

BT



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21 EXPEDIENTE N°

05-40022

54 TÍTULO **PEPTIDOS TERAPEUTICOS**

51 CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL **C07K 14/705**

71 SOLICITANTE **UNIVERSITY OF BRISTOL**

DOMICILIO **BRISTOL REINO UNIDO**

74 REPRESENTANTE LEGAL **ALICIA LLOREDA RICAURTE**
T P 53 215

22 BOGOTÁ D C **27 ABR 2005**

PETITORIO



Radicación : 05040022 00000000
Fecha (VFD): 2005-04-27 16:15:44
Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACT 411 PRESENTM
Dependencia: 2000 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Folios: 117

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: UNIVERSITY OF BRISTOL

Dirección: Senate House, Tyndall Avenue,
Bristol BS8 1TH, Reino Unido.

Nacionalidad o Domicilio: Bristol, Reino Unido.

Lugar de Constitución:

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: ALICIA LLOREDICAURTE

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º,
Bogotá- Colombia

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 39.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES)
(72)

Nombre: VIRJI, Mumtaz.

Dirección: Department of Pathology and Microbiology, School Of Medical
Sciences, University Of Bristol, University Walk, Bristol BS8 1TD.

Nacionalidad o Domicilio: Reino Unido.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/GB2003/004273

Fecha: 01/10/03

Publicación Internacional No. WO 2004/031236 A2

Fecha: 15/04/04

⑥

Título (54)

"PEPTIDOS TERAPEUTICOS"

⑦

Clasificación Internacional (51) C07K 14/705

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

GB

(32) Fecha

02/10/02

(31) Número de Solicitud

0222764.3

⑨

Comprobante de Pago No. 05-27,606

Fecha: Abril 15 de 2005

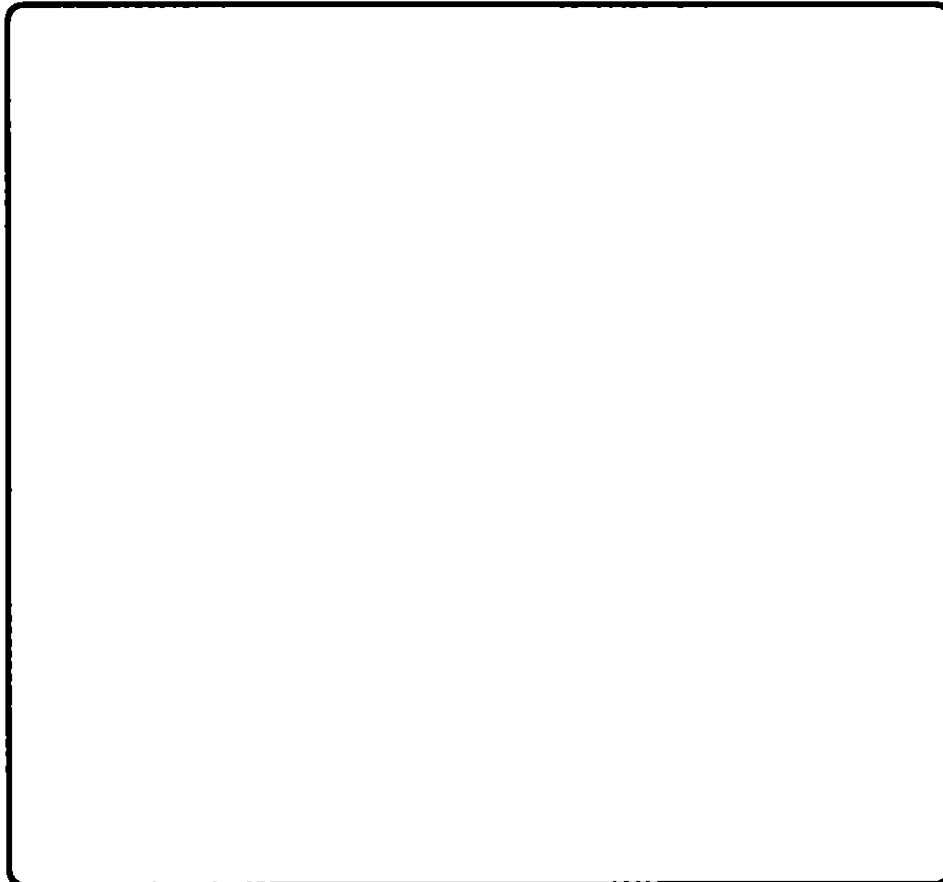
10

ANEXOS

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

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesion de la patente

NOMBRE: ANCIA LOPEZ RICAURTE

FIRMA: ANCIA LOPEZ RICAURTE

C.C. 39.690.743 Usaquen T.P. 53.215

2

Radicacion : 05040022 00000000 Folios: 117
Fecha (MM): 2005-04-27 16:15:44
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE INCI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

CREDITO UNICO Y PATENTE

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176069-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 27,606
FECHA : ABRIL 15 DE 2005

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	29721127	15/04/2005	9,692,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	443,000.00
		TOTAL :	\$ 443,000.00

SON: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

No. SOLICITUD INTERNACIONAL : PCT/GB2003/004273

(51) INT. CL.: C07K 14/705

(21) No. SOLICITUD:

(22) FECHA DE PRESENTACIÓN: 27-04-2005

(71) SOLICITANTE: UNIVERSITY OF BRISTOL

(30) PRIORIDAD:

(31) No. DE SOLICITUD: 0222764.3

(72) INVENTOR/ES: VIRJI, Mumtaz.

(32) FECHA DE PRESENTACIÓN: 02-10-2002

(33) PAÍS: GB

(74) REPRESENTANTE LEGAL: ALICIA LLOREDA RICAURTE

(54) TÍTULO:

"PEPTIDOS TERAPEUTICOS"

(57) RESUMEN:

Reivindicación número 1.-

Un ligando que es parte de la molécula UspA1 entera, que incluye el dominio de enlace del receptor CEACAM, dicho ligando comprende los residuos 427 a 623 de la SEC ID No. 2, o un fragmento de esta requerido para el enlace del receptor CEACAM.

PATENTE ☒		MODELO DE UTILIDAD ☐		DISEÑO INDUSTRIAL ☐	
SOLICITANTES, RAZON SOCIAL O APELLIDOS Y NOMBRES		UNIVERSITY OF BRISTOL			
SOLICITUD INTERNACIONAL NO.		PCT/GB2003/004273			
DOMICILIO		BRISTOL, REINO UNIDO			
Representante Legal		ALICIA LLOREDA RICAURTE			
TITULO		"PEPTIDOS TERAPEUTICOS"			
		CLASIFICACION C07K 14/705			
EXPEDIENTE No.		FECHA DE SOLICITUD		27-04-2005 ROLLO MICROFILM	
CERTIFICADO No.		FECHA DE CONCESION		VIGENCIA DESDE HASTA	
PRORROGA		CAMBIO DE NOMBRE			
TRASPASO A INVENTORES		VIRJI, Muntaz			
OTROS					

4

(FORMA P-104)

EXTRACTO

Solicitud Internacional No.
PCT/GB2003/004273

21

22
27-04-2005

31
0222764.3

32
02-10-2002

33
GB

51

74
ALICIA LLORED A RICAURTE

72
VIRJI, Mumtaz.

Dibujo Característico
se puede pegar aquí
6cms. x 6cms.

Título No.

Fecha

(57) Reivindicación número 1.

Un ligando que es parte de la molécula UspA1 entera, que incluye el dominio de enlace del receptor CEACAM, dicho ligando comprende los residuos 427 a 623 de la SEC ID No. 2, o un fragmento de esta requerido para el enlace del receptor CEACAM.

Continúa al respaldo

71
UNIVERSITY OF BRISTOL
BRISTOL, REINO UNIDO

54
TITULO
"PEPTIDOS TERAPEUTICOS"

6

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES
PCT
REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

(PCT Artículo 18 y Reglas 43 y 44)

Registro de referencia del solicitante o agente APM/8950-WO	PARA FUTURAS ACCIONES ver Notificación de Transmisión del Reporte de Búsqueda Internacional (Forma PCT/ISA/220) así como, donde aplique, el ítem 5 a continuación.	
Solicitud internacional No. PCT/GB 03/04273	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 01/10/2003	Fecha de Prioridad (Primera) (día/mes/año) 02/10/2002
Solicitante UNIVERSITY OF BRISTOL		

Este Reporte de Búsqueda Internacional ha sido preparado por esta Autoridad de Búsqueda Internacional y es transmitido al solicitante según el Artículo 18. Una copia será transmitida a la Oficina Internacional.

Este Reporte de Búsqueda Internacional consta de un total de 7 hojas.

☒ También está acompañado de una copia de cada documento técnico anterior citado en este reporte.

1. Bases del reporte

a. Respecto al lenguaje, la búsqueda internacional se llevó a cabo según la solicitud internacional en el lenguaje en el cual se presentó, a menos que se indique de otro modo en este ítem.

☐ la búsqueda internacional se llevó a cabo según la traducción de la solicitud internacional proporcionada a esta Autoridad (Regla 23.1(b)).

b. Respecto a una secuencia de ácido nucleótico y/o amino revelado en la solicitud internacional, la búsqueda internacional se llevó a cabo según la lista de la secuencia:

☐ contenido en la solicitud internacional en forma escrita.

☐ presentada junto con la solicitud internacional en forma legible por computador.

☒ proporcionada subsiguientemente a esta Autoridad en forma escrita.

☒ proporcionada subsiguientemente a esta Autoridad en forma legible por computador.

☒ se ha proporcionado la afirmación de que el listado de secuencias escrito proporcionado subsiguientemente no va más allá de la revelación en la solicitud internacional según se presentó.

☒ se ha proporcionado la afirmación de que la información registrada en forma legible por computador es idéntica al listado de la secuencia escrita.

2. ☒ Ciertas reivindicaciones no pudieron localizarse (Ver Casilla I).

3. ☐ Falta unidad de invención (ver Casilla II).

4. Respecto al título,

☐ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☒ Esta Autoridad ha establecido que el texto se lee así:

PEPTIDOS TERAPEUTICOS DERIVADOS DE USPA1

5. Respecto al resumen,

☒ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☐ Esta Autoridad ha establecido el texto de acuerdo con la Regla 38.2(b), según aparece en la Casilla III. El solicitante puede, un mes después de la fecha de haber enviado por correo este reporte de búsqueda internacional, presentar comentarios a esta Autoridad.

6. La figura de los dibujos que se publicará con el resumen es la Figura No.

☐ como lo sugirió el solicitante.

☐ porque el solicitante no sugirió una figura.

☐ porque esta figura caracteriza mejor a la invención.

☒ Ninguna de las figuras.

