procariótico; y para transformaciones de *Agrobacterium*, secuencias T ADN para transferencias mediadas por *Agrobacterium* a cromosomas de planta. Donde el gen heterólogo no es fácilmente responsable para detección, la construcción preferiblemente también tendrá un gen marcador seleccionable adecuado para determinar si una célula de planta ha sido transformada. Una revisión general de

marcadores adecuados, por ejemplo, de los miembros de la familia de pastos, se encuentra en Wilmink & Dons, 19936, Plant Mol. Biol. Rept, 11 (2):165-185.

Las secuencias adecuadas para permitir la integración de la secuencia heteróloga en el genoma de planta también es recomendada. Este podría incluir secuencias de transposon y similares para combinación homóloga así como también secuencias Ti que permitan la inserción aleatoria de un cartucho de expresión heterólogo en un genoma de planta. Los marcadores seleccionables procarióticos adecuados incluyen resistencia hacia los antibióticos tales como ampicilina o tetraciclina. Otras secuencias de ADN que codifican las funciones adicionales también pueden estar presentes en el vector, como es conocido en la técnica.

Las moléculas de ácido nucleico en la invención objeto puede estar incluidas en un cartucho de expresión para la expresión de el o las proteínas de interés. Solamente, abra solamente un cartucho de expresión, aunque dos o más son factibles. El cartucho de expresión recombinante contendrá además de la proteína heteróloga que codifica la secuencia de los siguientes elementos, una región promotora, secuencias no traducidas 5' de planta, codon

de iniciación dependiendo de si o no el gen estructural viene equipado con uno, y una secuencia de terminación de transcripción y traducción. Sitios de enzima de restricción única en los extremos 5' y 3' del cartucho permite la fácil inserción en un vector pre-existente.

Una secuencia codificante heteróloga puede ser para cualquier proteína que se relacione con la presente invención. La secuencia que codifica la proteína de interés codificará un péptido de señal que permite el procesamiento y translocación de la proteína, según sea apropiado, y usualmente le faltará cualquier secuencia que podría resultar en la unión de la proteína deseada de la invención a una membrana. En razón, para la mayor parte, a que las regiones de iniciación transcripcional serán un gen que se exprese y transloque durante la germinación, mediante el empleo de un péptido de señal que suministra translocación, uno podría suministrar la translocación de la proteína de interés. De esta manera, el o las proteínas de interés serán translocados desde las células en las cuales ellas son expresadas y pueden ser eficientemente cosechadas. Típicamente, la secreción en semillas es a través de la capa de aleurona o de epitelio escutelar en el endosperma de la semilla. Aunque

no se requiere que la proteína sea secretada de las células en las cuales la proteína es producida, esto facilita el aislamiento y purificación de la proteína recombinante.

175

En razón a que la última expresión del producto del gen deseado será en una célula eucariótica es deseable determinar si cualquier porción del gen clonado contiene secuencias que serán procesadas como intrones por la maquinaria de esplicósoma del huésped. Si es así, la mutagénesis dirigida de sitio de la región "intron" puede ser conducida para evitar la pérdida de una porción del mensaje genético como un código de intron falso, Reed and Maniatis, Cell 41:95-105, 1985.

El vector puede ser micro inyectado directamente en las células de las plantas mediante el uso de micro pipetas para transferir mecánicamente el ADN recombinante. Crossway, Mol. Gen. Genet, 202:179-185, 1985. El material genético también se puede transferir en una célula de planta mediante el uso de polietilén glicol, Krens, et al., Nature, 296, 72-74, 1982. Otro método de introducción de segmentos de ácido nucleico es la penetración balística de alta velocidad mediante partículas pequeñas con ácido nucleico dentro de la matriz de glóbulos pequeños o partículas, o en la superficie, Klein, et al., Nature, 327, 70-73, 1987 y Knudsen y Muller, 1991, Planta, 185:330-336 enseñando el bombardeo de partículas de endosperma de cebada para

crear cebada transgénica. Aun otro método de introducción sería la fusión de protoplastos con otras entidades o mini células, células, lisosomas u otros cuerpos con superficie de lípido fundible, Fraley, et al., PNAS USA, 79, 1859-1863, 1982.

El vector también se puede introducir en las células de planta mediante electroporación. (Fromm et al., PNAS USA 82:5824, 1985). En esa técnica, los protoplastos de planta son electroporados en la presencia de plásmidos que contienen construcciones de gen. Los impulsos eléctricos de alta resistencias de campo permeabilizan reversiblemente las biomembranas permitiendo la introducción de los plásmidos. Los protoplastos de plantas electroporadas reforman la pared celular, la dividen, y forman callos de planta.

Todas las plantas provenientes de protoplastos se pueden aislar y cultivar para tener plantas completamente regeneradas que pueden ser transformadas mediante la presente invención de tal forma que las plantas completas son recuperadas para contener el gen transferido. Se conoce que prácticamente todas las plantas se pueden regenerar de células o tejidos de cultivo, incluyendo

177

pero no estando limitadas a las mayoría de especies de caña de azúcar, remolacha de azúcar, algodón, frutas y otros árboles, legumbres y vegetales. Algunas plantas incluyen, por ejemplo, especies del género *Fragaria*, *Lotus*, *Medicago*, *Onobrychis*, *Trifolium*, *Trigonella*, *Vigna*, *Citrus*, *Linux*, *Geranium*, *Nanipot*, *Daucus*, *Arabidopsis*, *Brassica*, *Raphanus*, *Sinapis*, *Atropa*, *Capsicum*, *Datura*, *Hyoscyamus*, *Lycopersion*, *Nicotiana*, *Solanum*, *Petunia*, *Digitalis*, *Majorana*, *Cichorium*, *Helianthus*, *Lactuca*, *Bromas*, *Asparagus*, *Antirrhinum*, *Hererocallis*, *Nemesia*, *Pelargonium*, *Panicum*, *Pennisetum*, *Ranunculus*, *Senecio*, *Salpiglossis*, *Cucumis*, *Browaalia*, *Glycine*, *Lolium*, *Zea*, *Triticum*, *Sorghum* y *Datura*.

Los medios para la regeneración varían de especies a especies de plantas pero generalmente una suspensión de protoplastos transformados que contienen copias de genes heterólogos se suministra primero. Los tejidos de callo se forman y pueden ser inducidos retoños de callos y subsecuentemente enraizados. Alternativamente, la formación de embriones puede ser inducida de la suspensión de protoplastos. Estos embriones germinan como embriones naturales para formar plantas. El medio de cultivo generalmente contiene varios aminoácidos y

hormonas, tales como auxinas y citoquininas. También es ventajosa agregar ácido glutámico y prolina al medio específicamente para tales especies como maíz y alfalfa. Los retoños y las raíces normalmente se desarrollaran simultáneamente. La regeneración eficiente dependerá del medio, de genotipo y de la historia del cultivo. Si estas tres variables son controladas, entonces la regeneración es completamente reproducible y repetible.

En algunos sistemas de cultivo de célula de plantas, la proteína deseada de la invención se puede extraer o alternativamente, la proteína se puede extraer de la planta completa. Cuando la proteína deseada de la invención es secretada en el medio, esta puede ser recolectada. Alternativamente, los embriones y las semillas medias sin embrión u otros tejidos de planta pueden ser mecánicamente irrumpidos para liberar cualquier proteína secretada entre las células y los tejidos. La mezcla puede ser suspendida amortiguada para recuperar las proteínas solubles. Los métodos de aislamiento y purificación de proteínas convencionales serán entonces utilizados para purificar la proteína recombinante. Los parámetros de tiempo, temperatura, pH, oxígeno, y volúmenes serán ajustados a través de métodos

129

de rutina para optimizar la expresión y recuperación de la proteína heteróloga.

iv. Sistemas bacteriales

Las técnicas de expresión bacterial son conocidas en el arte. Un promotor bacterial es cualquier secuencia de ADN capaz de unir ARN polimerasa bacterial e iniciar la transcripción corriente abajo (3') de la secuencia de codificación (por ejemplo gen estructural) en mRNA. Un promotor tendrá una región de iniciación de transcripción que es usualmente ubicada próxima al extremo 5' de la secuencia de codificación. Esta región de iniciación de transcripción usualmente incluirá un sitio de unión de ARN polimerasa y un sitio de iniciación de transcripción. Un promotor bacterial también puede tener un segundo dominio denominado un operador, que puede traslatar un sitio de unión de ARN polimerasa adyacente en el cual inicia la síntesis de ARN. El operador permite la transcripción regulada negativa (inducible), como una proteína expresora de gen puede unir el operador y de esta manera inhibir la transcripción de un gen específico. La expresión constitutiva puede ocurrir en la ausencia de elementos regulatorios negativos, tales como

el operador. Además, la regulación positiva se puede lograr mediante una secuencia de unión de proteína activadora de gen, la cual, si esta presente es usualmente próxima a (5') a la secuencia de unión de ARN polimerasa. Un ejemplo de una proteína activadora de gen es la proteína activadora catabolito (CAP), que ayuda a iniciar la transcripción del operon lac E. coli [Raibaud Et Al. (1984) Annu. Rev. Genet. 18: 173]. La expresión regulada puede por lo tanto ser positiva o negativa, mejorando de esta manera o reduciendo la transcripción.

Las secuencias que codifican las enzimas de senda metabólica suministran secuencias promotoras particularmente útiles. Los ejemplos incluyen secuencias promotoras derivadas de enzimas metabolizantes de azúcar, tales como galactosa, lactosa, (lac) [Chang et al. (1977) Nature 198: 1056], y maltosa. Ejemplos adicionales incluyen secuencias promotoras derivadas de enzimas biosintéticas tales como los sistemas promotores de triptofano (trp) [Goeddel et al. (1980) Nuc. Acids Res. 8: 4057; Yelverton et Al. (1981) Nucl. Acids Res. 9: 731; Us patent 4, 738, 921; EP-A- 0036776 And EP-A-0121775]. El sistema promotor de g-lactamasa (bla) [Weissmann (1981) "The cloning of interferon and other mistakes." In

Interferon 3 (ed. 1. Gresser)], bacteriófago lambda PL [Shimatake et al. (1981) Nature 292: 128] y T5 [patente US 4,689, 406] también suministra secuencias promotoras útiles.

Además, los promotores sintéticos que no ocurren en la naturaleza también funcionan como promotores bacteriales. Por ejemplo, la secuencia de activación de transcripción de un promotor bacterial o bacteriófago se puede unir con las secuencias de operon de otros promotores bacteriales o bacteriófagos, cuando un promotor híbrido sintético [patente US 4,551, 433]. Por ejemplo, el promotor tac es un promotor trp-lac híbrido comprendido de promotor trp y secuencias de operon lac que es regulado por el represor lac [Amann et al. (1983) Gene 25: 167; de Boer et al. (1983) PNAS USA 80: 21]. Adicionalmente, un promotor bacterial puede incluir promotores de ocurrencia natural de origen no bacterial que tengan la capacidad de unir a ARN polimerasa bacterial e iniciar la transcripción. Un promotor de ocurrencia natural de origen no bacterial también se puede acoplar con la ARN polimerasa compatible para producir altos niveles de expresión de algunos genes en procariotes. La ARN polimerasa/sistema promotor del bacteriófago T7 es un ejemplo de un sistema promotor

acoplado [Studier et al. (1986) J. Mol. Biol 189: 113; Tabor et al. (1985) PNAS USA 82: 1074]. Además, un promotor híbrido también puede estar comprendido de un promotor bacteriófago y una región operadora E. coli (EP-A-0267851).

Además a una secuencia promotora de función, un sitio de unión de ribosoma eficiente también es útil para la expresión de genes extraños en procariotes. En E. coli el sitio de unión de ribosoma es denominado la secuencia Shine-Dalgarno (SD) e incluye un codon de iniciación (ATG) y una secuencia de 3-9 nucleótidos de longitud localizada en los nucleótidos 3-11 corriente arriba del codon de iniciación [Shine et al. (1975) Nature 254: 34]. La secuencia SD se cree que promueve la unión del mRNA al ribosoma por el pareo base entre la secuencia SD y el extremo 3' del rARN 16S [Steitz et al. (1979) "Genetic signals and nucleotide sequences in messenger RNA." In Biological Regulation and Development: Gene Expression (ed. R. F. Goldberger)]. Para expresar genes eucarióticos y genes procarióticos con sitio de unión de ribosoma débil [Sambrook et al. (1989) "Expression of cloned genes in Escherichia coli." In Molecular Cloning: A Laboratory Manual].

La molécula de ADN puede ser expresada intracelularmente. Una secuencia promotora puede estar directamente ligada con la molécula de ADN, en cuyo caso el primer aminoácido en el N-terminal será siempre una metionina, que es codificada por el codon de inicio ATG. Si se desea, la metionina en el N-terminal puede ser clivada de una proteína mediante incubación in vitro con bromuro cianógeno o por incubación in vivo o in vitro con peptidasa N-terminal de metionina bacterial (EPO-A-0 219 237).

La proteína de fusión suministra una alternativa a la expresión directa. Usualmente, una secuencia de ADN que codifica la porción N-terminal de una proteína bacterial endógena o la proteína estable, es fusionada al extremo 5' de las secuencias de codificación heteróloga. Luego de la expresión, esta construcción suministrará una fusión de dos secuencias de aminoácidos. Por ejemplo, el gen de la célula lambda de bacteriófago puede ser ligada al terminal 5' de un gen extraño y expresada en bacterias. La proteína de fusión resultante preferiblemente retiene un sitio para una enzima del procesamiento (factor Xa) para activar la proteína bacteriófaga del gen anterior

ign [Nagai et al. (1984) Nature 309: 810]. Las proteínas de fusión también pueden ser con secuencias a partir de los genes lacZ [Jia et al. (1987) Gene 60: 197], trpE [Allen et al. (1987) J. Biotechnol. 5: 93; Makoff et AL. (1989) J Gen. Microbiol 135: 11], And Chey [EP-A-0 324 647]. La secuencia de ADN en la unión de las dos secuencias de aminoácido puede o no codificar un sitio de clivado. Otro ejemplo es una proteína de fusión de ubiquitina. Tal proteína de fusión está hecha con la región de ubiquitina que preferiblemente retiene un sitio para una enzima de procesamiento (proteasa que procesa ubiquitina específica) para activar la ubiquitina de la proteína extraña. Por medio de este método la proteína extraña nativa puede ser aislada [Miller et Al. (1989) Biol/technology 7: 698].

En forma alternativa, las proteínas extrañas pueden ser secretadas desde la célula creando moléculas de ADN quiméricas que codifiquen una proteína de fusión que comprende un fragmento de secuencia de señal de péptido que suministre para la secreción de la proteína extraña en la bacteria [Patente norteamericana 4,336, 336]. El fragmento de secuencia de señal usualmente codifica un péptido de señal que comprende aminoácidos hidrofóbicos

185-

que dirigen la secreción de la proteína desde la célula. La proteína es secretada en el medio de crecimiento (bacteria gram-positiva) o en el espacio periplasmico localizado en entre el interior y el exterior de la membrana de la célula (bacteria gram-negativa). Preferiblemente estos son sitios de procesamiento, que pueden ser clivados sea in vivo o in vitro codificados entre el fragmento de señal de péptido y el gen extraño

El ADN que codifica de manera adecuada las secuencias de señal puede ser derivados de los genes para los proteínas secretadas bacterionalmente tales como el gen de proteína de la membrana externa del E. coli(ompA) [Masui et al. (1983) In: Experimental Manipulation of Gene Expression ; Ghayeb et al. (1984) EMBO J 3: 2437] Y la secuencia de señal de fosfatasa el E. coli (Phoa) [Oka Et al. (1985) PNAS USA 82: 7212]. Como un ejemplo adicional, la secuencia de señal del gen de la alfa-amilasa de varias cepas de bacilos pueden ser usadas para secretar proteínas heterólogas del B.subtilis [Palva et al. (1982) PNAS USA 79: 5582; EP-A-0244042].

Usualmente, las secuencias de terminación de la transcripción reconocidas por las bacterias son regiones

regulatorias localizadas en 3' al codon de tensión de la traducción, y por lo tanto con junto con el flanco promotor de las secuencias de codificación. Estas secuencias dirigen la transcripción de un mRNA que puede ser traducido en un polipéptido codificado por el ADN. Las secuencias de terminación de la transcripción frecuentemente incluyen secuencias del ADN de hasta 50 nucleótidos capaces de formar de lazos de tallo que ayudan a la transcripción de terminación. Ejemplos incluyen las secuencias de terminación de la transcripción derivadas de los genes con promotores fuertes, tales como el gen *trp* en el *E. coli* lo mismo que otros genes biosintéticos.

Usualmente, los componentes anteriormente descritos, comprenden un promotor, secuencia de señal (si se desea), secuencia de interés de codificación, y secuencia de terminación de transcripción, son puestos juntos en constructores de expresión. Los constructores de expresión son frecuentemente mantenidos en un replicador, tal como un elemento extracromosomal (por ejemplo plásmidos) capaz de mantenerse de manera estable en un anfitrión tal como una bacteria. Un replicador también puede ser un plásmido de número de copias alto o bajo. Un

plásmido de número de copias alto tendrá un número de copias que varia entre aproximadamente 5 a aproximadamente 200 y usualmente entre aproximadamente 10 a aproximadamente 150. Un anfitrión que tiene un número de copias alto preferiblemente contendrá aproximadamente 10, y más preferiblemente por lo menos aproximadamente 20 plásmidos. Cualquiera que sea un vector de número de copias alto o bajo puede ser seleccionado, dependiendo de efecto del vector y de la proteína extraña sobre el huésped.

De manera alternativa, los constructores de expresión pueden estar integrados en un genoma bacterial con un vector de integración. Los vectores de integración usualmente contiene por lo menos una secuencia homóloga al cromosoma bacterial que permite al vector integrarse. Las integraciones parecen resultar de recombinaciones entre ADN homólogos en el vector y el cromosoma bacterial. Por ejemplo, los vectores de integración contruidos con diversas cepas de bacilos se integran en cromosomas de bacilos (EP-A-0127328). Los vectores de integración también pueden estar comprendidos de secuencias de bacteriófagos o de transposones.

Usualmente, los constructores de expresión de integración y extracromosomales pueden contener marcadores seleccionables que les permitan la selección de las cepas bacteriales que han sido transformadas. Los marcadores seleccionables pueden ser expresados en el anfitrión bacterial y pueden incluir genes que convierten a la bacteria en resistentes a droga tales como penicilina, ampicilina, el cloramfenicol, la ritromicina, kanamicina (neomicina), y tetraciclina [Davies et al. (1978) Annu. Rev. Microbiol. 32: 469]. Los marcadores seleccionables también pueden incluir genes biosintéticos, tales como aquellos en los trayectos biosintéticos de la histidina, triptofan, y leucina.

Alternativamente, algunos de los componentes anteriormente descritos pueden ponerse juntos en vectores de transformación. Los ventores de transformación comprenden usualmente un mercado seleccionable que es mantenido en un replicador o desarrollador en un vector de integración, tal como se describió anteriormente.

Los vectores de transformación y expresión, sean replicadores extracromosomales o vectores de integración, han sido desarrollados para la transformación en muchas

bacterias. Por ejemplo, los vectores de expresión han sido desarrollados para, inter alia, las siguientes bacterias: *Bacillus Subtilis* [Palva et al. (1982) PNAS USA 79: 5582; EP-A-0 036 259 y EP-A-0 063 953; WO 84/04541], *Escherichia Coli* [Shimatake et al. (1981) NATURE 292: 128; Amann et. al. (1985) Gene 40: 183; Studier et al. (1986) J. Mol. Biol. 189: 113; EP-A-0 036 776, EP-A-0 136 829 y EP-A-0 136 907], *Streptococcus Cremoris* [Powell et al. (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54: 655]; *Streptococcus lividans* [Powell et al. (1988) Appl Environ. Microbiol. 54: 655], *Streptomyces lividans* [US Patent 4,745, 056].

Los métodos para producir ADN exógeno en anfitriones bacteriales son bien conocidos en la técnica, y usualmente incluyen la transformación tratada con CaCl_2 u otros agentes, tales como cationes bivalentes y DMSO. El ADN también puede ser introducido en células bacteriales por electroporación. Los procedimientos de transformación usualmente varían con las especies bacteriales que van a ser transformadas. Ver por ejemplo [Masson Et al. (1989) FEMS Microbiol. Lett 60: 273; Palva et AL. (1982) PNAS USA 79: 5582; EP-A-0 036 259 y EP-A-0 063 953; WO 84/04541, *Bacillus*], [Miller et al. (1988) PNAS USA 85:

856; Wang et al. (1990) J. Bacteriol. 172: 949, Campylobacter], [Cohen et al. (1973) PNAS USA 69:2110; Dower et al. (1988) Nucleic Acids Res. 16: 6127; Kushner (1978) "An improved method for transformation of Escherichia coli With Ci 1E1-derived plasmids. In Genetic Engineering: Proceedings of the International Symposium on Genetic Engineering (eds. H. W. Boyer and S. Nicosia); Mandel et al. (1970) J. Mol. Biol. 53: 159; Taketo (1988) Biochim. Biophys. Acta 949: 318; Escherichia], [Chassy et al. (1987) FEMS Microbiol Lett. 44: 173 Lactobacillus]; [Fiedler et al. (1988) Anal Biochem 170: 38, Pseudomonas]; [Augustin et al. (1990) FEMS Microbiol Lett. 66: 203, Staphylococcus], [Barany et al. (1980) J. Bacteriol 144: 698; Harlander (1987) "Transformation of Streptococcus lactis by electroporation, in: Streptococcal Genetics (ed. J. Ferretti and R. Curtiss III); Perry et al. (1981) Infect. Immun. 32: 1295; Powell et al. (1988) Appl Environ. Microbiol 54: 655; Somkuti et al. (1987) Proc. 4th Eur. Cong. Biotechnology 1: 412, Streptococcus].

La guía general en la expresión de E coli y su optimización puede encontrarse en Baneyx (1999) Curr.