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONALSolicitud Internacional No.
PCT/GB 03/04273**Casilla I Observaciones donde ciertas reivindicaciones fueron inescrutables (Continuación del Item 1 de la primera hoja)**

Este Reporte de Búsqueda Internacional no ha sido establecido respecto a ciertas reivindicaciones bajo el Artículo 17(2)(a) por las siguientes razones:

1. ☐ Reivindicaciones Nos.:

porque se relacionan con un asunto que no es necesario que esta Autoridad busque, a saber:

2. ☒ Reivindicaciones Nos.: -
porque se relacionan con partes de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos prescritos hasta tal grado que no se puede llevar a cabo una búsqueda internacional significativa, específicamente:
ver INFORMACION ADICIONAL hoja PCT/ISA/210

3. ☐ Reivindicaciones Nos.:

porque son reivindicaciones dependientes y no están diseñadas de acuerdo con la segunda y tercera oración de la Regla 6.4(a).

Casilla II Observaciones donde falta unidad de invención (Continuación del Item 2 de la primera hoja)

Esta Autoridad de Búsqueda Internacional encontró invenciones múltiples en esta solicitud internacional, así:

1. ☐ Puesto que todos los derechos de búsqueda adicionales requeridos fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre todas las reivindicaciones investigables.
2. ☐ Puesto que todas las reivindicaciones investigables pudieron investigarse sin esfuerzo que justifique derechos adicionales, esta Autoridad no solicitó pago de derechos adicionales.
3. ☐ Puesto que sólo algunos de los derechos de búsqueda adicionales fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre únicamente aquellas reivindicaciones para las cuales se pagaron derechos, específicamente las reivindicaciones Nos.:
4. ☐ El solicitante no pagó oportunamente los derechos de búsqueda adicionales requeridos. Por consiguiente, este informe de búsqueda internacional se restringe a la primera invención mencionada en las reivindicaciones; está cubierto por las reivindicaciones Nos.:

Comentario sobre Protesta ☐ Los derechos de búsqueda adicionales estuvieron acompañados por la protesta del solicitante.

☐ El pago de los derechos de búsqueda adicionales no estuvo acompañado por una protesta.

INFORMACION ADICIONAL CONTINUACION DE PCT/ISA/210**Continuación de la Casilla L2**

La presente reivindicación 1 y su reivindicación dependiente se refieren a un número extremadamente grande de compuestos. De hecho, las reivindicaciones contienen tantas opciones que carecen de claridad según el significado del Artículo 6 del PCT a tal punto que se hace imposible una realizar una búsqueda significativa de las reivindicaciones. Por lo tanto, la búsqueda ha sido llevada a cabo para aquellas partes de la solicitud que parecen estar claras, es decir para los fragmentos UspA1 especificados en la reivindicación 1 (aa 463-863, 527-668, 527-863, 427-623, 427-668).

Se llama la atención del solicitante al hecho de que las reivindicaciones, o partes de las reivindicaciones, que se refieren a invenciones con respecto de las cuales no se ha establecido reporte de búsqueda internacional no necesitan ser objeto de un examen preliminar internacional (Regla 66.1(e) PCT). El solicitante es advertido que la política de la EPO cuando actúa como una Autoridad de Examen Preliminar Internacional es normalmente no llevar a cabo un examen preliminar sobre la materia que no ha sido buscada. Este es el caso independiente de si o no son modificadas siguiendo la recepción del reporte de búsqueda o durante cualquier procedimiento del Capítulo II.

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/GB 03/04273

A. CLASIFICACION DE MATERIA OBJETO IPC 7 C07K14/195 G01N33/00 A61P11/00 A61P35/00 A61P31/04		
Según la Clasificación de Patente Internacional (IPC) o según la clasificación nacional y la IPC		
B. CAMPOS BUSCADOS		
Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de símbolos de clasificación) IPC 7 C07K G01N		
Documentación buscada fuera de documentación mínima hasta donde dichos documentos se incluyan en los campos buscados		
Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde sea práctico, buscar términos usados) EPO-Internacional, EMBL, BIOSIS, WPI Dato, EMBASE, PASCAL, SCISEARCH, CHEM ABS, Dato, PAJ		
C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	WO 98 28333 A (COPE LESLIE D; HANSEN ERIC J (US); AEBI CHRISTOPH (US); FISKE MICH) 2 de Julio de 1998 (1998-07-02) página 1-4 página 10-11 página 13-14 página 44 página 52 página 93-94	1-19
X	BASE DE DATOS EMBL 'Online' Secuencia de Uspal, 1 de Noviembre de 1999 (1999-11-01) recuperado de EBI Acceso a la base de datos No. Q9XD56 XP002273230 el documento completo	1-19
		-/-
☒ En el recuadro C se enumeran más documentos.		
☒ En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes.		
* Categorías especiales de documentos citados:		
'A' documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera de relevancia particular 'E' documento anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional 'L' documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra citación u otra razón especial (según se especifica) 'O' documento que se refiere a una revelación oral, uso, exhibición u otros medios 'P' documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada 'T' documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invención 'X' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no pueda considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo 'Y' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más documentos, siendo dicha combinación obvia para una persona experta en la técnica 'Z' documento miembro de la misma familia de patentes		
Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional 11 de Marzo de 2004		Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional 04/05/2004
Nombre y dirección de correo de la ISA Oficina de Patentes Europea, P.B. 5818 Patentaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Funcionario autorizado Dominguez, H

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/GB 03/04273

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X,P	HILL DARRYL J Y COL: "Un nuevo mecanismo de enlace celular de la proteína de superficie ubicua UspA: Objetivo específico del dominio N de moléculas de adhesión de células carcinoembrionicas relacionadas con antígeno por UspA1" MOLECULAR MICROBIOLOGY, Vol. 48, No. 1, Abril de 2003 (2003-04), páginas 117-129, XP002273226 ISSN: 0950-382X (ISSN impreso) el documento completo	1-19
Y	LAFONTAINE ERIC R Y COL: "La proteína UspA1 y un segundo tipo de proteína UspA2 median la adherencia in vitro de la Moraxella catarrhalis a células epiteliales humanas" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Vol. 182, No. 5, Marzo de 2000 (2000-03), páginas 1364-1373, XP002273227 ISSN: 0021-9193 resumen página 1371-2	1-19
Y	MEIER P S Y COL: "Las proteínas de membrana externa UspA1 y UspA2 de Moraxella catarrhalis son altamente conservadas en aislados nasofaríngeales de niños jóvenes" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, Vol. 20, No. 13-14, 15 de Marzo de 2002 (2002-03-15), páginas 1754-1760, XP004366011 ISSN: 0264-410X página 1758-9	1-19
Y	CHEN Y COL: "Evaluación de UspA purificada a partir de Moraxella catarrhalis como una vacuna en un modelo murino después de la inmunización activa" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. WASHINGTON, US, Vol. 64, No. 6, 1 de Junio de 1996 (1996-06-01), páginas 1900-1905, XP002079321 ISSN: 0019-9567 el documento completo	1-19
Y	VIRJI MUMTAZ Y COL: "Los antígenos carcinoembrionicos son marcados por diversas cepas de Haemophilus influenzae clasificables y no clasificables" MOLECULAR MICROBIOLOGY, Vol. 36, No. 4, Mayo de 2000 (2000-05), páginas 784-795, XP002273228 ISSN: 0950-382X el documento completo	1-19

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONALSolicitud Internacional No.
PCT/GB 03/04273**C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES**

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
Y	VIRJI MUMTAZ Y COL: "Determinaciones críticas de huésped receptor marcado por <i>Neisseria meningitidis</i> y <i>Neisseria gonorrhoeae</i>: Identificación de adhesiotopes Opa sobre el dominio N de moléculas CD66" MOLECULAR MICROBIOLOGY, Vol. 34, No. 3, Noviembre de 1999 (1999-11), páginas 538-551, XP002273229 ISSN: 0950-382X el documento completo	1-19

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL
 Información sobre miembros de familia de patentes

Solicitud Internacional No.
 PCT/GB 03/04273

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes		Fecha de publicación
WO 9828333 A	02-07-1998	AU	746442 B2	02-05-2002
		AU	5720198 A	17-07-1998
		BR	9714160 A	02-05-2000
		CA	2274495 A1	02-07-1998
		CN	1251611 A	26-04-2000
		EP	0948625 A2	13-10-1999
		JP	2001515467 T	18-09-2001
		KR	2000057575 A	25-09-2000
		WO	9828333 A2	02-07-1998
		US	6310190 B1	30-10-2001
		US	2003032772 A1	13-02-2003

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To: STEVENS HEWLETT & PERKINS Attn. McQueen, Andrew Peter 1 St. Augustine's Place Bristol BS1 4UD UNITED KINGDOM	- 4 MAY 2004 DIA FILE No.	NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT OR THE DECLARATION (PCT Rule 44.1)
		Date of mailing (day/month/year) 04/05/2004
Applicant's or agent's file reference APM/8950-WO		FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below
International application No. PCT/GB 03/04273		International filing date (day/month/year) 01/10/2003
Applicant UNIVERSITY OF BRISTOL		

1. ☒ The applicant is hereby notified that the International Search Report has been established and is transmitted herewith.
 Filing of amendments and statement under Article 18:
 The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 48):

 When? The time limit for filing such amendments is normally 2 months from the date of transmittal of the International Search Report; however, for more details, see the notes on the accompanying sheet.

 Where? Directly to the International Bureau of WIPO
 34, chemin des Colombettes
 1211 Geneva 20, Switzerland
 Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

 For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.
2. ☐ The applicant is hereby notified that no International Search Report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect is transmitted herewith.
3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.

☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.
4. Further action(s): The applicant is reminded of the following:

 Shortly after 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

 Within 19 months from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later).

 Within 20 months from the priority date, the applicant must perform the prescribed acts for entry into the national phase before all designated Offices which have not been elected in the demand or in a later election within 19 months from the priority date or could not be elected because they are not bound by Chapter II.

Name and mailing address of the International Searching Authority European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018	Authorized officer Catriona Cleere
--	--

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the PCT Applicant's Guide, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the letter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only.

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How?

Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Administrative Instructions, Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 269(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

AA

NOTES TO FORM PCT/ISA/220 (continued)

The letter must indicate the differences between the claims as filed and the claims as amended. It must, in particular, indicate, in connection with each claim appearing in the international application (it being understood that identical indications concerning several claims may be grouped), whether

- (i) the claim is unchanged;
- (ii) the claim is cancelled;
- (iii) the claim is new;
- (iv) the claim replaces one or more claims as filed;
- (v) the claim is the result of the division of a claim as filed.

The following examples illustrate the manner in which amendments must be explained in the accompanying letter:

1. [Where originally there were 48 claims and after amendment of some claims there are 51]:
"Claims 1 to 29, 31, 32, 34, 35, 37 to 48 replaced by amended claims bearing the same numbers; claims 30, 33 and 36 unchanged; new claims 49 to 51 added."
2. [Where originally there were 15 claims and after amendment of all claims there are 11]:
"Claims 1 to 15 replaced by amended claims 1 to 11."
3. [Where originally there were 14 claims and the amendments consist in cancelling some claims and in adding new claims]:
"Claims 1 to 6 and 14 unchanged; claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added." or
"Claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added; all other claims unchanged."
4. [Where various kinds of amendments are made]:
"Claims 1-10 unchanged; claims 11 to 13, 18 and 19 cancelled; claims 14, 15 and 16 replaced by amended claim 14; claim 17 subdivided into amended claims 15, 16 and 17; new claims 20 and 21 added."

"Statement under article 19(1)" (Rule 46.4)

The amendments may be accompanied by a statement explaining the amendments and indicating any impact that such amendments might have on the description and the drawings (which cannot be amended under Article 19(1)).

The statement will be published with the international application and the amended claims.

It must be in the language in which the international application is to be published.

It must be brief, not exceeding 500 words if in English or if translated into English.

It should not be confused with and does not replace the letter indicating the differences between the claims as filed and as amended. It must be filed on a separate sheet and must be identified as such by a heading, preferably by using the words "Statement under Article 19(1)."

It may not contain any disparaging comments on the international search report or the relevance of citations contained in that report. Reference to citations, relevant to a given claim, contained in the international search report may be made only in connection with an amendment of that claim.

Consequence if a demand for international preliminary examination has already been filed

If, at the time of filing any amendments under Article 19, a demand for international preliminary examination has already been submitted, the applicant must preferably, at the same time of filing the amendments with the International Bureau, also file a copy of such amendments with the International Preliminary Examining Authority (see Rule 62.2(a), first sentence).

Consequence with regard to translation of the international application for entry into the national phase

The applicant's attention is drawn to the fact that, where upon entry into the national phase, a translation of the claims as amended under Article 19 may have to be furnished to the designated/elected Offices, instead of, or in addition to, the translation of the claims as filed.

For further details on the requirements of each designated/elected Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference APM/8950-WO	FOR FURTHER ACTION see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/GB 03/04273	International filing date (day/month/year) 01/10/2003	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 02/10/2002
Applicant UNIVERSITY OF BRISTOL		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 7 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

- a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

- b. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search 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.

2. ☒ Certain claims were found unsearchable (See Box I).

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box II).

4. With regard to the title,

☐ the text is approved as submitted by the applicant.

☒ the text has been established by this Authority to read as follows:

THERAPEUTIC USP1-DERIVED PEPTIDES

5. With regard to the abstract,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No.

☐ as suggested by the applicant.

☐ because the applicant failed to suggest a figure.

☐ because this figure better characterizes the invention.

☒ None of the figures.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB 03/04273

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:
2. ☒ Claims Nos.:
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/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Present claim land its dependent claim relate to an extremely large number of possible compounds. In fact, the claims contain so many options that a lack of clarity within the meaning of Article 6 PCT arises to such an extent as to render a meaningful search of the claims impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the application which do appear to be clear namely for the particular UspA1 fragments specified in claim 1 (aa 463-863, 527-668, 527-863, 427-623, 427-668).

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.

18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/GB 03/04273

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K14/195 G01N33/00 A61P11/00 A61P35/00 A61P31/04

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K G01N

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, EMBL, BIOSIS, WPI Data, EMBASE, PASCAL, SCISEARCH, CHEM ABS Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 28333 A (COPE LESLIE D ;HANSEN ERIC J (US); AEBI CHRISTOPH (US); FISKE MICH) 2 July 1998 (1998-07-02) page 1-4 page 10-11 page 13-14 page 44 page 52 page 93-94	1-19
X	DATABASE EMBL 'Online! Sequence of Uspal, 1 November 1999 (1999-11-01) retrieved from EBI Database accession no. Q9XD56 XP002273230 the whole document	1-19
	-/-	



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to 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

11 March 2004

Date of mailing of the international search report

04/05/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentkan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Domingues, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/GB 03/04273

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	VIRJI MUMTAZ ET AL: "Critical determinants of host receptor targeting by <i>Neisseria meningitidis</i> and <i>Neisseria gonorrhoeae</i>: Identification of Opa adhesiotopes on the N-domain of CD66 molecules" MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 34, no. 3, November 1999 (1999-11), pages 538-551, XP002273229 ISSN: 0950-382X the whole document	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/GB 03/04273

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9828333	A	02-07-1998	
		AU 746442 B2	02-05-2002
		AU 5720198 A	17-07-1998
		BR 9714160 A	02-05-2000
		CA 2274495 A1	02-07-1998
		CN 1251611 A	26-04-2000
		EP 0948625 A2	13-10-1999
		JP 2001515467 T	18-09-2001
		KR 2000057575 A	25-09-2000
		WO 9828333 A2	02-07-1998
		US 6310190 B1	30-10-2001
		US 2003032772 A1	13-02-2003

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

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional
15 de Abril de 2004 (15.04.2004)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2004/031236 A2

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: C07K 14/705

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/GB2003/004273

(22) Fecha de Registro Internacional:
1 de Octubre de 2003 (01.10.2003)

(25) Idioma de registro: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Información de Prioridad:
0222764.3 2 de Octubre de 2002 (02.10.2002) GB

(71) Solicitante (para todos los Estados designados excepto Estados Unidos de América): UNIVERSITY OF BRISTOL [GB/GB]; Senate House, Tyndall Avenue, Bristol BS8 1TH (GB).

(72) Inventor; e
(73) Inventor/Solicitante (para Estados Unidos de América solamente): VIRJI, Mumtaz [GB/GB]; Department of Pathology and Microbiology, School Of Medical Sciences, University Of Bristol, University Walk, Bristol BS8 1TD (GB).

(74) Agente: MCQUEEN, Andrew, Peter, Stevens Hewlett & Perkins, 1 St. Augustine's Place, Bristol BS1 4UD (GB).

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

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

Publicado:
— sin reporte de búsqueda internacional y para ser republicada de nuevo en el caso de recibo de ese reporte

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

(54) Título: PEPTIDOS TERAPEUTICOS

(57) Resumen: La presente invención proporciona un ligando aislado de proteína de membrana externa de *Moraxella catarrhalis* que se une a los receptores CEACAM, dicho ligando comprende un dominio enlazante de receptor que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo revelado o un fragmento, homólogo, equivalente funcional, derivado, producto degenerado o de hidroxilación, sulfonación o glicosilación u otro producto de procesamiento secundario del mismo. La invención proporciona además medicamentos y vacunas que comprenden dicho ligando, y su uso en el tratamiento o profilaxis de infección. También se proporciona un método de selección para la identificación de compuestos terapéuticos novedosos.

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
15 April 2004 (15.04.2004)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2004/031236 A2

- (51) International Patent Classification⁷: C07K 14/705 (81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (21) International Application Number: PCT/GB2003/004273
- (22) International Filing Date: 1 October 2003 (01.10.2003)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 0222764.3 2 October 2002 (02.10.2002) GB
- (71) Applicant (*for all designated States except US*): UNIVERSITY OF BRISTOL [GB/GB]; Senate House, Tyndall Avenue, Bristol BS8 1TH (GB).
- (72) Inventor; and
- (75) Inventor/Applicant (*for US only*): VIRJI, Muntaz [GB/GB]; Department of Pathology and Microbiology, School Of Medical Sciences, University Of Bristol, University Walk, Bristol BS8 1TD (GB).
- (74) Agent: MCQUEEN, Andrew, Peter; Stevens Hewlett & Perkins, 1 St. Augustine's Place, Bristol BS1 4UD (GB).
- (84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*
- 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.*

(54) Title: THERAPEUTIC PEPTIDES

(57) Abstract: The present invention provides a ligand isolated from *Moraxella catarrhalis* outer membrane protein which binds to CEACAM receptors, said ligand comprising a receptor binding domain comprising an amino acid sequence selected from the group disclosed, or a fragment, homologue, functional equivalent, derivative, degenerate or hydroxylation, sulphonation or glycosylation product or other secondary processing product thereof. The invention also provides medicaments and vaccines comprising said ligand, and their use in the treatment or prophylaxis of infection. Also provided is a screening method for the identification of novel therapeutic compounds.

WO 2004/031236 A2

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

REIVINDICACIONES

1. Un ligando que comprende un dominio de enlace del receptor CEACAM, dicho ligando consiste de una secuencia de aminoácido
5 seleccionada del grupo consistente de los residuos 463 a 863, 527 a 668, 527 a 863, 427 a 623, 427 a 668, y 427 a 863 de la secuencia mostrada en la Figura 6, o un fragmento, homólogo, equivalente funcional, derivado, degenerado o producto de hidroxilación, sulfonación o glicosilación, u otro producto de procesamiento secundario de esta.
- 10 2. Un medicamento que comprende el ligando según la reivindicación 1, y uno o más adyuvantes, vehículos, excipientes, aglutinantes, portadores o preservativos farmacéuticamente aceptables.
- 15 3. El uso de un medicamento según la reivindicación 2 para el tratamiento o profilaxis de infección.
4. El uso de un medicamento según la reivindicación 2 para el tratamiento o prevención de cualquier enfermedad en donde los receptores
20 CEACAM están implicados.
5. El uso según la reivindicación 4 para el tratamiento o prevención de infección, enfermedad respiratoria, enfermedades neoplásicas y condiciones asociadas con enfermedades neoplásicas y angiogénesis.
- 25 6. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en donde la infección está o aparece en una membrana mucosa.
7. El uso según la reivindicación 6, en donde la infección es causada por
30 *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* o *Moraxella catarrhalis*.
8. El uso de un medicamento según la reivindicación 2 para la profilaxis o tratamiento de otitis media.
- 35 9. Un ensayo de selección para la identificación de nuevos reactivos de bloqueo para uso como agentes terapéuticos que comprende la selección de

agentes terapéuticos potenciales por su habilidad para imitar, o por su homología al ligando según la reivindicación 1.

10. Una vacuna que comprende al ligando según la reivindicación 1 y uno
5 o más adyuvantes, vehículos, excipientes, aglutinantes, portadores o preservativos farmacéuticamente aceptables.

11. Un método para tratar o prevenir la infección en un individuo en
necesidad de este, que comprende la administración de una cantidad
10 efectiva de un medicamento según la reivindicación 2.

13. Un ligando sustancialmente como el descrito aquí con referencia y como se ilustra en la Figura 6 de los dibujos acompañantes.

15 14. Un medicamento sustancialmente como el descrito aquí, que comprende el ligando de la reivindicación 13.

15. El uso de un ligando de enlace del receptor CEACAM en la
fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de una
20 enfermedad, en la cual los receptores CEACAM están involucrados en el marcado celular del patógeno que causa la enfermedad, en donde el ligando comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo consistente de los residuos 463 a 863, 527 a 868, 527 a 863, 427 a 623, 427
a 668, y 427 a 863 de la secuencia mostrada en la Figura 6, o un fragmento,
25 homólogo, equivalente funcional, derivado, degenerado y producto de hidroxilación, sulfonación o glicosilación, u otro producto de procesamiento secundario de esta.

16. El uso según la reivindicación 15, en donde la enfermedad es
30 seleccionada del grupo consistente de infección, enfermedad respiratoria, enfermedades neoplásticas y condiciones asociadas con enfermedades neoplásticas y angiogénesis.

17. El uso según la reivindicación 15 o 16, en donde el patógeno infecta o
35 entra por una membrana mucosa.

27 28

18. El uso según las reivindicaciones 15 a 17, en donde el patógeno que causa la enfermedad es seleccionado del grupo consistente de *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis*.