J91

Opin. Biotech. 10: 411-421 y Hannig & Makrides (1998)
TIBTECH 16: 54-60.

v. Expresión de levadura

Los sistemas de expresión de levadura son bien conocidos para aquellos versados en la técnica. Un promotor de levadura es cualquier secuencia de ADN capaz de ligar polimeraza de ARN de levadura e iniciar la transcripción aguas abajo (3') de una secuencia de codificación (por ejemplo un gen estructural) en el mRNA. Un promotor tendrá una región de iniciación de transcripción que es usualmente colocada próxima al terminal al extremo 5' de la secuencia de codificación. Esta región de iniciación de transcripción usualmente incluye un sitio de ligado de polimeraza de ARN (El "TATA Box") y un sitio de iniciación de transcripción. Un promotor de levadura puede también tener un segundo dominio llamado una secuencia activadora aguas arriba (UAS), que, si está presente, está usualmente distante al gen estructural. La UAS permite la expresión regulada (inducible). La expresión constitutiva ocurre en la ausencia de un UAS. La expresión regulada puede ser positiva o negativa, por lo tanto promoviendo o reduciendo la transcripción.

La levadura es un organismo de fermentación con un trayecto metabólico activo, por lo tanto las secuencias que codifican las encimas en el trayecto metabólico suministran secuencias promotoras particularmente útiles. Ejemplos incluyen la dehidrogenasa de alcohol (ADH) (EP-A-0284044), la isomerasa de glucosa-6-fosfato, -3-fosfato-dehidrogenasa de gliceraldehido (GAP o GAPDH), hexoquinasa, fosfofructoquinasa, mutasa de 3-fosfoglicerato, enolasa, glucoquinasa, y quinasa p iurufat (PyK) (EPO-A-0329203). El gen PH05 de levadura, que codifica la fosfatasa ácida, también suministra secuencias de promotores útiles [Myanohara et al. (1983) PNAS USA 80:1].

Adicionalmente, los promotores sintéticos que no ocurren en la naturaleza también funcionan como promotores de levadura. Por ejemplo, las secuencias de UAS de un promotor de levadura pueden estar unidas con la región de activación de la transcripción de otro promotor de levadura, creando un promotor sintético híbrido. Ejemplos de tales promotores híbridos incluyen la secuencia regulatoria de ADH ligada a la región de activación de

transcripción GAP (Patentes Estadounidenses Números 4,876,197 y 4,880,734). Otros ejemplos de promotores híbridos incluyen promotores que consisten de la secuencias regulatorias CAD ADH2, GAL4, GAL10, o PHO5, combinados con la región de activación al de transcripción del gen de la enzima glicolítica tal como GAP o PyK (EP-A-0 164 556). Adicionalmente, un promotor de levadura puede incluir promotores de ocurrencia natural de origen diferente a levadura que tienen la habilidad de deligar la polimerasa del ARN de la levadura e iniciar la transcripción. Ejemplos de tales promotores incluyen, en inter alia, [Cohen et al. (1980) PNAS USA 77:1078; Henikoff et al. (1981) Nature 283:835; Hollenberg et al. (1981) Curr. Topics Microbiol. Immunol. 96:119; Hollenberg et al. (1979) "The Expresión of Bacterial Antibiotic Resistance Genes in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*", en: Plasmids of Medical, Environmental and Comercial Importante (eds K.N. Timmis y A. Puhler); Mercerau - Puigalon et al. (1980) Gene 11:163; Panthier et al. (1980) Curr. Genet. 2:109;].

Una molécula de ADN puede ser expresada intracelularmente en la levadura. Una secuencia promotoras puede estar

enlazada directamente con la molécula de ADN, en cuyo caso el primer aminoácido terminal N de la proteína recombinante siempre será una metionina, la cual es codificada por el codon ATG st art. Si se desea, la metionina en el terminal N puede ser clivada a partir de la proteína por incubación in Vitro con bromuro de cianogeno.

Las proteínas de fusión suministran una alternativa para los sistemas de expresión de levadura, lo mismo que en los sistemas de expresión de mamíferos, baculovirus, y bacteriales. Usualmente, una secuencia de ADN que codifica la porción del terminal N de una proteína de levadura endógena, u otra proteína estable, es fusionada al extremo 5' de las secuencias de codificación heterólogas. Luego de la expresión, esta construcción suministrará una fusión de las dos secuencias de aminoácidos. Por ejemplo, el gen de dismutasa superoxido de levadura o humano (SOD), puede ligarse al terminal 5' de un gen extraño y expresado en la levadura. La secuencia de ADN en la unión de las dos secuencias de aminoácido `puede o no codificar un sitio de clivación. Ver por ejemplo AP-A-0 196 056. Otro ejemplo es una proteína de fusión de ubiquitina. Tal proteína de fusión

está hecha con la región de ubiquitina que retiene preferiblemente un sitio para una enzima de procesamiento (por ejemplo la proteasa de procesamiento específica de ubiquitina) para clivar la ubiquitina de la proteína extraña. A través de este método, por lo tanto, la proteína extraña nativa puede ser aislada (ejemplo WO 88/024066).

Alternativamente, las proteínas extrañas pueden también ser secretadas desde la célula en el medio de crecimiento por medio de crear moléculas de ADN quiméricas que codifican una proteína de fusión que comprende un fragmento de secuencia líder que suministra para la secreción en la levadura de la proteína extraña. Preferiblemente, hay sitios de procesamiento que codifican entre el fragmento líder y el gen extraño que puede ser clivado sea in vivo o in Vitro. El fragmento de secuencia líder usualmente codifica un péptido de señal que comprende aminoácidos hidrofóbicos que dirigen la secreción de la proteína desde la célula.

Las secuencias de señal adecuadas que codifican el ADN pueden ser derivadas de genes para las proteínas de levadura secretada, tales como el gen de invertasa (EP-A-

0 012 873; JPO. 62,096,086) y el gen de factor A (Patente Norteamericana 4,588,684). Alternativamente, los líderes de origen diferente a levadura, tales como un líder de interferon, existían quienes también suministran para la secreción de levadura (EP-A- 0 060 057).

Una clase de líderes de secreción preferida son aquellos que emplean un fragmento del gen de factor alfa de la levadura, el cual contiene secuencia de señal, "pre" y una región "pro". Los tipos de fragmentos de factor alfa que pueden ser empleados incluyen el líder de factor pre-pro alfa de longitud completa (cerca de 83 residuos aa) lo mismo que líderes de factor alfa truncados (usualmente cerca de 25 a cerca de 50 residuos de aminoácido) (Patentes Estadounidenses 4,546,083 y 4,870,008; EP-A-0 324 274). Los líderes adicionales que emplean un fragmento de líder de factor alfa que suministra para la secreción incluyen los líderes de factor alfa híbridos hechos con una presecuencia de una primer levadura, pero una región pro de un segundo factor alfa de levadura (por ejemplo ver WO 89/02463.)

Usualmente, las secuencias de terminación de la transcripción reconocidas por la levadura son regiones

regulatorias localizadas en el 3' al codón de detenimiento de la traducción, y por lo tanto junto con el flanco promotor de la secuencia de codificación. Estas secuencias dirigen la transcripción de un mRNA que puede ser traducido en el polipéptido codificado por el ADN. Ejemplos de secuencias terminadoras de transcripción y otras secuencias de terminación reconocidas por levadura, tales como aquellas que codifican para las enzimas glicolíticas. Usualmente, estos componentes, comprenden un promotor, líder (si se desea), secuencia de codificación de interés, y secuencia de terminación de transcripción, son puestos juntos en constructores de expresión. Los constructores de expresión son frecuentemente mantenidos en un replicador, tal como un elemento extra cromosomal (por ejemplo plásmidos) capaz de mantenerse estable en un anfitrión, tal como la levadura o bacterias. El replicador puede tener dos sistemas de replicación, permitiendo así que se mantenga, por ejemplo, en la levadura para la expresión y en un anfitrión procariótico para la clonación y la amplificación. Ejemplo de tales vectores vehículos de levadura- bacterias incluyen la YEp24 [Botstein et al. (1979) Gene 8:17-24], pC1/1 [Brake et al. (1984) PNAS USA

81:4642-4646], y YRp17 [Stinchcomb et al (1982) J. Mol. Biol. 158:157]. Adicionalmente, un replicador puede ser un plásmido de números de copias alto o bajo. Un plásmido de un número de copias alto generalmente tendrá un número de copias que varía entre aproximadamente 5 a aproximadamente 200, y usualmente entre aproximadamente 10 a aproximadamente 150. Un anfitrión que contiene un plásmido de alto número de copias preferiblemente tendrá por lo menos aproximadamente 10, y más preferiblemente por lo menos aproximadamente 20. Sea un vector de números de copias alto o bajo puede ser seleccionado, dependiendo del efecto del vector y de la proteína extraña sobre el anfitrión. Ver por ejemplo Brake et al., Supra.

Alternativamente, los constructores de expresión pueden ser integrados en el genoma de levadura con un vector de integración. Los vectores de integración contienen usualmente por lo menos una secuencia homóloga a un cromosoma de levadura que permite al vector integrarse, y preferiblemente contiene dos secuencias homólogas que flanquean en el constructor de expresión. Las integraciones parecen como el resultado de recombinaciones entre ADN homólogo en el vector y el

cromosoma de levadura [Orr-Weaver et al. (1983) *Methods in Enzymol.* 101:228-245]. Un vector de integración puede estar dirigido a un locus específico en la levadura por medio de seleccionar la secuencia homóloga apropiada para la inclusión en el vector. Ver Orr-Weaver et al., supra. Uno o más constructores de expresión pueden integrar, posiblemente afectando los niveles de la proteína recombinante producida [Rine et al., (1983) *PNAS USA* 80:6750]. Las secuencias cromosomales incluidas en el vector pueden ocurrir sea como segmento único en el vector, lo que resulta en la integración del vector completo, o dos segmentos homólogos a segmentos adyacentes en el cromosoma y que flanquean el constructor de expresión en el vector, lo que puede resultar en la integración estable de solamente el constructor de expresión.

Usualmente, los constructores de expresión extra cromosomales y de integración pueden contener marcadores seleccionables para permitir la selección de las cepas de levadura que han sido transformadas. Los marcadores seleccionables pueden incluir genes biosintéticos que pueden ser expresados en el anfitrión de levadura, tales

como los genes de resistencia ADE2, HIS4, LEU2, TRP1 y ALG7, que confieren resistencia en las células de levadura a la tunicamicina y G418, respectivamente. En adición, un marcador seleccionable adecuado puede también suministrar a la levadura con la habilidad para crecer en la presencia de compuestos tóxicos, tales como metales. Por ejemplo, la presencia de CUP1 le permite a la levadura crecer en la presencia de cobrediones [Butt et al. (1987) Microbiol, Rev. 51:351].

Alternativamente, algunos de los componentes descritos anteriormente pueden ser puestos juntos en vectores de transformación. Tales vectores usualmente comprenden un marcador seleccionable que es mantenido o en un replicador o desarrollados dentro de un vector de integración como se describió anteriormente. Los vectores de expresión y transformación, sean replicadores extra cromosomales o vectores de integración, han sido desarrollados para la transformación en muchas levaduras. Por ejemplo, los vectores de expresión han sido desarrollados para, inter alia, las siguientes levaduras: *Candida albicans* [Kurtz, Et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6: 142], *Candida Maltosa* [Kunze, Et al. (1985) J. Basic

Microbiol. 25: 141]. *Hansenula Polymorfa* [Gleeson, et al. (1986) J. Gen. Microbiol. 132: 3459; Roggenkamp et al. (1986) Mol. Gen. Genet. 202: 302], *Kluyveromyces Fragilis* [Das, et al. (1984) J. Bacteriol. 158: 1165], *Kluyveromyces Lactis* [De Louvencourt et al. (1983) J. Bacteriol. 154: 737; Van den Berg et al (1990) Bio/Technology 8: 135], *Pichia Guillerimondii* [Kunze et al. (1985) J. Basic Microbiol. 25: 141], *Pichia Pastoris* [Cregg, et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5: 3376; las patentes Estadounidenses números 4, 837, 148 y 4,929, 555], *Saccharomyces Cerevisiae* [Hinnen et al. (1978) PNAS USA 75: 1929; Ito et al. (1983) J. Bacteriol. 153: 163], *Schizosaccharomyces Pombe* [Beach and Nurse (1981) Nature 300: 706], y *Yarrowia Lipolytica* [Davidow, et al. (1985) Curr. Genet. 10: 380471 Gaillardin, et al. (1985) Curr. Genet. 10: 49].

Los métodos para introducir ADN exógeno en anfitriones de levadura son bien conocidos en la técnica, y usualmente incluyen o la transformación de esferoplastos o de células de levadura intactas tratadas con fracciones alcali. Los procedimientos de transformación usualmente varían con las especies de levadura que van a ser transformadas. Ver por ejemplo [Kurtz et al. (1986) Mol.

Cell. Biol. 6: 142; Kunze et al. (1985) J. Basic Microbiol. 25: 141; Candida]; [Gleeson et al. (1986) J. Gen. Microbiol. 132: 3459; Roggenkamp et al. (1986) Mol. Gen. Genet. 202: 302; Hansenula]; [Das et al. (1984) J. Bacteriol. 158: 1165; De Louvencourt et al. (1983) J. Bacteriol. 154: 1165; Van Den Ver et al (1990) Bio/Technology 8: 135; Kluyveromyces]; [Cregg et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5: 3376; Kunze et al (1985) J. Basic Microbiol. 25: 141; Las patentes Estadounidenses números 4,837, 148 y 4,929, 555; P ichia]; [Hinnen et al. (1978) PNAS USA 75: 1929; Ito Et al. (1983) J. Bacteriol. 153: 163 Sacaromices]; [Beach y Nurse (1981) Nature 300: 706; Schizosaccharomyces]; [Davidow et al. (1985) Curr. Genet. 10: 39; Gaillardin et al. (1985) Curr. Genet. 10: 49; Yarrowia].

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **figura 1** muestra las relaciones estructurales y funcionales de la toxina asesina Piquia anómala (PaKT), el anticuerpo monoclonal neutralizante del paKT (mAB KT4), el receptor de la toxina asesina (KTR), y

anticuerpos asesinos similares a PaKT y mimotopos asesinos derivados (KM).

La **figura 2** muestra la actividad microbicida in Vitro por el ensayo CFU de mABK10 y mABK20 en comparación con un mAB pareado de isotipo irrelevante (todos a 100µde dosis) contra el UP10S del Candida albicans.

La **figura 3** muestra la actividad microbicida in Vitro de los anticuerpos H6 y H20 del scFv (100µg/ml de dosis).

La **figura 4** muestra la actividad microbicida in Vitro de los péptidos KM2 y KM3 comparada con los controles KM0 e IP 1mg/ml de dosis).

La **figura 5** muestra la actividad microbicida in Vitro del KM4 (0,5mg/ml de dosis.

La **figura 6** muestra la actividad microbicida in Vitro del KM5 (1mg/ml de dosis.

La **figura 7** muestra la actividad microbicida in Vitro del KM1 (1mg/ml de dosis).

La **figura 8** muestra el espacio de la candidiasis vaginal en ratas administrado intravaginalmente con KM.

La **figura 9** muestra una curva de supervivencia Kaplan-Meyer de ratones SCID retados con 5 LD50 de *C. albicans* y tratados con KM.

La **figura 10** muestra la actividad microbicida del KM (25 y 10µg/ml de dosis) contra el *C. neoformans* UP25.

La **figura 11** muestra la actividad microbicida del KM (500µg/ml y 100µg/ml de dosis) contra el a38 del *S. aureus*.

La **figura 12** muestra la actividad microbicida in Vitro del KM0, KM6, Km y KM7 a 20µg/ml de dosis.

La **figura 13** es una ilustración de los rasgos dentro del H6 scFv (ID DE SEC 2).

La figura 14 muestra el efecto del péptido KM (14A y 14B) sobre el crecimiento del *A. castellani*, comparado con el efecto del péptido SP (14C y 14D). El crecimiento fue 37° C (14A y 14C) o 25° C (14B y 14D). Los gráficos muestran el número del trofozoitos por poso.

La figura 15 muestra el efecto del péptido KM sobre la viabilidad del las células *A. castellani*. El péptido SP es establecido a 100%.

La figura 16 muestrea el efecto del K20 mAB sobre el crecimiento del *A. castellani*, y la figura 17 muestra el efecto del K10 mAB. Los valores son el número de trofozoitos por poso. El crecimiento amebal en el medio solo es mostrado como cruces. Los anticuerpos fueron usados a 12,5µg/ml (?) o 50µg/ml (?) .

La figura 18 muestra el efecto del KM (círculos) y SP (cruces) sobre la replicación del virus de influenza hasta en 80µg/ml de concentración. Los valores son títulos de log₂ de HA.

La figura 19 muestra el efecto de los péptidos KM (círculos) y SP (cuadrados) sobre la replicación del HIV-1. Los péptidos fueron usados en 1µg/ml (cerrado) o 10µg/ml (abierto). Los valores son copias/ml durante 15 días de cultivo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS LISTAS DE SECUENCIAS

ID DE SEC	DESCRIPCIÓN
1	Secuencia del nucleótido de H6 scFv
2	Secuencia de aminoácido de H6 scFv
3	KM0 (fragmento de la (SEQ. ID 2)
4	KM (= SEC ID 3 con Glu? Mutación de Ala en la posición 1)
5-12	Variantes de barrido de Alamina de la ID DE SEC 3)
13	Péptido revuelto en SPO
14-20	Derivados acortados de KM (9mer, 8mer, 7mer, 6mer, 5mer, 4mer, 3mer, de la SEC ID3
21	Secuencia del nucleótido de H20 scFv
22	Secuencia de aminoácido de H20 scfv
23	KM1 (ID DE SEC 3CON Cys? Mutación de Ser en la posición 7)
24	KM2
25	KM3
26	KM4
27	KM5

28	Péptidos IP irrelevantes
29	SP
30	Enlazador (usado para unir KM0 y KM2 al KM3 dado)
31	Péptido de control
32	Derivado de KM1 (=ID DE SEC 4CON Cys? Mutaciópñ de Xaa en la posición 7)
33	ID DE SEC 32 CON Cys? Mutación de Ser en la posición 7
34-38	Equivalentes de KMO.KM1,KM2,KM4 Y KM5 a partir de H20
39	Equivalente de KM a partir de H20
40-47	Variuantes de bariddo de alanita de la ID DE SEC24
48	Km2 (ID DE SEC 24)CON Cys?mutación de Ser en la posición 7
49-57	Variantes de barrido de alanita de la ID DE SEC27
58	Km4 (ID DE SEC 26)CON Cys?mutación de Ser en la posición 7
59	'etiqueta E' en el terminal C del sistema scFv
60-65	CDRs del anticuerpo H6 (fragmentos de la ID DE SEC2)
66-71	CDRs del anticuerpo H20 (fragmentos de la SEQ ID22)

NB: La inclusión de una secuencia de polipéptido en el listado de secuencias no implica ninguna configuración D- o L-particular en sus aminoácidos constituyentes.

MODOS DE LLEVAR CABO LA INVENCION

Anticuerpo Fv de cadena única de H6

El H6 es un Fv de cadena única elevado contra el idiotopo del anticuerpo monoclonal KT4. es un anticuerpo anti-idiotípico levantado con el propósito de mimetizar la actividad de la toxina acecina Pichia anómala (PaKT).

La existencia del scFv H6 ha sido previamente reportada [E. G. ref. 13], pero un método para su fabricación no ha sido previamente descrito, ni tiene su secuencia de aminoácidos. La secuencia del H6 ha sido ahora descrita (ID de SECs 1 y 2). Dentro de la ID de SEC 2, los aminoácidos 107-132 (GT... IE) son un enlazador y los aminoácidos finales 13 (GA... PR; ID de SEC 59) son el "etiqueta E" insertado por el sistema de anticuerpo de fagos recombinantes (Pharmacia BIOTECHT™) usados para crear el scFv.

Los CDRs dentro del H6 son como siguen:

CDR	aa	ID de SEC		CDR	aa	ID de SEC
H1	33-37	60		L1	153-62	63
H2	52-65	61		L2	178-184	64
H3	98-101	62		L3	217-224	65

El H6 scFv tiene efectos microbicidas fuertes in vitro contra importantes microorganismos patogénicos incluyendo: *C. albicans*; *C. krusei* y *C. glabrata* (incluyendo sepas resistentes al fluconazol); *Cryptococcus neoformans*; *A. Fumigatus*; *M. Tuberculosis*; *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, y *Streptococcus pneumoniae* (incluyendo cepas resistentes a la meticilina- vancomicina-y penicilina); *S. mutans*, *leishmania major*, *L. infantum* y *Achantamoeba castellanii*. Más aún, esto muestra actividad terapéutica específica en un modelo in vivo en una candidiasis vaginal de rata por la administración intravaginal.

Anticuerpo monoclonal K20 y derivado H20 de scFv

K10 es un anticuerpo monoclonal de rata anti-idiotípico surgido contra el KT4. Similar al H6 scFv, este muestra

una buena actividad microbicida in Vitro. En adición, se ha mostrado que es terapéutico contra el *P. carinii* neumonía en ratas infectadas por administración por aerosol [16], y en ratones transplantados con células T que invaden el hueso contra la aspergilosis causada por la instilación nasal [14].

Los anticuerpos Anti-idiotipicos fueron surgidos en ratones contra el K10 (es decir anti-anti-anti-idiotipicos con respecto al PAKT). Uno de los anticuerpos que produjeron hibridomas resultantes fueron designado "K20".

El K20 fue ensayado en una unidad formador a de colonias convencional in Vitro (CFU) para evaluar la actividad acecina. Aproximadamente 250 células UP10 de *C. Albicans* que germinan y son susceptibles al PAKT, suspendidas en 10 Ul de PBS, fueron agregadas a 90 pl de K20 para obtener una concentración final de G/ML y se encubo durante 6 h a 37°C. Después de la incubación con reactivos respectivos, las células fungales fueron dispensadas y listadas sobre la superficie de placas agar de dextrosa Sabaugaur, que fueron por lo tanto encubadas a 30°C y sus unidades formadoras de colonias (CFU)

enumeradas después de 48 horas. Cada experimento fue llevado a cabo en triplicado. Un mAb irrelevante fue usado como un control.