5 19. El uso según la reivindicación 18, en donde la enfermedad de otitis media.

28

CLAIMS

1. A ligand comprising a CEACAM receptor binding domain, said ligand consisting of an amino acid sequence selected from the group consisting of residues 463 to 863, 527 to 668, 527 to 863, 427 to 623, 427 to 668, and 427 to 863 of the sequence shown in Figure 6, or a fragment, homologue, functional equivalent, derivative, degenerate or hydroxylation, sulphonation or glycosylation product or other secondary processing product thereof.
2. A medicament comprising the ligand according to claim 1 and one or more pharmaceutically acceptable adjuvants, vehicles, excipients, binders, carriers, or preservatives.
3. Use of the medicament according to claim 2 for the treatment or prophylaxis of infection.
4. Use of the medicament according to claim 2 for the treatment or prevention of any disease where CEACAM receptors are implicated.
5. Use according to claim 4 for the treatment or prevention of infection, respiratory disease, neoplastic diseases and associated conditions of neoplastic diseases, and angiogenesis.
6. Use according to any one of claims 3 to 5, where the infection is of, or has occurred via, a mucosal membrane.
7. Use according to claim 6, wherein the infection is caused by *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* or *Moraxella catarrhalis*.
8. Use of the medicament according to claim 2 for the prophylaxis or treatment of otitis media.

9. A screening assay for the identification of novel blocking reagents for use as therapeutic agents comprising screening potential therapeutic agents for their ability to mimic, or for their homology to, the ligand according to claim 1.
10. A vaccine comprising the ligand according to claim 1 and one or more pharmaceutically acceptable adjuvants, vehicles, excipients, binders, carriers, or preservatives.
11. A method of treating or preventing infection in an individual in need thereof comprising administering an effective amount of a medicament according to claim 2.
13. A ligand substantially as hereinbefore described with reference to and as illustrated by Figure 6 of the accompanying drawings.
14. A medicament substantially as hereinbefore described comprising the ligand of claim 13.
15. Use of a CEACAM receptor-binding ligand in the manufacture of a medicament for the treatment or prophylaxis of a disease in which CEACAM receptors are involved in cellular targeting of the pathogen which causes the disease, wherein the ligand comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of residues 463 to 863, 527 to 668, 527 to 863, 427 to 623, 427 to 668, and 427 to 863 of the sequence shown in Figure 6, or a fragment, homologue, functional equivalent, derivative, degenerate or hydroxylation, sulphonation or glycosylation product or other secondary processing product thereof.

16. Use according to claim 15 wherein the disease is selected from the group consisting of infection, respiratory disease, neoplastic disease and associated conditions of neoplastic disease, and angiogenesis.
17. Use according to claim 15 or 16, wherein the pathogen infects, or enters via, a mucosal membrane.
18. Use according to any of claims 15 to 17, wherein the pathogen which causes the disease is selected from the group consisting of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*.
19. Use according to claim 18, wherein the disease is otitis media.

32

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES
PCT
REPORTE DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL

(PCT Artículo 36 y Regla 70)

Registro de referencia del solicitante o agente APM/8950-WO	PARA FUTURAS ACCIONES Ver Notificación de Transmisión del Reporte de Examen Preliminar Internacional (Forma PCT/IPEA416)	
Solicitud internacional No. PCT/GB03/04273	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 01.10.2003	Fecha de prioridad (día/mes/año) 02.10.2002
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC C07K14/195		
Solicitante UNIVERSITY OF BRISTOL y col.		

1. Este reporte de examen preliminar internacional ha sido preparado por esta Autoridad Examinadora Preliminar Internacional y se transmite al solicitante de conformidad con el Artículo 36.

2. Este REPORTE consta de un total de 7 hojas, incluyendo esta carátula.

☒ Este reporte también está acompañado de ANEXOS, es decir, hojas de la descripción, reivindicaciones y/o dibujos los cuales han sido modificados y son la base para este reporte y/o hojas que contienen rectificaciones hechas ante esta Autoridad (ver Regla 70.16 y la Sección 607 de las Instrucciones Administrativas de conformidad con el PCT).

Estos anexos constan de un total de 11 hojas.

3. Este reporte contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems:

- I ☒ Bases del reporte
- II ☐ Prioridad
- III ☒ No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial
- IV ☐ Falta de unidad de invención
- V ☒ Afirmación razonada según Regla 66.2(a)(ii) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación
- VI ☐ Ciertos documentos citados
- VII ☐ Ciertos defectos en la solicitud internacional
- VIII ☐ Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional

Fecha de presentación de la demanda
28.04.2004

Fecha de terminación de este reporte
14.01.2005

Nombre y dirección de correo de la autoridad de examen preliminar internacional:
Oficina de Patentes Europea
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Funcionario autorizado

Domingues, H

Teléfono No. +49 89 2399-7810

I. Bases del reporte

1. Respecto a los elementos de la solicitud internacional: (Hojas de remplazo las cuales han sido suministradas a la Oficina receptora en respuesta a una invitación bajo el Artículo 14 están referenciados en este reporte como "presentados originalmente" y no están anexos a este reporte dado que no contienen modificaciones (Reglas 70.16 y 70.17):

Descripción, Páginas

1-8, 11, 13, 14, 17-21 como se presentaron originalmente
9, 10, 12, 15, 16 recibidas el 19.02.2004 con carta del 13.02.2004

Reivindicaciones, Números

1-19 recibidas el 23.11.2004 con carta del 23.11.2004

Dibujos, Hojas

1/20-8/20, 10/20, 12/20, como se presentaron originalmente
14/20-20/20

9/20, 11/20, 13/20 recibidas el 19.02.2004 con carta del 13.02.2004

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

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

- ☐ el idioma de una traducción suministrada para una búsqueda internacional (según la Regla 23.1 (b)).
☐ el idioma de una publicación de la solicitud internacional (según la Regla 48.3 (b)).
☐ el idioma de la traducción suministrada para el examen preliminar internacional (según las Reglas 55.2 y/o 55.3).

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

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

4. Las modificaciones han resultado en la cancelación de:

- ☐ la descripción, páginas:
☐ las reivindicaciones, Nos.:
☐ los dibujos, hojas:

5. ☐ Este reporte ha sido establecido como si (algunas de) las modificaciones no se hubiesen hecho, ya que se ha considerado que van más allá de la revelación según se presentó (Regla 70.2 (c)).

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

6. Observaciones adicionales, si son necesarias:

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

1. Las preguntas como quiera que la invención reivindicada parezca ser novedosa, involucrar un nivel inventivo (para no ser obvio), o para ser aplicable industrialmente no se han examinado en relación con:

☐ toda la solicitud internacional,

☒ las reivindicaciones Nos. 4-9 y 12

porque:

☒ dicha solicitud internacional, o dichas reivindicaciones Nos. 4-9 y 12 con respecto a IA se refieren al siguiente asunto materia que no requiere examen preliminar internacional (*especificar*):

ver hoja separada

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

☐ las reivindicaciones o dichas reivindicaciones Nos. están sustentadas tan inadecuadamente por la descripción que no pudo formarse una opinión significativa.

☐ no se ha establecido un reporte de búsqueda internacional para dichas reivindicaciones Nos.

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

☐ el formulario escrito no ha sido proporcionado o no cumple con el Estándar.

☐ la forma legible por computador no ha sido proporcionado o no cumple con el Estándar.

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

1. Afirmación

Novedad (N) Si: Reivindicaciones 1-12, 15-19
No: Reivindicaciones

Nivel Inventivo (IS) Si: Reivindicaciones 1-12, 15-29
No: Reivindicaciones

Aplicabilidad Industrial (IA) Si: Reivindicaciones
No: Reivindicaciones 1-3 y 10, 11, 13-19 Si; 4-9 y 12 ver hoja separada

2. Citaciones y explicaciones

ver hoja separada

1. Sección Relacionada III

Las reivindicaciones 4-9 y 12 relacionadas con el objeto considerado por esta Autoridad como cubierto por las provisiones de la Regla 67.1(iv) PCT. En consecuencia, no se formulará ninguna opinión con respecto a la aplicabilidad industrial del objeto de estas reivindicaciones (Artículo 34(4)(a)(i) PCT).

2. Sección Relacionada V

2.1 Este reporte se basa en los siguientes documentos citados en el Reporte de Búsqueda Internacional:

- D1: WO 98/28333 A (COPE LESLIE D; HANSEN ERIC J (US), AEBI CHRISTOPH (US); FISKE MICH) Julio 2 de 1998 (1998-07-02).
- D2: BASE DE DATOS EMBL (On line) Secuencia de UspA1, Noviembre 1 de 1999 (1999-11-01), XP002273230, recuperada del número de acceso de la Base de Datos EBI no. Q9XD56.
- D3*: HILL DARRYL J ET AL: "A novel cell binding mechanism of *Moraxella catarrhalis* ubiquitous surface protein UspA: Specific targeting of the N-domain of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules by UspA1" MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 48, no. 1, Abril 2003 (2003-04), páginas 117-129, XP002273226 ISSN: 0950-382X (ISN pint).
- D4: LAFONTAINE ERIC ET AL: "The UspA1 protein and a second type of UspA2 protein mediate adherence of *Moraxella catarrhalis* to human epithelial cell in vitro" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 182, no. 5, Marzo 5 de 2000 (2000-03), páginas 1364-1373, XP002273227 ISSN: 0021-9193.
- D5: MEIER P S ET AL: "The outer membrane proteins UspA1 y UspA2 of *Moraxella catarrhalis* are highly conserved in nasopharyngeal isolates from young children" VACCINE, BUTTERMORWTH SCIENTIFIC GUILDFORD, GB, vol. 20, no. 13-14, Marzo 15, 2002 (2002-03-15), páginas 1754-1760, XP004366011 ISSN: 0264-410X.
- D6: CHEN ET AL: "Evaluation of purified UspA from *Moraxella catarrhalis* as a vaccine in a murine model after active immunization" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, vol. 64, no. 6, Junio 1 de 1996 (1996-06-01), páginas 1900-1905, XP002079321 ISSN: 0019-9567.
- D7: VIRJI MUMATZ ET AL: "Carcinoembryonic antigens are targeted by diverse strains of typable and non-typable *Haemophilus influenzae*" MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 36, no. 4, Mayo 2000 (2000-05), páginas 784-795, XP002273228 ISSN: 0950-382X.
- D8: VIRJI MUMATZ ET AL: "Critical determinants of host receptor targeting by *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*: Identification of Opa adhesin epitopes on the N-domain of CD66 molecules" MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 34, no. 3, Noviembre 1999 (1999-11), páginas 538-551, XP00227229 ISSN: 0950-382X.

* Este documento podría ser relevante en la fase regional, en este caso se encuentra que la presente aplicación no goza de una fecha de prioridad válida.