Como se muestra en la figura 2, el K20 muestra una actividad ligeramente mejor anti-candida que el K10.

El K20 fue convertido en un anticuerpo scFv usando el sistema de anticuerpo de fago recombinante (farmacia biotech™). El scFv fue designado "H20" y su secuencia se da como la ID de SECs 21 y 22. Los CDRs del H20 son como siguen:

CDR	aa	ID de SEC		CDR	aa	ID de SEC
H1	33-37	66		L1	167-176	69
H2	52-66	67		L2	192-198	70
H3	99-115	68		L3	231-238	71

El H20 fue ensayado en un ensayo CFU (Figura 3) y muestra una actividad candidacidal comparable al H6.

Fragmentos activos del H6

Fragmentos de péptido corto de H6 fueron sintetizados,.
Con énfasis en la secuencia CDR

La síntesis de la fase sólida fue llevada a cabo con un sintetizador de péptido automático multiSynTech Syro (Witten, Alemania) empleando la química Fmoc con activación HOBt y resina de amida MBHA Rink como soporte sólido. Los péptidos fueron clivados a partir de resinas y desprotegidos por tratamiento con ácido trifluoroacético que contenía etanditiol, agua, Triisobutilsilano y anisol (93/2. 5/2/1. 5/1). Después de la precipitación por ether etílico los, péptidos fueron purificados por una columna Vidac C18 (25 cm X 1cm) y caracterizados por análisis de aminoácidos y espectrometría de masa.

Los siguientes péptidos fueron sintetizados:

#	Nombre	ID de SEC	Residuos H6	Basado en CDR
1	KM0	3	146-155	L1
2	KM2	24	91-100	H3
3	KM4	26	146-160	L1
4	KM5	27	155-163	L1

Estos péptidos fueron ensayados en el ensayo CFU para evaluar la actividad acecina.

Como un control, un péptido "revuelto" (ID de SEC 13 "SOP") fue sintetizado en el cual los aminoácidos del KMO fueron reorganizados para tener la composición general de péptido igual pero de secuencia diferente. Esto fue usado en el anterior ensayo en la misma concentración que los péptidos KM ensayados como control para el KMO y el KM4. Para el KM2, el control fue la ID de SEC 28 ("IP" o "péptido irrelevante"). Para KM5, el control fue ID de SEC 31.

Los resultaos para el KMO fueron los siguientes expresados como % de crecimiento en comparación con el control:

Péptido	100 µg/ml	25 µg/ml	6,25 µg/ml
Control SP0	100	100	100
KMO	5,69 ± 0,20	29,84 ± 10,63	67,13 ± 13,81

Los resultados con KMO, KM2, KM4 y KM5 en diversas concentraciones son mostradas en las figuras 4 a 6.

El KMO y KM5 son por lo tanto péptidos anti-candidales extremadamente efectivos. El KM2 es también efectivo, y el KM4 es moderadamente efectivo.

Los CDRs del H6 fueron también preparados en forma aislada (ID de SECs 60-65) y ensayados en cuanto su actividad microbicida en el ensayo CFU con *C. Albicans*. Cada péptido CDR fue ensayado en diluciones escalares para establecer el IC50. los ensayos fueron llevados a cabo en triplicado y el ICSO de cada péptido fue calculado por análisis de regresión no lineal de las curvas obtenidas por graficación del número de CFU contra el Log de la concentración de péptido. Los resultados fueron los siguientes:

Péptido	IC ₅₀	ID de SEC
Cadena pesada		
CDR-1	2,67 X 10 ⁻⁷	60
CDR-2	1,17 X 10 ⁻⁷	61
CDR-3	1,09 X 10 ⁻⁷	62
Cadena liviana		
CDR-1	6,92 X 10 ⁻⁷	63
CDR-2	2,34 X 10 ⁻⁷	64
CDR-3	2,00 X 10 ⁻⁷	65

Los CDRs del anticuerpo H6 por lo tanto muestran una actividad anti-candida significativa, con CDR-3 de la cadena pesada (ID de SEC 62) mostrando la mejor actividad.

Los fragmentos del H6 scFv son por lo tanto capaces de actuar como microbicidas aún que ellos no se esperaría que se mantengan en la misma conformación toxaria que en el anticuerpo intacto.

Polipéptidos que comprenden más de un fragmento de H6

El KMO es derivado del CDR de cadena liviana del H6 y el KM2 es derivado del CDR de cadena pesada del H6. los dos decapeptidos, cada uno de los cuales tiene actividad microbicida por si mismos fueron enlazados con una secuencia rica en glicina (ID de SEC 30) para dar el KM3 (ID de SEC 25).

En comparación al IP en el ensayo CFU el KM3 mostró actividad candidacidal, pero fue más débil que el KMO y KM2 solos (Figura 4).

Sustitución dentro de reemplazo de cisteína en el KMO

El residuo de cisteína en el decapeptido KMO fue sustituido con serina para dar KM1 (ID de SEC 23), con una visión para oxidación reducida y procesos de polimerización. El KM1 mostró actividad similar al KMO en el ensayo CFU (Figura 7) en comparación con el control IP. La sustitución de cisteína con serina por lo tanto no dio una alteración aparente del efecto antibiótico del KMO, pero ofrece una resistencia incrementada a la oxidación y por lo tanto una vida promedio in vivo incrementada.

La ID de SEC 48 es un C? De forma de sustitución S del KM2. La ID de SEC 58 es un C? De la forma de sustitución S del KM4.

Sustitución dentro del barrido de alanina en el KMO

El decapeptido KMO fue analizado por barrido de alanina [32] para poder identificar la contribución funcional de los residuos individuales en su actividad microbiciada.

cada uno de los 10 aminoácidos constituyentes fue reemplazado con A (excepto para el residuo 9, que ya era A) y la actividad en el ensayo CFU in vitro fue logrado. Los resultados fueron los suficientes con valores en % de crecimiento en comparación con el control SPO:

ID DE SEC	100µg/ml	25µg/ml	6,25µg/ml
3	5,69 ± 0,20	29,84 ± 10,63	67,13 ± 13,81
4	0	0	0
5	9,91 ± 3,28	42,67 ± 2,04	53,40 ± 6,99
6	9,27 ± 2,45	19,72 ± 2,91	60,06 ± 5,24
7	9,18 ± 4,13	26,56 ± 4,24	63,24 ± 4,77
8	0,10 ± 0,10	10,12 ± 2,96	40,42 ± 16,01
9	52,89 ± 3,90	55,52 ± 3,7	58,14 ± 8,15
10	55,71 ± 10,20	59,73 ± 4,77	64,25 ± 6,72
11	2,60 ± 0,50	23,12 ± 3,59	72,95 ± 7,42
12	11,90 ± 0,64	32,90 ± 0,79	70,33 ± 9,14
13	100	100	100

El polipéptido más activo es la ID de SEC 4 ('KM'), en la cual el primer aminoácido E es sustituido por A. La ID de SEC 8, en la cual C fue sustituido por A, también muestra buena actividad en relación tanto con el control SP0 y con el decapeptido de partida KM0. La reducción de CFU para estos dos decapeptidos comparados con el control fue

significativo estadísticamente en todas las tres dosis ($p < 0,005$ por el ensayo de dos cola de Student's).

Sobre la base de las secuencias KMO y KM, los péptidos revueltos (SPO, ID de SEC 13 ; SP, ID de SEC 29) fueron también sintetizados. Ninguno de estos dos péptidos revueltos mostró actividad candidacidal in vitro.

El barrido de alanina del KM2 es mostrado en las ID de SECs 40 a 47.

El barrido de alanina del KM5 es mostrado en la ID de SECs 49 a 57.

Truncado en el terminal C de KM

La ID de SEC 4 ('KM') fue reducida por eliminación del terminal C hacia abajo a tres residuos para establecer la habilidad para retener su actividad candidacidal in vitro con relación al control SP. Las diluciones escalares (100-0,8 $\mu\text{g/ml}$) fueron ensayadas para establecer la concentración fungicidal mínima correspondiente a la muerte del 100% de las células C. Albicans. El KM y sus

derivados de truncado fueron también ensayados en diluciones escalares para establecer la concentración de péptido (MOL/l) correspondiente al 50% de la concentración inhibitoria (IC50). Los ensayos se llevaron a cabo en triplicado y el IC50 de cada péptido fue calculado por análisis de relación no lineal de curvas obtenidas por medio de graficar el número de CFU contra el logaritmo de la concentración del péptido usando el software GraphPad prisma 3.02. los resultados fueron como sigue:

ID DE SEC	IC50 (mol/l)
4	$5,6 \times 10^{-8}$
14	5×10^{-5}
15	$2,3 \times 10^{-7}$
16	6×10^{-7}
17	$7,3 \times 10^{-4}$
18	$2,5 \times 10^{-5}$
20	1×10^{-5}

Hay una caída de la actividad candidacidal de cerca de tres órdenes de magnitud con la eliminación de la serina del terminal C del KM. Sin embargo, el heptamero formado por la eliminación de los tres residuos en el terminal C

muestra actividad en un orden de magnitud inferior a aquella del KM.

Oligómeros del KM

Los experimentos sobre la estabilidad del péptido KM aecino después de la liofilización fueron llevados a cabo usando el ensayo CFU. El KM probó ser muy estable en la forma liofilizada.

Después de la solubilización en condiciones de no reducción, la cisteína libre en el KM puede llevar a la formación de puentes de disulfuro para dar un dímero KM. La actividad candidacidal del dímero fue lograda por comparación al péptido SP dimerizado. El dímero KM con enlaces de disulfuro retuvo su actividad candidacidal. Más aún, esta actividad fue mantenida sin alteración durante un periodo largo bajo diferentes condiciones de almacenamiento (4°C, temperatura ambiente, 37°C).

Actividad in vivo del KM en modelo de infección vaginal.

El KM fue ensayado usando un modelo experimental bien establecido [71] de la infección vaginal por *C. albicans*

en ooforectomizadas tratadas con estrógeno. Las ratas condicionadas por el estrógeno (5 animales por grupo) fueron inoculadas intravaginalmente con 10^7 células del *C. Albicans* sensibles al fluconazol (SA-40) o resistente al fluconazol (AIDS 68). Ambas sepas de candida fueron aisladas originalmente de la infección vaginal human, y mantenidas en colecciones en el departamento de biología y micología medica del Instituto Superior de la Sanidad (ISS), Roma (Italia). Diferentes dosis (10,25, 50 y 100 μ g) de KM fueron administrada intravaginalmente a 1,24 y 48 horas luego del reto y la carga del *C. albicans* vaginal fue cuantificada por enumeración CFU a partir de los fluidos vaginales tomados cada día por un lazo calibrado especial. Frotis vaginales fueron también coloreados por el método PAS-van Gieson. Cualquier beneficio del tratamiento KM fue logrado en términos de reducción microscópica del crecimiento Hispal en la vagina. Los controles negativos fueron en ratas no tratadas y las ratas tratadas con SP. Como un control positivo, las ratas recibieron 50 o 100 μ G/ML de fluconazol (Pfizer) en PBS (0,1 ml) a 1,24 y 48 horas después del reto por levadura.

Un efecto terapéutico de respuesta a la dosis fue observado en las dosis 50 y 100 μ G.

En experimentos posteriores, 50 μ G de KM fue usado en el programa de administración de las tres dosis establecido para determinar la aceleración de la clarificación de CFU fungal durante un periodo de 28 días. Ratas (cinco por grupo) se les dio 10^7 células en 0,1 ml de solución fisiológica en el día 0 y fueron muestreadas para una CFU intravaginal inicial. Los tratamientos fueron administrados 1, 24 y 48 horas después del reto.

La Figura 8 muestra los resultados de un experimento típico con la sepa SA-40. En cada punto del tiempo hubo una diferencia significativa estadísticamente ($p < 0.05$ por el ensayo t de dos colas de Student's) en las cuentas del CFU vaginal entre (a) ratas no tratadas o tratadas con SP y (b) ratas tratadas con KM o con fluconazol. No hubo diferencia significativa entre las ratas no tratada y las tratadas con SP, y no hubo diferencia significativa entre las ratas tratadas con KM y las que se trataron con fluconazol.

El KM acelera significativamente las rata temprana de planificación (1-5 días) de los hongos de la vagina de la rata, también suministran una resolución sustancial de la infección (menos de 10^3 CFU/ML de fluido vaginal) dentro de las tres semanas desde el reto, cuando los controles o tratados todavía tenían entre 2 a 4×10^4 CFU/ML de candida en el fluido vaginal. Ninguna aceleración de la clarificación fungal y ningún efecto sobre la resolución de la infección fue provisto por la administración de SP. El beneficio terapéutico del KM fue sustancialmente comparable con aquel del fluconazol.

Los resultados para ambas sepas de ensayo durante 28 días fueron los siguientes:

Grupo Experimental CFU ($\times 10^3$) Vaginal C. albicans ($\pm$ SD) en días				
	0	7	14	28
1. C. albicans SA sin tratamiento	>100	98 $\pm$ 12	42 $\pm$ 7	38 $\pm$ 1
2. C. albicans SA-40+50 μ g fluconazol	>100	13 $\pm$ 4	2 $\pm$ 1	<1
3. C. albicans SA-40 + KM	>100	12 $\pm$ 7	1 $\pm$ 1	<1
4. C. albicans AIDS 68, sin tratamiento	>100	70 $\pm$ 10	55 $\pm$ 8	18 $\pm$ 3

5. C. albicans AIDS 68 + 100µg fluconazol	>100	64±6	48±3	12±4
6. C. albicans AIDS 68 + KM	>100	40±5	18±2	<1

En los días 7,14 y 28, las diferencias en las cuentas de CFU vaginal fueron significativa estadísticamente ($p<0,05$, en el ensayo t de Student de dos colas) entre:

- grupo 1 y grupo 2
- grupo 1 y grupo 3
- grupo 4 y grupo 6
- grupo 1 y grupo 5
- grupo 1 y grupo 6
- grupo 5 y grupo 6

No hubo diferencias estadísticamente significativas entre:

- grupo 2 y grupo 3
- grupo 4 y grupo 5

En contraste al tratamiento con 100µg de fluconazol, el KM tuvo un efecto terapéutico también en la infección

vaginal de rata causada por la sepa *C. Albicans* resistente al fluconazol.

Actividad anti-Candida in vivo del KM en modelo de infección sistémica

Km fue ensayado usando un modelo de ratos sistémico rápidamente letal bien establecido [72] de la infección *C. albicans*. Los grupos de 8 ratones Balb/C embras (peso 18-21 g) fueron retados con 5 LD₅₀ (10⁷ células de SA-40) por vía intravenosa. 50µg de Km fueron administrados intraperitonealmente durante 3 días empezando en el día cero (es decir una hora después del reto fungal) y en 24 y 48 horas de ahí en adelante. Los controles fueron animales nitrados o animales tratados con el péptido SP (misma dosificación y programación de tratamiento que aquellos tratados con KM). Los animales fueron entonces vigilados en cuanto mortalidad e innovación de órganos internos durante 60 días. Cualquier efecto benéfico fue establecido en términos de prolongación del tiempo medio de supervivencia (en días) y reducción de mortalidad total. El logro por necropsia mostró que la muerte de

los animales fue debido al hongo, y la invasión de órganos internos mostró invasión por *C. albicans*.

En experimentos paralelos, ratones SCID fueron usados en lugar del ratón inmunocompetente para poder verificar si el efecto curativo del KM requirió de la participación de la inmunidad adaptativa anfitrión. Estos experimentos usaron la misma carga fungal de reto, el programa de KM y SP en los tratamientos, y los puntos extremos de mortalidad causada por *C. albicans* según se describió anteriormente.

En todos los experimentos, el KM ejerció un efecto terapéutico beneficioso similar en términos de retardo de la mortalidad y cura de animales (60 días). Como un ejemplo típico, la figura 9 muestra la curva de supervivencia Kaplan-Meyer de ratones SCID retados con 5X LD₅₀ de *C. albicans* y tratados con 50µg de KM, gluconasol o SP, o sin tratamiento. El KM fue visto que incrementó el tiempo de supervivencia promedio de un día comparado con los controles no tratados a más de 60 días. Adicionalmente, solamente 1/8 de los animales tratados con KM murio cuando se comparó a 8/8 muertes en ratones no

tratados o aquellos tratados con SP: En todos los casos, la muerte fue atribuible al reto por *C. albicans* como se mostró por la carga de hongos en los riñones. La figura 9 muestra que el KM se comportó mucho mejor que el fluconasol.

Bloqueo de la Actividad Km por Glucanes

Como se ha mostrado anteriormenete, el Km muestra una actividad anti candida. Como el Km está relacionado de manera distante al anticuerpo KT, que interactúa con glucanes β de superficie celular, el involucramiento posible de los glucanes en la actividad Km fue investigada.

El ligado del KT mAb a células de germinación de *C. albicans* fue involucrado por inmunofluoresencia (12). El KM inhibió completamente el ligado de KT a las células, mientras que el SP no lo hizo.

En experimentos adicionales, el ensayo CFU fue llevado a cabo como se mencionó antes, usando 25 μ g/ml de KM o SP, excepto en diversas concentraciones (entre 12,5 μ g/ml y

100µg/ml) de laminarian (β -1,3-glucan, de sigma) o pustulan (β -1,6-glucan de Calbioquem) fueron incluidos.

Los resultados son los siguientes:

GLUCAN	Conc ⁿ (µg/ml)	CFU con KM	CFU con SP
Ninguno	-	0	2822.00± 122,00
Laminarina	12,5	0	2525,33± 92,72
Laminarina	25	1,33±0,58	2780,00±264,21
Laminarina	50	115,33±12,58	2742,66±105,09
Laminarina	100	2766,66±63,54	2740,00±282,13
Pustulan	12,5	0	2380,00± 148,04
Pustulan	25	0	2500,00± 52,00
Pustulan	50	0	2666,00± 306,49
Pustulan	100	0	2824,00± 119,82

Así la actividad candidacidal de KM fue inhibida fuertemente y muy dependiente de dosis por la laminarina pero no por el pustulan.

Estos datos sugieren el decapeptido KM candidacidal compite por el sitio de ligado de KT-IdAb sobre las

paredes de las células fungal y el receptor parece contener β -1-3 glucanes.

Actividad Anti-A. Castellani

En adición a su actividad anticándida. El péptido KM y el anticuerpo monoclonal K20 fueron ensayados en cuanto su actividad contra trofosoitos (forma infecciosa) de la amiba de suelo eucariótica libre *Acanthamoeba Castellani*, una causa de encefalomiелitis y queratitis que puede causar inflamación severa ocular y pérdida visual.

Se hizo crecer A. Castellani en medio PYG a 37° C o 25° C en la presencia de péptidos SP o KM a 1µg/ml 10µg/ml o 100µg/ml (o, como un control, sin ningún péptido). El efecto sobre el crecimiento durante 6 días, en términos de números de trofosoitos, es mostrado en la figura 14. Como se ve en las figuras 14C y 14D, el péptido SP revuelto no tiene actividad antimicrobial a 37° C o a 25°C, mientras que el KM (figuras 14A y 14B) muestran una buena actividad antimicrobial.

La figura 15 muestra la actividad in Vitro del KM a 190µg/ml sobre la viabilidad celular del *A. Castellani* evaluado a 25° C en comparación con el SP. La figura 15A muestra una reducción en la viabilidad celular ($p<0,05$) después de 6 horas de co.incubación. La figura 15B muestra una reducción similar ($p<0,05$) después de seis horas de coincubación seguido por 18 horas de incubación seguido en medio PYG fresco.

El efecto inhibitorio del anticuerpo monoclonal antidiotípico K20, ensayado durante 6 días a 37° C de la misma manera como se describió para el KM, es mostrado en la figura 16, El efecto puede ser comparado a aquel del K10 monoclonal de rata (Figura 17) después de 6 días de incubación, el número de trofosoitos por poso que usa el K20 fue inferior que cuando se uso K10 a 25µg (2700 versus 3100) y 50µg (2800 versus 3080).

Rango de Actividad del KM

El KM muestra una actividad potente anti *C. Albicans* y anti - *A. Castellani*. El KM también se encontró que era efectivo contra otros microorganismos que son muy

importantes desde un punto de vista epidemiológico, tales como las sepas resistentes a las multidrogas de la *Cándida* spp. Y la *Mycobacterium tuberculosis*, *Cryptococcus neoformans* (figura 10) y *Aspergillus fumigatus* , pero también contra sepas resistentes a la meticilina de *Staphylococcus aureus* (figura 11), y sepas resistentes a la penicilina del *Streptococcus pneumoniae*.

Sorprendentemente, el KM también se encontró que tenía una actividad antiviral contra el virus de la influenza A y el HIV-1.

Virus de la Influenza A

El efecto del Km sobre la replicación del virus de influenza fue comparado al control del péptido SP revuelto. Como control adicional, la replicación en medio mantenido solo fue ensayada.

Dos diferentes sepas del virus de influenza tipo A (Ulster/73/H7N1, avian; NWS33/H1N1, neurovirulento humano) han sido demostrados previamente que se replican eficientemente en LLC-Mk2 (riñon de mono Rhesus), MDCK (riñón canino Madin Darby) y AGMK-37RC (Riñón de mono

verde africano) en cultivos celulares. Las monocapas confluentes de las diferentes líneas celulares fueron infectadas con el virus ($\text{moi} = 20$ pfu, mayor de lo normal en infección in vivo) en PBS precalentado (pH 7,4). Después de un periodo de 40 minutos de absorción, el medio de mantenimiento (MM) contenía KM o SP que fue agregado a los cultivos celulares y el título de virus fue determinado después de 24, 36, 48 o 72 horas de infección por la titulación hemaglutinina (HA) en muestras triplicadas sobre nadantes celulares, después con centrifugación a 2000Xg para remover los desechos celulares.