37

2.2 Aplicabilidad Industrial (Art. 33(4) PCT)

Para la evaluación de las presentes reivindicaciones 4-9 y 12 acerca de la pregunta si son aplicables industrialmente, no existe un criterio unificado en los Estados Contratantes de PCT. La patentabilidad también puede depender de la formulación de las reivindicaciones. La EPO, por ejemplo, no reconoce como industrialmente aplicable el objeto de las reivindicaciones para el uso de un compuesto en un tratamiento médico, pero pueden permitir, sin embargo, reivindicaciones a un compuesto conocido para uso primero en un tratamiento médico y el uso de dicho compuesto para la fabricación de un medicamento para un nuevo tratamiento médico.

2.3. Novedad (Artículo 33(2) PCT) y Nivel Inventivo (Art. 33(3) PCT)

a) La presente solicitud se relaciona con fragmentos de amino ácido particulares de la proteína UspA1 de *Moraxella catarrhalis* que son epítopes de enlace al receptor CEACAM, y su uso para el tratamiento/profilaxis de infección de enfermedades mediadas por estos receptores, e.g., enfermedades respiratorias, desordenes neoplásticos, angiogénesis y otitis media. También se reivindica una vacuna que comprende dichos fragmentos. La Reivindicación 10 se refiere al uso de los fragmentos referidos anteriormente, en un ensayo de detección para identificar compuestos terapéuticos potenciales que imitarían, o serían homólogos a dichos fragmentos.

b) La secuencia de UspA1 es conocida de la técnica previa (D1 y D2) y también se conoce que esta proteína tiene propiedades antigénicas y que media la adhesión celular (ver D4 y D5); su uso como vacuna también ha sido sugerido (D6).

Como se declaró en la solicitud (ver también D7 y D8), se conoce en la técnica que los receptores CEACAM son marcadas por epítopes en *N. meningitidis* y *H. influenzae* y que dichos epítopes se enlazan a los sitios que se superponen a los sitios en CEACAM.

La técnica previa disponible no parecer revelar: i) que la UspA1 media la adhesión mediante el enlace a los receptores CEACAM o, ii) los epítopes de receptor particulares relacionados en las reivindicaciones 1 y 2. Así, parece posible reconocer la novedad para las reivindicaciones 1-12 y 15-19.

c) D1 puede ser relacionado como el documento de la técnica previa más cercana, porque revela la secuencia de UspA y su región de epítipo inmunogénica (pg. 1-4, 10-11 y 13) y sugiere: i) el uso de fragmentos UspA1 en estudios estructurales y funcionales y como una vacuna *in vivo* (pg. 13-14 y 44); y ii) los ensayos de detección para la identificación del peptidilo putativo o compuestos terapéuticos de no peptidilo (pg. 52). Sin embargo, este documento no revela que UspA1 se enlaza a CEACAM o a las regiones en la secuencia que media dicho enlace. De hecho, D1 (pg. 93-94, párrafo de puente) sugiere que la UspA1 enlaza fibronectina - "es bastante claro que la UspA1 juega un papel en la adherencia del huésped, posiblemente mediante la fibronectina asociada a la célula" (pg. 94, líneas 1-3).

37

38

En vista de lo anterior, y dado el hecho que la solicitud muestra que UspA1 media el enlace de *M. catarrhalis* con CEACAM (ejemplo 1) y que los epítopes de enlace de receptor han sido mapeados con los fragmentos de la reivindicación 1 (ejemplo 4), parece posible reconocer el nivel inventivo para las reivindicaciones 1-12 y 15-19.

24 Claridad, Art. 6 PCT

a) Las Reivindicaciones 13 y 14 no son propiamente dependientes y también carecen de claridad debido a la expresión "sustancialmente como se describió aquí anteriormente". Se el aconseja al solicitante referirse a la SEQ ID NO: 6, en lugar de Figura 6.

b) La Reivindicación 15 no cumple los requerimientos del Art. 6 PCT porque no es claro lo que significa "un equivalente funcional de esta". Se llama la atención al hecho que no se provee ningún ejemplo de tal compuesto en la solicitud. Por lo tanto, el experto no podría realizar la invención en su alcance total sin carga indebida y pericia inventiva.

38

REIVINDICACIONES

1. Un ligando que es parte de la molécula UspA1 entera, que incluye el dominio de enlace del receptor CEACAM, dicho ligando comprende los residuos 427 a 623 de la SEC ID No. 2, o un fragmento de esta requerido para el enlace del receptor CEACAM.
2. El ligando según la reivindicación 1, en donde el ligando consiste de una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo consistente de los residuos 463 a 863, 527 a 868, 527 a 863, 427 a 623, 427 a 868, y 427 a 863 de la SEC ID No: 2.
3. Un medicamento que comprende el ligando según la reivindicación 1 o reivindicación 2, y uno o más adyuvantes, vehículos, excipientes, aglutinantes, portadores o preservativos farmacéuticamente aceptables.
4. El uso de un medicamento según la reivindicación 3 para el tratamiento o profilaxis de infección.
5. El uso de un medicamento según la reivindicación 3 para el tratamiento o prevención de una enfermedad en donde los receptores CEACAM están implicados en el marcado celular del patógeno que causa la enfermedad.
6. El uso según la reivindicación 5 para el tratamiento o prevención de infección, enfermedad respiratoria, enfermedades neoplásicas y condiciones asociadas con enfermedades neoplásicas y angiogénesis.
7. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en donde la infección está o aparece en una membrana mucosa.
8. El uso según la reivindicación 7, en donde la infección es causada por *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* o *Moraxella catarrhalis*.
9. El uso de un medicamento según la reivindicación 3 para la profilaxis o tratamiento de otitis media.

10. El uso del ligando según la reivindicación 1 en un ensayo de selección para la identificación de nuevos reactivos de bloqueo para uso como agentes terapéuticos, que comprende la selección de agentes terapéuticos potenciales por su habilidad para imitar, o por su homología a dicho ligando.
11. Una vacuna que comprende al ligando según la reivindicación 1 y uno o más adyuvantes, vehículos, excipientes, aglutinantes, portadores o preservativos farmacéuticamente aceptables.
12. Un método para tratar o prevenir la infección en un individuo en necesidad de este, que comprende la administración de una cantidad efectiva de un medicamento según la reivindicación 2.
13. Un ligando sustancialmente como el descrito aquí con referencia y como se ilustra en la Figura 6 de los dibujos acompañantes.
14. Un medicamento sustancialmente como el descrito aquí, que comprende el ligando de la reivindicación 13.
15. El uso de un ligando de enlace del receptor CEACAM en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de una enfermedad, en la cual los receptores CEACAM están involucrados en el marcado celular del patógeno que causa la enfermedad, en donde el ligando es una parte de la molécula UspA1 entera, que incluye un dominio de enlace del receptor CEACAM, dicho ligando comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo consistente de los residuos 463 a 863, 527 a 668, 527 a 863, 427 a 623, 427 a 668, y 427 a 863 de la SEC ID. No: 2, o un fragmento o equivalente funcional de esta que retiene la habilidad de enlace a CEACAM.
16. El uso según la reivindicación 15, en donde la enfermedad es seleccionada del grupo consistente de infección, enfermedad respiratoria, enfermedades neoplásticas y condiciones asociadas con enfermedades neoplásticas y angiogénesis.
17. El uso según la reivindicación 15 o 16, en donde el patógeno infecta o entra por una membrana mucosa.

18. El uso según las reivindicaciones 15 a 17, en donde el patógeno que causa la enfermedad es seleccionado del grupo consistente de *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis*.

19. El uso según la reivindicación 18, en donde la enfermedad de otitis media.

progresivamente expuesta en la medida en que el complejo se desnaturaliza. Los anticuerpos anti-UspA2 se enlazan a las proteínas de masas aparentes > 200 kDa, que permanecen no disociadas después de ebullición, una propiedad indicativa de las proteínas UspA2.

La Figura 4 muestra un espectro de masa de péptidos tripticos de la proteína de enlace CEACAM1 de MX2 siguiendo la electro-elución (4a). El resumen de la entrada de datos en la base de datos de identificación de proteína ProFound se muestra en (4b). Una tabla de las 10 proteínas identificadas y la probabilidad de valores se muestra en (4c). El detalle del candidato clasificado en el número 1, en este caso UspA1 con un puntaje Z de 2.34 se muestra en (4d) indicando el número de péptidos coincidentes, sus posiciones dentro de la proteína, el % de proteína cubierto y una lista de péptidos no coincidentes en esta ocasión.

La Figura 5 muestra un análisis de mancha Western de fragmentos tripticos de UspA1 de MX2. A: Mancha de Control usando anticuerpos secundarios (mezcla de Fc anti-humano de cabra e Ig anti-conejo de cabra usados en B y C). B: mancha extendida con CEACAM1-Fc y Fc anti-humano de cabra. C: mancha extendida con anticuerpos de conejo purificados de afinidad elevados contra el péptido UspA1 (ETNNHQDQKIDQLGYALKEQGQHFNNR) (SEC ID No: 1) (ver Figura 6) y Ig anti-conejo. * = pistas con marcadores de peso molecular – mostrados a la izquierda. Los péptidos mostrados mediante las flechas dobles reaccionan fuertemente con CEACAM1-Fc (B) así como con los anticuerpos de péptido anti-UspA1 (C). El enlace de los anticuerpos de péptido anti-UspA1 al péptido de más bajo PM (punta de la flecha) identifica este fragmento de enlace de CEACAM con el fragmento del terminal C contenido dentro del N-199 a K-863 de UspA1 de MX2 (Ver Figura 6).

La Figura 6 muestra la secuencia de aminoácido de la proteína UspA1 de MX2. El péptido específico de UspA1 usado para elevar el antisuero en conejos se muestra en negrita. La región de enlace de CEACAM está contenida en el fragmento subrayado del terminal C del UspA1 de MX2.

La Figura 7 muestra la separación de péptidos tripticos que reaccionan con las CEACAMs. La cepa MX2 de *M. catarrhalis* se trató con 1 mg/ml de tripsina a 37°C por 10 min. La muestra tripsinizada se electroeluyó durante la noche. La proteína electroeluida fue liofilizada y resuspendida en amortiguador, y se aplicó a un segundo gel. Parte del gel fue manchado en nitrocelulosa y las bandas de péptido que reaccionaron con CEACAM fueron identificadas mediante extensión de mancha Western usando CEACAM-Fc (Mancha).

“”; denota bandas de péptido enviadas para el secuenciamiento del terminal N.

La Figura 8 muestra la secuencia de aminoácido de un péptido tríptico de la proteína UspA1 de MX2. El péptido tríptico de 50 kDa mostrado (aminoácidos 463 a 863) se enlaza a CEACAM y el antisuero contra el péptido UspA1 (aminoácidos 753-780 subrayados). La secuencia del terminal N del CEACAM de c. 50 kDa que enlaza al péptido es "ALESNVEEGL" (SEC ID No: 4) que se encuentra después del sitio de clivado de tripsina en el amino ácido 462.

La Figura 9 muestra una representación diagramática de las posiciones de las plantillas usadas para generar los fragmentos del gen *uspA1* para la expresión de los péptidos recombinantes. El sitio de enlace de CEACAM1 fue codificado por el ADN amplificado mediante las plantillas P4 y P7, se diseñaron y usaron plantillas adicionales a lo largo de esta región (letras A-I).

La Figura 10 muestra la secuencia del fragmento recombinante 4-7. La región subrayada es la región del terminal N del péptido tríptico reactivo de CEACAM1. El peso molecular predicho del fragmento 4-7 es c. 26 kDa. El PM predicho del fragmento His-marcado: c. 28 kDa. La posición del péptido truncado está mostrada por "T" (Ver Figura 13).

La Figura 11 es un diagrama que muestra estrategia general de clonación, expresión y purificación para los péptidos UspA1 recombinantes, como lo ejemplariza el sistema pQE30.

La Figura 12 es un mapa del vector pQE30.

La Figura 13 muestra en enlace de CEACAM-Fc en extensión de mancha a los polipéptidos recombinantes 4-8 (pista 3), 4-T (pista 4) y 4-7 (pista 5). La pista 1 contenía un péptido recombinante de control Treponemal y la pista 2 contenía lisatos de M15 no inducido que contienen la construcción 4-8.

La Figura 14 muestra manchas Western que muestran la reactividad del péptido recombinante con el anticuerpo etiqueta anti-His (superior) y CEACAM1-Fc (inferior). Las pistas 2-4 contenían el péptido 6-8, la pista 1 contenía 4-8 como control. Las posiciones de migración predichas de los péptidos se muestran a la derecha. Ambos péptidos se enlazan al anticuerpo anti-His. Sin embargo, mientras que 4-8 se enlaza al CEACAM1-Fc, 6-8 no lo hace.

El ligamiento del receptor quimérico se detectó mediante anticuerpos anti-humanos Fc de cabra conjugados ya sea con peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina. Se desarrollaron manchas con diamino bencideno y peróxido de hidrógeno, o sustratos de tetrazolo de nitroazul y 5-bromo-4-cloro-3-indolifosfato respectivamente. Todas las cepas Mx se enlazaron a CEACAM1-Fc pero no a CD33-Fc (Fig. 1). El ligamiento del receptor se inhibió en presencia del anticuerpo YTH71.3 monoclonal, sugiriendo que las cepas se enlazaron al dominio del terminal N del receptor. En consecuencia, todas las cepas se enlazaron igualmente bien a la construcción N-Fc truncada de CEACAM1, que contenía solo el dominio N (no mostrado).

Identificación de la proteína de enlace de CEACAM1-Fc de *M. catarrhalis*

Lisatos de célula enteros de Mx (c. 3×10^7) fueron aplicados a pistas individuales de un gel de poli(acrilamida bis-tris) al 10% (Invitrogen), con tratamiento de calor o después de calentamiento a 100°C por 10 minutos, y sometidos a electroforesis por 45 min a 180 V. Las proteínas de los gels fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa usando condiciones de manchado estándar. Las membranas de nitrocelulosa fueron extendidas con construcciones quiméricas solubles como se describió anteriormente. En cada caso, se observó que una proteína simple se enlazó específicamente a CEACAM1-Fc. La migración de la proteína sobre los gels fue indicativo de la proteína UspA de Mx, porque cuando los lisatos bacterianos fueron aplicados sin desnaturalización de calor, las proteínas de enlace de CEACAM1 migraron con una masa aparente de > 200 kDa, mientras que cuando los lisatos primero se calentaron, las proteínas de enlace de CEACAM1 migraron con una masa reducida de *circa* 92 kDa (Fig. 2).

Los anticuerpos aumentados contra UspA1 pero no aquellos contra una proteína UspA2 similar se enlazan a las proteínas de enlace de CEACAM1-Fc de las cepas de Mx

Se diseñaron péptidos según las secuencias publicadas para las proteínas UspA de cepas de *M. catarrhalis*. A saber, ETNNRQDQKIDQLGYALKEQGQHFNRR (SEC ID No: 1; péptido de UspA1) y KDEHDKLITANKTAIDANKAS (SEC ID No: 6; péptido de UspA2). Los péptidos fueron acoplados a KHL por medio de un residuo de cisteína de terminal N que fue incorporado, y se usaron

Clivaje enzimático de UspA1 y péptido recombinante

(a) *Péptidos trípticos de UspA1 se enlazan a CEACAM1-Fc*

Las suspensiones bacterianas de MX2 (10^{10} ml⁻¹) fueron tratadas con Tripsina (Sigma) a concentraciones de 0.1-1 mg/ml y se incubaron por 1-4 hrs a 37°C. Los lisatos digeridos fueron disociados en amortiguador de SDS-PAGE, ebullidos y sometidos a electroforesis. Después de la transferencia a nitrocelulosa, las manchas fueron extendidas con la construcción del receptor CEACAM-Fc o los anticuerpos de péptido anti-UspA1, purificadas por afinidad. Un pequeño fragmento que reacciona con el receptor también se enlazó a los anticuerpos específicos de anti-UspA1 (Fig. 5).

(b) *Localización del dominio enlazante de CEACAM de UspA2 de la cepa MX2 de M. catarrhalis*

Las suspensiones bacterianas de MX2 fueron tratadas con Tripsina a 1 mg/ml por 10 minutos a 37°C.

La muestra tripsinizada se corrió en un gel SDS-PAGE. Después del coloreado, la región de 50 kDa fue electroeluida durante la noche. La proteína electroeluida fue liofilizada y resuspendida en amortiguador, y aplicada a un segundo gel. Parte del gel fue manchado en nitrocelulosa y las bandas de péptido que reaccionan con CEACAM fueron identificadas mediante extensión de Manchado Western usando CEACAM1-Fc (Fig. 7).

Las bandas de péptido que corresponden a péptidos de circa. 50 kDa y circa. 150 kDa se sometieron al secuenciamiento del terminal N. Las secuencias del terminal N fueron ALESNVEEGL (SEC ID No: 4) (péptido de c. 50 kDa) y ALESNV (SEC ID No: 7) (péptido de c. 150 kDa). La proteína de 150 kDa es aparentemente un trímero de la proteína de 50 kDa en la medida en que tengan la misma secuencia de terminal N. La secuencia de terminal C de este péptido de UspA1 de MX2 se muestra en la Figura 8.

(c) *Péptido recombinante*

El péptido de MX2 recombinante de terminal N que se construyó, consistente de los amino ácidos 1 a 449 de la secuencia mostrada en la Figura 6 no se enlaza a CEACAM. Esto además indica que el péptido tríptico de c. 50 kDa que consiste de los amino ácidos 463 a 863 de la secuencia mostrada en la Figura 8,

que tiene la secuencia terminal de ALESNVEEGL (SEC ID No: 4) contiene el dominio de enlace de CEACAM.

Ejemplo 2: Identificación de los Dominios de Enlace de Receptor sobre Múltiples Determinantes de Virulencia de Patógenos Mucosos

La *M. meningitidis* y *H. Influenzae* marcan las moléculas de CEACAM mediante ligandos que se enlazan a sitios de superposición en la CEACAM. Los ligandos Mx de la presente invención también marcan el dominio de N. Estas observaciones señalan una posibilidad excitante que características similares sobre ligandos de diferentes patógenos mucosos puedan estar involucradas en el marcado del receptor.

Como las interacciones Nm y Hi con las CEACAMs están directamente afectadas por las características estructurales de la superficie expresada en dominios variables, esto sugiere que pueden contener amino ácidos cruciales similares en una configuración espacial que es capaz de enlazarse al receptor, y estos pueden ser conservados en proteínas variables de otra forma. De hecho nuestros estudios y los de otros sugieren que las dos vueltas hiper-variables de Opa (HV1 y HV2) pueden estar involucradas en el marcado CEACAM^{6,18}. Una técnica potente que puede identificar posibles determinantes de interacciones entre ligandos y receptores es el despliegue del fago, que se puede usar para identificar mimotopos (secuencias aleatorias para imitar los dominios de enlace)¹⁹, así como aptámeros (secuencias relacionadas muy de cerca con la estructura original que inhibe en enlace del ligando)²⁰.

La invención actual también hace altamente posible que el dominio del ligando Mx que se enlaza a las CEACAMs actúe como un imitador para otros patógenos mucosos que se enlazan a CEACAM, y las características estructurales de este ligando ayudarán a identificar las características salientes requeridas en los ligandos Nm y Hi para el marcado del dominio de N de CEACAM. Los anticuerpos al dominio de Mx podrían tener el potencial para identificar otros ligandos que tienen la capacidad de marcar las mismas, similares o regiones posicionadas muy cerca del receptor.

La identificación del dominio mínimo de enlace de CEACAM1 de UspA2 de MX2 está siendo asumida usando métodos conocidos de ingeniería de proteínas y tecnología de ADN recombinante. Los péptidos recombinantes pueden ser seleccionados in vitro mediante los ensayos de extensión del receptor descritos anteriormente para detectar el dominio de MX2 que

1MNKYKVKNAAGHLVACSEFAKSHIKAVLGBLLVGLGMATTASQKVGKATNKISGGDNNTANGTYLTIGGGDY 7
19NKTGCRYSTIGGGLFNEATNEYSTIGSGGYNKAKGRYSTIGGGYNEATNQYSTIGGGDNNTAKGRYSTIGGGGYNEATI 18
100ENSTVGOGGYNOAKGRNSTVAGGYNEATGTDSTIAGGHKQDQTKGFEAAGIDNKANADNAVALGNKNTIEGENSYA 19
207BSHNTVKKGOQNVFILGSNTDTTNAQNGSVLLGHNTAGKAATVNSAEVGGSLTGFAGASKTGNGTVSYGKKGKERQ 18
317VHYGAGEISDTSTDAVNGSOLHALATVVAQNKADIKOLDDEVGLGEEFSLGEIFNNQDAIAKQADIKTLESNVEEG 18
400LLDLSGRLLDQKADIDNNINIYELAQOQDQHSSDKTLKNNVEEGLDLSGRLLDQKADIKDIAKESNVEEGLDLSGRLL 18
481DQKADIAKQADIAQUNOTDQOLAAYNELQDAYAKQCTEADALNKASSANTDRIATAEGLAENKQDAIAKQANEN 18
562KQGIKQADICLDKKTINGLHSMVARAVGNHTQGVATNKADIAKQADIANNIKNIYELAQOQDQHSSDKTLAK 18
643VSANTDRIAKNKAEADAFETLTQONTLIEQGEALVEONKAINQELGFAAHADVQDKOILONDADITNKTAIEQNN 18
724RTVANGFEIEKNGKAGIATNKQELJLONDSINRNETNNHQQDKDQLYALKEGGQHFNRRISAVERTAGGIANAIATI 18
805PSPBRAGEHIMFSGYHNGQAAVSLGAAGLSDTGKSTYKGLSWSDAGGLSGGYGGSYRWK (seq ID No: 2)