El efecto de KM y SP sobre los títulos HA 24 horas después de la infección de las células LLC-MK2 por Ulster/73 se muestra en la figura 18. A 50 $\mu\text{g}/\text{ML}$ o por debajo, el KM y el SP tenían poco o ningún efecto sobre el crecimiento viral. A 60 $\mu\text{g}/\text{ML}$, sin embargo, el péptido KM interfiere con el crecimiento viral, con bloqueo completo a 80 $\mu\text{g}/\text{ML}$. Efectos similares fueron vistos para otros virus, con las otras líneas celulares, y en otros puntos de tiempo. Así el KM puede suprimir la replicación viral de una manera dependiente de dosis.

En un conjunto diferente de experimentos, MM fresco que contiene KM o SP agregado a las células en el tiempo 0 y luego sustituidos con la misma mezcla de péptido /medio cada 12 horas a partir de las 24 horas y terminando a las 72 horas. El KM a 80µg/ml fue capaz de bloquear completamente la producción viral en todos los puntos de tiempo ensayados. Usando SP, los títulos virales fueron similares a aquellos obtenidos para el crecimiento en MM solamente.

El efecto del KM sobre la replicación del virus de influenza fue también ensayado usando en ensayos de emadsorpción. El HA es sintetizado durante la replicación e insertado dentro de la membrana celular antes de la germinación viral. La emadsorpción de células de sangre rojas a células infectadas se correlaciona con la integridad del HA glicosilatado lo mismo que con su inserción correcta dentro de la membrana celular.

Los cultivos celulares fueron insertados, tratados con 80 µg/ml sea de KM o SP, según se describió anteriormente, y los ensayos de emadsorpción fueron llevados a cabo 48

horas después. Una reducción significativa del OD₄₂₀NM fue observada en las células infectadas tratadas con KM, demostrando una reducción significativa de las moléculas HA virales sobre la membrana de plasma de aquellas células. Ni el KM ni el SP interfieren con los receptores específicos de virus sobre las células de sangre rojas (RBC).

Finalmente, el efecto de la laminarina (β -1, 3-glucan) sobre la actividad anti influenza fue determinada. Como se muestra anteriormente, la laminarina interfiere con la actividad candidadisal del KM. El KM o el SP (80 μ G/ML) fueron mezclados con laminarina (320 μ G/ML) y la mezcla fue agregada a células infectadas en el momento 0. sin preincubación o después de 10 minutos de preincubación. Títulos HA similares fueron obtenidos depuse de 24 horas usando KM/Laminarina y SP/laminarina, sugiriendo que la laminaria elimina la actividad anti viral del KM. Este efecto no fue visto con postulan.

HIV-1

El efecto del KM sobre la replicación de HIV-1 fue comparada con el control del péptido SP revuelto. El HIV-1 puede replicarse en células mononucleares de sangre periferales (PBMC) en cultivos en la presencia de IL-2 exógeno [73]. Para ensayar la actividad del KM, cultivos de PBMC fueron obtenidos a partir de paciente en fases de infección aguda en quienes la carga proviral HIV-1 era conocida.

Los PBMCs fueron cultivados en placas de 48 pozos a concentraciones de 10^6 células/ML en un medio RPMI 1640 suplementado con 10% de FCS en la presencia de 50 U/ML de RIL-2. La mitad del medio de cultivo fue agregada en el día 8. Los sobre nadantes y las células fueron cosechadas para análisis de ARN de HIV y contenidos pro virales, respectivamente. El RIL-2 exógeno fue agregado cada 3 a 4 días, el péptido KM-o SP fue agregado cada 7 días. La expresión de HIV-1 fue determinada usando el Kit ramificado de ARN de HIV (b-ADN, Bayer™), mientras que la carga proviral de HIV-1 fue determinada usando el Kit EOACGAG de detección de genes HIV-1 (Zeptomatrix™). Para la determinación del fenotipo, las células fueron analizadas por citometría de flujo después del marcado con mAbs directamente a los antígenos de CD.

Después del aislamiento del PBMC la mayoría del PBMC de los cultivos de HIV eran linfocitos T, como se muestra por la expresiones (CD4+ = 41%; CD8+ = 36%). Todos los cultivos de PBMC primarios permanecieron viables aparentemente durante por lo menos 20 días. En la presencia del IL-2 exógeno, todos los CD3+ células T expresaron CD25 y HLA-DR en la activación de la superficie celular como marcadores después de 7 días de cultivo.

Los cultivos primarios fueron establecidos de los PBMC preservados de los pacientes en la presencia de concentraciones 1x y 10x del péptido (1 μ LG y 10 μ G, respectivamente). Como controles, el péptido SP fue usado a las mismas concentraciones. Otros cultivos de control (células no tratadas) recibieron solamente el medio.

La cinética de la producción del ARN del HIV en puntos de tiempos diferentes de los cultivos PBMC es mostrada en la figura 19. los cultivo mostraron picos tempranos de copias virales dentro de 5 a 10 días del cultivo las cuales entonces disminuyeron en correspondencia a la

perdida inducida HIV-1 de las células CD4+. La replicación del HIV en estos cultivos PBMC fue considerablemente inferior en la presencia de KM (< a 44%, .promedio), tanto con concentraciones de KM que tenían efectos similares sobre los niveles cinéticas de la producción del ARN del HIV.

Las células tratadas con SP mostraron los mismos niveles y cinéticas de producción del ARN del HIV como los controles no tratados.

Derivados de aminoácido D del KM y KM0

El KM0 y KM fueron sintetizados usando los mismos residuos de aminoácidos, pero en la conformación D en lugar de la conformación L (KM6 y KM7). Los péptidos revueltos de control SPO y SP también fueron sintetizados usando aminoácidos D.

El KM6 y KM7 cada uno mostraron actividad candidacidal en el ensayo CFU (Figura 12). La actividad fue ligeramente inferior que en los polipéptidos de aminoácidos L, pero esta reducción in vitro no fue tomada

en cuenta en el incremento in vivo en la mitad de vida que se debería esperar.

Un polipéptido de aminoácido D con tanto Glu?, Ala y Cys? Ser como sustituciones (ID de SEC 33) es útil.

Toxicidad

La toxicidad del KM fue involucrada por la incubación in vitro con células de riñón del mico rhesus LLC-MK2. las células fueron mantenidas en un medio esencial mínimo Eagle (MEM) suplementado con 10% de suero bovino fecal, 100 U/ML de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina a 37°C en una atmósfera humificada que contiene 5% de CO₂. Las células fueron plateadas en triplicado en platos de 6 pozos a 4×10^4 células por pozo y cultivadas durante 24 horas. Diluciones seriales de péptidos (concentraciones finales entre 0 y 500 µG/ML) en el medio que contenía 10% de suero bovino fetal fueron entonces agregadas a las células e incubados durante 24 horas a 37°C. Las células fueron tratadas subsecuentemente con MTT (50 µg por pozo) e incubadas durante otras 2 horas. Luego de la solubilización de la tinta formazan en DMSO, la

absorbancia de cada pozo fue medida a 550 y 620 nm. El péptido SP también fue ensayado.

La viabilidad celular fue expresada como T/C% en donde T representa la absorbancia media de las células tratadas y C la absorbancia media de los controles (figura 20).

El péptido no mostró efectos tóxicos, aún a 500µg/ml.

Péptidos equivalentes desde dentro de H2O

Una alineación de las secuencias H6 y H20 se da en seguida, con los CDRs:

[illegible]

La secuencia del péptido H20 corresponden a los péptidos H6KM, KM0, KM1, KM2, KM4 Y KM5 son:

H6	KM0	KM1	KM2	KM4	KM5	KM
H6 ID DE SEC	3	23	24	26	27	4
H20 ID DE SEC	34	35	36	37	38	39

Será entendido que la invención ha sido descrita como via de ejemplo solamente y modificaciones pueden ser hechas las cuales permanecen dentro del alcance y espíritu de la invcencoión.

REFERENCIAS (el contenido de los cuales se incorpora aquí como referencia)

- [1] Magliani et al. Clin. Microbiol. Rev. , 10: 369-400,1997
- [2] Polonelli et al. J. Clin. Microbiol., 24: 866-869,1986
- [3] Aliouat Et al. Serodiagn. Immunother. Infect. Dis. , 5: 102-106,1993
- [4] Conti et al. J. Infect. DIS., 177: 807-811,1998
- [5] Polonelli y Morace J. Clin. Microbiol., 25: 460-462,1987 [6]
- Polonelli y Morace J. Clin. Microbiol., 26,602-604, 1988
- [7] Polonelli et al. Scan. J. Immunol., 37: 105-110,1993
- [8] Polonelli et al. J. Immunol., 152: 3175-3182,1994
- [9] Séguy et al., FEMS Immunol. Med. Microbiol., 22: 145-149,1998
- [10] Polonelli et al., J. Immunol. 156: 1880-1885,1996
- [11] Séguy et al. Mol. Med. , 3: 544-552, 1997
- [12] Polonelli et al., Clin. Diagn. Lab. Immunol., 4: 142-146,1997
- [13] Magliani et al., Nature Biotechnol., 15: 155-158,1997
- [14] Cenci et al. Infect Immun 2002 May; 70 (5): 2375-2382

- [15] Conti et al., Mol. Med. , 6/7: 613-619,2000
- [16] Séguy et al., J. Euk. Microbiol., 44: 37S, 1997
- [17] Breedveld (2000) Lancet 355 (9205): 735-740.
- [18] Gorman y Clark (1990) Semin. Immunol. 2: 457-466
- [19] Jones et al. Nature 321 : 522-525 (1986)
- [20] Morrison et al., Proc. Natl. ACAD. Sci, US. A., 81 : 6851-6855 (1984)
- [21] Morrison y Oi, Adv. Immunol., 44: 65-92 (1988)
- [22] Verhoeyer et al., Science 239 : 1534-1536 (1988)
- [23] Padlan, Molec. Immun. 28: 489-498 (1991)
- [24] Padlan, Molec. Immunol. 31 (3): 169-217 (1994).
- [25] Kettleborough Et al., Protein Eng. 4 (7) : 773-83 (1991).
- [26] WO 98/24893
- [27] WO 91/10741
- [28] WO 96/30498
- [29] WO 94/02602
- [30] US Patent 5,939, 598.
- [31] Goletz et al. J Mol Biol 2002 Feb 1 ; 315 (5): 1087-97
- [32] Morrison y Weiss (2001) Curr. Opin. Chem. Biol. 5: 302-207.
- [33] Weiss et al. (2000) PNAS USA 97: 8950-8954.
- [34] Carter (1994) Methods Mol Biol 36 : 207-223.

- [35] Li y Roller (2002) Curr Top Med CHEM 2 : 325-341.
- [36] Bodanszky (L 993) Principles of peptide synthesis (ISBN: 0387564314).
- [37] Fields Et al. (1997) methods in enzymolo 289 : solid-phase peptide synthesis. ISBN : 0121821900
- [38] Chan y White (2000) Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis ISBN: 0199637245.
- [39] Kullmann (1987) Enzymatic Peptide Synthesis. ISBN: 0849368413.
- [40] Ibba (1996) Biotechnol Genet Eng Rev 13: 197-216.
- [41] Strugnell et al. (1997) immunol cell biol 75 (4): 364-369.
- [42] Robinson y Torres (1997) Seminars In Immunol 9 : 271-283.
- [43] Donnelly et al. (1997) Annu Rev Immunol 15: 617-648.
- [44] Brunham et al. (2000) J Infect Dis 181 Suppl 3: S538-43.
- [45] Svanholm Et al. (2000) scand J Immunol 51 (4): 345-53.
- [46] Beninati Et al. (2000) Nature Biotechnology 18: 1060-1064.
- [47] Bevan & Makower (1963) Pages 202-203 Of Geerts (Ed.), Genetics Today, Xith International Congress On Genetics Vol. 1. Pergamon Press, Oxford, England.

- [48] Kazmierski (1999) Peptidomimetics Protocols. ISBN: 0896035174.
- [49] Abell (1999) Advances In Amino Acid Mimetics And Peptidomimetics. ISBN: 0762306149.
- [50] US Patent 5,331, 573 (Balaji).
- [51] Goodman et al. (2001) Biopolymers 60: 229-245.
- [52] Hruby & Balse (2000) Curr Med Chem 7 : 945-970.
- [53] Ribka & Rich (1998) Curr Opin Chem Biol 2 : 441-452.
- [54] Chakraborty Et al. (2002) CURR MED CHEM 9: 421-435.
- [55] Computer-Assisted Lead Finding And Optimization (Eds. Testra & Folkers, 1997).
- [56] Available From Molecular Simulations Inc ([Http ://WWW. Msi. Com/](http://www.msi.com/)).
- [57] Davic & Lawrence (1992) Proteins 12: 31-41.
- [58] Caflish et al. (1993) J. Med. Chem. 36: 2142-67
- [59] Eisen et al. (1994) Proteins : Str. Funct. Genet. 19: 199-221.
- [60] Böhm (1992) J. Comp. Aided Molec. Design 6: 61-78.
- [61] Gehlhaar et al. (1995) J. Med. Chem. 38: 466-72.
- [62] Moon & Howe (1991) PROTEINS : STR. FUNCT. GENET. 11 : 314-328..
- [63] Available From [Http ://Chem. Leeds. Ac. UK/ICAMS/SPROUT. Html.](http://chem.leeds.ac.uk/icams/spROUT.html)

- [64] Lauri & Bartlett (1994) *Comp. Aided Mol. Design* 8: 51-66.
- [65] Available From Tripos Inc ([Http ://WWW. Tripos. Com](http://www.com.com)) .
- [66] Rotstein Et al. (1993) *J. Med. Chem.* 36 : 1700.
- [67] Lai (1996) *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 36: 1187-1194.
- [68] Gennaro (2000) *Remington : The Science And Practice Of Pharmacy*. 20th Ed. , ISBN: 0683306472
- [69] Almeida & Alpar (1996) *J. Drug Targeting* 3: 455-467.
- [70] Wills et al. (2000) *Emerging Therapeutic Targets* 4: 1-32. .
- [71] De Bernardis et al., In *Handbook Of Animal Models Of Infection* (Eds. Zak, O. & Sande, M. A.) 735-740, Academic Press, New York, 1999
- [72] Mencacci et al., *Infect. Immun.* , 62: 5353-5360,1994
- [73] Casoli et al. (2000) *Blood* 95 : 2760-2769.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende: por lo menos una secuencia de aminoácido que es un fragmento de por lo menos x aminoácidos de la secuencia de aminoácido de una región variable de un anticuerpo anti idiopático que reconoce el idiotipo de un anticuerpo específico para la toxina asesina de la levadura, opcionalmente con Y aminoácidos dentro de dichos x aminoácidos sustituidos por diferentes aminoácidos, en donde x es por lo menos 3 y Y es por lo menos 1.
2. El polipéptido de la reivindicación 1, que consiste de por lo menos 3 aminoácidos.
3. El polipéptido de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que consiste de a lo sumo 90 aminoácidos.
4. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que consiste entre 8 y 20 aminoácidos.

5. El polipéptido de la reivindicación 4, que consiste de 10 aminoácidos.
6. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde x es por lo menos 8.
7. El polipéptido de la reivindicación 6, en donde x es 10.
8. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en donde por lo menos un aminoácido dentro de dichos x aminoácidos es sustituido por diferentes aminoácidos.
9. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el fragmento de por lo menos x aminoácidos preferiblemente incluye por lo menos un aminoácido de un CDR dentro del anticuerpo.
10. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende aminoácidos L y/o aminoácidos D.

11. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende la secuencia AA₀-AA₂-AA₃-AA₄-AA₅-AA₆-AA₇-AA₈-AA₉-AA₁₀, en donde: cada uno de los AA₁..... AA₁₀; es independientemente un aminoácido D o L; AA₁ es E, A o G; AA₂ es K, A o G; AA₃ es V, A o G; AA₄ es T, A o G; AA₅ es M, A o G; AA₆ es T, A o G; AA₇ es C, S, A o G; AA₈ es S, A o G; AA₉ es A o G; y AA₁₀ es S, A o G; Siempre que no más de 4 entre AA₁ AA₂ AA₃, AA₄, AA₅, AA₆, AA₇, AA₈, AA₉, y AA₁₀ sean A y siempre que no más de 2 entre AA₁ AA₂ AA₃, AA₄, AA₅, AA₆, AA₇, AA₈, AA₉, y AA₁₀ sean G.

12. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 que comprende la secuencias de aminoácido ID DE SEC número 3,4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17,18, 19, 20, 23,24, 25,26, 27,32, 33,34, 35,36, 37,38, 39, 40,41, 42,43, 44, 45, 46,47, 48, 49, 50,51, 52, 53, 54,55, 56,57, 58,60, 61,62, 63,64, 65,66, 67,68, 69,70 y 71,con aminoácidos constituyentes en la configuración D y/o L.

13. El péptido de la reivindicación 12, que consiste de la ID DE SEC 3,4,23,27 O 33.
14. Un polipéptido que consiste de la ID DE SEC 1 o la ID DE SEC 33, y consistente de aminoácidos D.
15. Un compuesto peptidomimético microbicidal que es isostérico con respecto al polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.
16. Un anticuerpo antiidiotípico que reconoce el idiotype de un anticuerpo específico para una toxina asesina de levadura, con la condición de que el anticuerpo antiidiotípico no sea el anticuerpo monoclonal K10 de rata.
17. Un anticuerpo que reconoce el idiotype de un anticuerpo de la reivindicación 16.
18. El anticuerpo de la reivindicación 16 o la reivindicación 17, en donde el anticuerpo es un anticuerpo Fv de cadena única.

19. El antiucuerpo de la reivindicación 18, en donde el anticuerpo es H6 o H20.
20. El anticuerpo de la reivindicación 15 o la reivindicación 16, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
21. El anticuerpo de la reivindicación 20, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humano o humanizado.
22. El anticuerpo de la reivindicación 21, en donde el anticuerpo comprende 1 o más CDR entre H6, H20 o K20.
23. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 22, en donde la toxina es la toxina asesina del *P.anomala*.
24. Un polipéptido que comprende: por lo menos una secuencia de aminoácido que es un fragmento de por lo menos X aminoácidos de la secuencia de aminoácido de una región variable de un anticuerpo de uno cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23, opcionalmente con Y aminoácidos dentro de dichos X

aminoácidos sustituidos por diferentes aminoácidos, en donde X es por lo menos 3 y Y es por lo menos 1.

25. El ácido nucleico que codifica un péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 y 24, y/o un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23.

26. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23, o el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que tiene una actividad antimicótica y/o actividad antibiótica.

27. Un proceso para preparar el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende la síntesis química de por lo menos un enlace péptido.

28. El proceso de la reivindicación 27, en donde el polipéptido es sintetizado químicamente en completo.

29. El proceso de la reivindicaciones 27 o la reivindicación 28, que comprende adicionalmente la etapa de formular el polipéptido en una composición farmacéutica.
30. Una composición farmacéutica que comprende (a) el anticuerpo, polipéptido, péptido mimético o ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, y (b) un vehículo farmacéutico.
31. La composición farmacéutica de la reivindicación 30, que es estéril, libre de pirogeno y amortiguada entre pH6 y pH8.
32. El anticuerpo, polipéptido, péptido mimético, o ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, para ser usado como un medicamento.
33. Un método para tratar un paciente que sufre de una infección microbiana y/o viral que comprende administrar al paciente la composición farmacéutica de la reivindicación 30.

34. El uso de un anticuerpo, polipéptido, péptido mimético o ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, en donde la fabricación de un medicamento para tratar infecciones microbiales y/o virales.

RESUMEN

Anticuerpos antiidiotípicos que reconocen el idiotipo de un anticuerpo específico para la toxina asesina de la levadura posee actividad microbicidal. Los fragmentos (por ejemplo decapeptidos) de estos anticuerpos antiidiotípicos, particularmente aquellos que comprenden residuos CDR, también muestran actividad microbicidal, como lo hacen los péptidos que tienen las mismas secuencias pero compuestos de aminoácidos D, o que incluyen sustituciones de aminoácido. Los péptido miméticos de estos polipéptidos microbicidales también se suministran. La actividad antiviral es también vista.



FORMATO DE DIGITALIZACION
RELACION DE ANEXOS



Royal
Technologies S.A.
Desarrollamos Soluciones de Automatización y Control

Expediente No		No de Folio
Item	No de unidades	
1	CD	
2	DVD	
3	REVISTA	
4	LIBRO	
5	PERIODICO	
6	DISQUETES	
7	SOBRE DE MANILA	
8	SOBRE BLANCO TAMAÑO CARTA	
9	SOBRE BLANCO TAMAÑO OFICIO	✓
10	OTROS:	
Observaciones: ante final		

255

258

SUPERINDUSTRIA Y CREACION

Radicacion : 04124128 00000000 Folios: 236
Fecha (CIB): 2004-12-10 16:51:10
Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE HACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2029 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800178089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 04 - 92,146
FECHA : NOVIEMBRE 29 DE 2004

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	32758697	29/11/2004	53,650,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	422,000.00
		TOTAL :	\$ 422,000.00

SON: CUATROCIENTOS VEINTIDOS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

606 14569 841 001 9.

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL
TRAMITE

	REQUISITOS	AGILIZACION
PATENTE DE INVENCION	MODELO DE UTILIDAD	
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
- Descripción de la invención.	()	()
- Dibujos de ser estos pertinentes.	()	()
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA	()	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 o 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 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 de trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA	()	INCOMPLETA ()

Firma Responsable:

Fecha:

258



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

2020

Bogotá D C

Doctor(a)

EMILIO FERRERO

Apoderado(a)

UNIVERSITA DEGLI STUDI DI SIENA, LUCIANO POLONELLI Y ANTONIO CASSONE

11877

REFERENCIA:	Radicación N°	04-124128
	Solicitud internacional	PCT/IB03/02348
	Fecha inicio fase nacional	2004-12-10
	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 Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

- La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando éste fuere una persona jurídica.
- La solicitud no contiene copia del documento en que consta la cesión del derecho de patente del inventor al solicitante o a su causante (Art. 26-k) Decisión 486).
- El solicitante debe presentar un nuevo título, que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente (Regla 4.3 PCT, Art. 27, 27 Decisión 486, Circular Única 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 Única N° 10 de 2001.

DORIS ELENA POLO CORDOBA

Jefe de la División de Nuevas Creaciones (E)

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

202063

14 ENE. 2005



14 ene 2005