FIGURA.6

#

481 ALESHVEEGLLDLSGRU 482
 483 DQKADIKNQADIQNOTDIQDLAAYNEQDAYAKQITEAIDALNKASSANTDRIATAELGIAENKQDAQIAKACANEN 484
 485 KDGIAKNQADIQLDKQITNLGILHSMVARAVGNNTQGVATNKADIKNQADIANNIKNIYELAQQQDQHSSDKTLAK 486
 487 VSAANTDRIAKNKAEADASFETLTQNTLIEQGEALVEQNKAINQELQFAAHADVUDKQILQNOADITTNKTAIEQNIN 488
 489 RTVANGFEISQNKAGIATNKQELQNDRLNRINETNNHQQDKIDQGYALKEQQQHNNISAVERTAGGIANAIATL 490
 491 PPSRAGEHMLFGSGYHNOQAIVSLGAAGLSDTGKSTYKGLSWSDAGGLSGGVGGSYRWK (683 ID NO:3) 492

FIGURA.8

48

⁴²⁷qhssdiktiknnveeglldisgrlidqkadltkdikalesnveeglldisgri⁴⁴⁰
⁴⁸¹dqkadiakngadiagnqtdiqdlaaynelqdayakqqtcaidaln~~kassantdriataelgiaenkkdaqiakaqanen~~⁵⁵⁹
⁵⁶⁰~~kdgiakngadiqlhdkkitnlgiilhsnvaravgntqgvatnkadiakngadiannikniyelagqqdqhssdiktak~~⁶³⁸
⁶³⁹~~vsaantdriaknkaeadasfelitknqnti~~⁶⁶⁸ (SEQ ID NO.5)

↑
T

FIGURA.10

PATENT COOPERATION TREATY

30

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To: MCQUEEN, Andrew, Peter Stevens Hewlett & Perkins 1 St. Augustine's Place Bristol BS1 4UD GRANDE BRETAGNE	STEVENS HEWLETT & PERKINS BRISTOL	
	17 JAN 2005	
	DIA	
	FILE No.	

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 71.1)

Applicant's or agent's file reference APM8950-WO		IMPORTANT NOTIFICATION Date of mailing (day/month/year) 14.01.2005
International application No. PCT/GB 03/04273	International filing date (day/month/year) 01.10.2003	Priority date (day/month/year) 02.10.2002
Applicant UNIVERSITY OF BRISTOL 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 is 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-80288 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523858 apm/rl Fax: +49 89 2399 - 4485	Authorized Officer Guerin, A Tel. +49 89 2399-8081	
---	--	---

30

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

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

51

Applicant's or agent's file reference APM8950-WO		FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/PEA/416)	
International application No. PCT/GB 03/04273	International filing date (day/month/year) 01.10.2003	Priority date (day/month/year) 02.10.2002	
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC C07K14/185			
Applicant UNIVERSITY OF BRISTOL 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 7 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 807 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of 11 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 28.04.2004	Date of completion of this report 14.01.2005
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tlx 523858 epr:u d Fax: +49 89 2399 - 4465	Authorized Officer Domingues, H Telephone No. +49 89 2399-7810 

JA

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No. PCT/GB 03/04273

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

1-8, 11, 13, 14, 17-21 as originally filed
9, 10, 12, 15, 16 received on 19.02.2004 with letter of 13.02.2004

Claims, Numbers

1-19 received on 23.11.2004 with letter of 23.11.2004

Drawings, Sheets

1/20-8/20, 10/20, 12/20, as originally filed
14/20-20/20
9/20, 11/20, 13/20 received on 19.02.2004 with letter of 13.02.2004

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/GB 03/04273

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. 4-9 and 12

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 4-9 and 12 with regard to IA 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. .

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	1-12, 15-19
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	1-12, 15-29
	No: Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	
	No: Claims	1-3 and 10,11, 13-19 Yes; 4-9 and 12 see separate sheet

2. Citations and explanations

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. **PCT/GB 03/04273**

see separate sheet

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/GB 03/04273

1. Concerning section III

Claims 4-9 and 12 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(I) PCT).

2. Concerning section V

2.1 This report is based on the following documents cited in the International Search Report:

- D1: WO 98/28333 A (COPE LESLIE D ;HANSEN ERIC J (US); AEBI CHRISTOPH (US); FISKE MICH) 2 July 1998 (1998-07-02)
- D2: DATABASE EMBL [Online] Sequence of UspA1 1 November 1999 (1999-11-01), XP002273230 retrieved from EBI Database accession no. Q9XD56
- D3*: HILL DARRYL J ET AL: "A novel cell-binding mechanism of *Moraxella catarrhalis* ubiquitous surface protein UspA: Specific targeting of the N-domain of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules by UspA1." MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 48, no. 1, April 2003 (2003-04), pages 117-129, XP002273226 ISSN: 0950-382X (ISSN print)
- D4: LAFONTAINE ERIC R ET AL: "The UspA1 protein and a second type of UspA2 protein mediate adherence of *Moraxella catarrhalis* to human epithelial cells in vitro" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 182, no. 5, March 2000 (2000-03), pages 1364-1373, XP002273227 ISSN: 0021-9193
- D5: MEIER P S ET AL: "The outer membrane proteins UspA1 and UspA2 of *Moraxella catarrhalis* are highly conserved in nasopharyngeal isolates from young children" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 20, no. 13-14, 15 March 2002 (2002-03-15), pages 1754-1760, XP004366011 ISSN: 0264-410X
- D6: CHEN ET AL: "Evaluation of purified UspA from *Moraxella catarrhalis* as a vaccine in a murine model after active immunization" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. WASHINGTON, US, vol. 64, no. 6, 1 June 1996 (1996-06-01), pages 1900-1905, XP002079321 ISSN: 0019-9567
- D7: VIRJI MUMTAZ ET AL: "Carcinoembryonic antigens are targeted by diverse strains of typable and non-typable *Haemophilus influenzae*" MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 36, no. 4, May 2000 (2000-05), pages 784-795, XP002273228 ISSN: 0950-382X
- D8: VIRJI MUMTAZ ET AL: "Critical determinants of host receptor targeting by *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*: Identification of Opa adhesinotopes on the N-domain of CD66 molecules" MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 34, no. 3, November 1999 (1999-11), pages 538-551, XP002273229 ISSN: 0950-382X

*This document might be relevant in the regional phase, in case the present application is

found not to enjoy a valid priority date.

2.2 Industrial applicability (Art. 33(4) PCT)

For the assessment of the present claims 4-9 and 12 on the question of whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

2.3 Novelty (Art. 33(2) PCT) and inventive step (Art. 33(3) PCT)

a) The present application concerns particular amino acid fragments of the UspA1-protein from *Moraxella catarrhalis* that are binding epitopes to the CEACAM receptor and their use for the treatment/prophylaxis of infection of diseases mediated by these receptors e.g., respiratory diseases, neoplastic disorders, angiogenesis and otitis media. A vaccine comprising said fragments is also claimed. Claim 10 refers to the use of the fragments referred to above in a screening assay for identifying potential therapeutic compounds that would mimic, or be homologous to said fragments.

b) The sequence of UspA1 is known from the prior art (D1 and D2) and it is also known that this protein has antigenic properties and that it mediates cellular adhesion (see D4 and D5); its use as a vaccine has also been suggested (D6).

As stated in the application (see also D7 and D8), it is known in the art that CEACAM receptors are targeted by epitopes on *N. meningitidis* and *H. influenzae* and that said epitopes bind to overlapping sites on CEACAM.

The available prior art does not appear to disclose: i) that UspA1 mediates adhesion by binding to CEACAM receptors or ii) the particular receptor epitopes referred to in claims 1 and 2. It thus seems possible to recognise novelty for claims 1-12 and 15-19.

c) D1 can be regarded as the closest prior art document, since it discloses the sequence of UspA1 and its immunogenic epitope region (pgs. 1-4, 10-11 and 13) and suggests: i) the use of UspA1 fragments in structural and functional studies and as a vaccine *in vivo* (pgs. 13-14 and 44); and ii) screening assays for the identification of putative peptidyl or non-peptidyl therapeutic

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/GB 03/04273

compounds (pg. 52). However, this document does not disclosed that UspA1 binds to CEACAM or the regions in the sequence that mediate said binding. In fact, D1 (pg. 93-94, bridging paragraph) suggests that UspA1 binds fibronectin - "it is fairly clear that UspA1 plays a role in host adherence, possibly via cell associated fibronectin" (pg. 94, lines 1-3).

In view of the above, and given the fact that the application shows that UspA1 mediates the binding of *M. catarrhalis* to CEACAM (example 1) and that the receptor binding epitopes have been mapped to the fragments of claim 1 (example 4), it appears possible to acknowledge inventive step for claims 1-12 and 15-19.

2.4 Clarity, Art. 6 PCT

a) Claims 13 and 14 are not properly dependent and also lack clarity due to the expression "substantially as hereinbefore described". The applicant is advised to refer to the SEQ ID NO: instead of Figure 6.

b) Claim 15 does not meet the requirements of Art. 6 PCT because it is not clear what is meant by "a functional equivalent thereof". Attention is drawn to the fact no example of such a compound is provided in the application. Therefore, the skilled man would not be able to carry out the invention over its entire scope without undue burden and inventive skill.

CLAIMS

1. A ligand which is a part of the whole UspA1 molecule including the CEACAM receptor binding domain, said ligand comprising residues 427 to 623 of SEQ ID NO: 2 or a fragment thereof required for CEACAM receptor binding.
2. The ligand according to claim 1, wherein the ligand consists of an amino acid sequence selected from the group consisting of residues 463 to 863, 527 to 868, 527 to 863, 427 to 623, 427 to 668 and 427 to 863 of SEQ ID NO: 2.
3. A medicament comprising the ligand according to claim 1 or claim 2 and one or more pharmaceutically acceptable adjuvants, vehicles, excipients, binders, carriers, or preservatives.
4. Use of the medicament according to claim 3 for the treatment or prophylaxis of infection.
5. Use of the medicament according to claim 3 for the treatment or prevention of a disease in which CEACAM receptors are involved in the cellular targeting of the pathogen which causes the disease.
6. Use according to claim 5 for the treatment or prevention of infection, respiratory disease, neoplastic diseases and associated conditions of neoplastic diseases, and angiogenesis.
7. Use according to any one of claims 4 to 6, where the infection is of, or has occurred via, a mucosal membrane.
8. Use according to claim 7, wherein the infection is caused by *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* or *Moraxella catarrhalis*.

9. Use of the medicament according to claim 3 for the prophylaxis or treatment of otitis media.
10. Use of the ligand according to claim 1 in a screening assay for the identification of novel blocking reagents for use as therapeutic agents comprising screening potential therapeutic agents for their ability to mimic, or for their homology to said ligand.
11. A vaccine comprising the ligand according to claim 1 and one or more pharmaceutically acceptable adjuvants, vehicles, excipients, binders, carriers, or preservatives.
12. A method of treating or preventing infection in an individual in need thereof comprising administering an effective amount of a medicament according to claim 2.
13. A ligand substantially as hereinbefore described with reference to and as illustrated by Figure 6 of the accompanying drawings.
14. A medicament substantially as hereinbefore described comprising the ligand of claim 13.
15. Use of a CEACAM receptor binding ligand in the manufacture of a medicament for the treatment or prophylaxis of a disease in which CEACAM receptors are involved in cellular targeting of the pathogen which causes the disease, wherein the ligand is a part of the whole UspA1 molecule including a CEACAM receptor binding domain, said ligand comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of residues 463 to 863, 527 to 868, 527 to 863, 427 to 823, 427 to 868 and 427 to 863 of SEQ ID NO: 2 or a fragment or functional equivalent thereof which retains CEACAM binding ability.

16. Use according to claim 15 wherein the disease is selected from the group consisting of infection, respiratory disease, neoplastic disease and associated conditions of neoplastic disease, and angiogenesis.
17. Use according to claim 15 or 16, wherein the pathogen infects, or enters via, a mucosal membrane.
18. Use according to any of claims 15 to 17, wherein the pathogen which causes the disease is selected from the group consisting of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*.
19. Use according to claim 18, wherein the disease is otitis media.

exposed as the complex denatures. Anti-UspA2 antibodies bind to proteins of apparent masses > 200 kDa, which remain undissociated after boiling, a property indicative of UspA2 proteins.

Figure 4 shows a mass spectrum of tryptic peptides of the CEACAM1 binding protein of MX2 following electro-elution (4a). The summary of data input into the ProFound protein identification database is shown in (4b). A table of the top ten identified proteins and the probability values are shown in (4c). Detail of the number 1 ranked candidate, in this case UspA1 with a Z-score of 2.34 is shown in (4d) indicating the number of peptides matched, their positions within the protein, the % of the protein covered and a list of peptides unmatched on this occasion.

Figure 5 shows Western blot analysis of tryptic fragments of UspA1 of MX2. A: control blot using secondary antibodies (mixture of goat anti-human Fc and goat anti-rabbit Ig used in B and C). B: blot overlaid with CEACAM1-Fc and goat anti-human Fc. C: blot overlaid with affinity purified rabbit antibodies raised against UspA1 peptide (ETNNHQDQKIDQLGYALKEQGQHFNRR (SEQ ID NO:1)) (see Figure 6) and anti-rabbit Ig. * = lanes with molecular weight markers – shown on the left. The peptides shown by the double arrows react strongly with CEACAM1-Fc (B) as well as the anti-UspA1 peptide antibodies (C). The binding of the anti-UspA1 peptide antibodies to the lowest MW peptide (arrowhead) identifies this CEACAM-binding fragment as the C-terminal fragment contained within N-199 to K-863 of UspA1 of MX2 (see Figure 6).

Figure 6 shows the amino acid sequence of MX2.UspA1 protein. UspA1-specific peptide used to raise antisera in rabbits is shown in bold. The CEACAM-binding region is contained in the underlined C-terminal fragment of UspA1 of MX2.

Figure 7 shows the separation of tryptic peptides reacting with CEACAMs. *M. catarrhalis* strain MX2 was treated with 1mg/ml trypsin at 37°C for 10 min. Trypsinised sample was subjected to SDS-PAGE. After staining, 50 kDa region was electroeluted overnight. Electroeluted protein was freeze dried and resuspended in buffer and applied to a second gel. Part of the gel was

BT

blotted onto nitrocellulose and peptide bands reacting with CEACAM were identified by Western blot overlay using CEACAM1-Fc (Blot).

***: denotes peptide bands sent for N-terminal sequencing.

Figure 8 shows the amino acid sequence of a tryptic peptide of MX2 UspA1 protein. The 50 kDa tryptic peptide shown (amino acids 463 to 863) binds CEACAM and antiserum against UspA1 peptide (amino acids 753-780 underlined). The N-terminal sequence of the c. 50 kDa CEACAM binding peptide is "ALESNVEEGL" (SEQ ID NO:4) that occurs after the trypsin cleavage site at amino acid 462.

Figure 9 shows a diagrammatic representation of the positions of primers used to generate *uspA1* gene fragments for the expression of recombinant peptides. The CEACAM1 binding site was encoded by DNA amplified by primers P4 and P7, additional primers throughout this region (letters A-I) were designed and employed.

Figure 10 shows the sequence of the recombinant fragment 4-7. The underlined region is the N-terminal region of the CEACAM1-reactive tryptic peptide. The predicted molecular weight of the fragment 4-7 is c. 26 kDa. The predicted MW of the His-tagged fragment: c. 28kDa. The position of the truncated peptide is shown by 'T' (see Figure 13).

Figure 11 is a diagram showing the general cloning, expression and purification strategy for recombinant UspA1 peptides, as exemplified by the pQE30 system.

Figure 12 is a map of the vector pQE30.

Figure 13 shows binding of CEACAM1-Fc in blot overlay to recombinants 4-8 (lane 3), 4-T (lane 4) and 4-7 (lane 5) polypeptides. Lane 1 contained a Treponemal control recombinant peptide and lane 2 contained lysates of non-induced M15 containing 4-8 construct.

Figure 14 shows Western blots showing recombinant peptide reactivity with anti-His tag antibody (top) and CEACAM1-Fc (bottom). Lanes 2-4 contained 6-8 peptide, lane 1 contained 4-8 as a control. Predicted migration positions of the peptides are shown on the right. Both peptides bind anti-His antibody. However, whilst 4-8 binds to CEACAM1-Fc, 6-8 does not.

described¹¹. Chimeric receptor binding was detected by goat anti-human Fc antibodies conjugated to either horseradish peroxidase or alkaline phosphatase. Blots were developed with either di amino benzidine and hydrogen peroxide or nitroblue tetrazolium and 5-bromo-4-chloro-3-Indoylphosphate substrates respectively. All Mx strains bound to CEACAM1-Fc but not to CD33-Fc (Fig.1). The receptor binding was inhibited in the presence of the monoclonal antibody YTH71.3 suggesting that the strains bound to the N terminal domain of the receptor. Accordingly, all the strains bound equally well to the truncated N-Fc construct of CEACAM1, containing only the N domain (not shown).

Identification of CEACAM1-Fc binding protein of *M. catarrhalis*

Whole cell lysates of Mx (c. 3×10^7) were applied to individual lanes of a 10% bis-tris polyacrylamide gel (Invitrogen) either without previous heat treatment or after heating at 100°C for 10 minutes and subjected to electrophoresis for 45 min at 180 V. Proteins from the gels were transferred to nitrocellulose membranes using standard blotting conditions. Nitrocellulose membranes were overlaid with soluble chimeric constructs as described above. In each case, a single protein was observed that bound specifically to CEACAM1-Fc. The migration of the protein on gels was indicative of UspA1 protein of Mx, since when bacterial lysates were applied without heat denaturation, the CEACAM1 binding proteins migrated with an apparent mass of > 200 kDa whereas when the lysates were first heated, the CEACAM1-binding proteins migrated with a reduced mass of c/rca 92 kDa (Fig. 2)

Antibodies raised against UspA1 but not those against a similar protein UspA2 bind to the CEACAM1-Fc binding proteins of Mx strains

Peptides were designed according to published sequences for the UspA proteins of *M. catarrhalis* strains. Namely, ETNNRQDQKIDQLGYALKEQGQ HFNNR (SEQ ID NO:1; UspA1-peptide) and KDEHDKLITANKTAIDANKAS (SEQ ID NO:6; UspA2-peptide). Peptides were coupled to KLH via an N-terminal cysteine residue that was incorporated and were used

Enzymatic cleavage of UspA1 and recombinant peptide

(a) Tryptic peptides of UspA1 bind to CEACAM1-Fc

MX2 bacterial suspensions (10^{10} ml⁻¹) were treated with Trypsin (Sigma) at 0.1-1 mg/ml concentrations and incubated for 1-4 hours at 37°C. Digested lysates were dissociated in SDS-PAGE buffer, boiled and subjected to electrophoresis. After transfer to nitrocellulose, the blots were overlaid with the receptor construct CEACAM1-Fc or the affinity purified anti-UspA1 peptide antibodies. A small fragment reacting with the receptor also bound to the anti-UspA1-specific antibodies (Fig. 5).

(b) Localisation of CEACAM binding domain of UspA2 of M. catarrhalis strain MX2

MX2 bacterial suspensions were treated with Trypsin at 1mg/ml for 10 minutes at 37°C.

The trypsinised sample was run on an SDS-PAGE gel. After staining, the 50 kDa region was electroeluted overnight. Electroeluted protein was freeze dried and resuspended in buffer and applied to a second gel. Part of the gel was blotted onto nitrocellulose and peptide bands reacting with CEACAM were identified by Western blotting overlay using CEACAM1-Fc. (Fig.7).

Peptide bands corresponding to circa. 50 kDa and circa. 150 kDa peptides were subjected to N-terminal sequencing. The N-terminal sequences were ALESNVEEGL (SEQ ID NO:4) (c. 50 kDa peptide) and ALESNV (SEQ ID NO:7) (c. 150 kDa peptide). The 150 kDa protein is apparently a trimer of the 50 kDa protein as they have the same N-terminal sequence. The N-terminal sequence of this peptide of MX2 UspA1 is shown in Figure 8.

(c) Recombinant peptide

The N-terminal recombinant MX2 peptide that was constructed consisting of amino acids 1 to 449 of the sequence shown in Figure 6 does not bind CEACAM. This further indicates that the c. 50 kDa tryptic peptide consisting

of amino acids 463 to 863 of the sequence shown in Figure 8, having the N-terminal sequence ALESNVEEGL (SEQ ID NO:4) contains the CEACAM-binding domain.

Example 2. Identification of Receptor Binding Domains on Multiple Virulence Determinants of Mucosal Pathogens

N. meningitidis and *H. influenzae* target human CEACAM molecules via ligands that bind to overlapping sites on CEACAM. The Mx ligand/s of the present invention also target the N domain. These observations point to an exciting possibility that similar features on ligands of several mucosal pathogens may be involved in receptor targeting.

Since Nm and Hi interactions with CEACAMs are affected by the structural features of the surface expressed variable domains, this suggests that they may contain similar crucial amino acids in a spatial configuration that are able to bind to the receptor and these may be conserved in otherwise variable proteins. Indeed our studies and those of others suggest that the two hyper-variable loops of Opa (HV1 and HV2) may be involved in CEACAM targeting^{9,18}. One powerful technique that can identify possible determinants of interactions between ligands and receptors is phage display, which can be used to identify mimotopes (random sequences to mimic the binding domains)¹⁹ as well as aptamers (sequences more closely related to the original structure that inhibit ligand binding)²⁰.

The current invention also makes it highly feasible that the Mx ligand domain that binds CEACAMs will act as a mimic for other CEACAM-binding mucosal pathogens and the structural features of this ligand will help identify the salient features required in Nm and Hi ligands for CEACAM N-domain targeting. Antibodies to the Mx domain could have the potential of identifying other ligands that have the capacity to target the same, similar or closely positioned region of the receptor.

Identification of the minimal CEACAM1 binding domain of MX2 UspA1 is being undertaken using known methods of protein engineering and recombinant DNA technology. Recombinant peptides can be screened in vitro by receptor overlay assays described above to detect the domain of MX2 that

1MNTYKVKKNAAGHLVACSEFAKHTKKAVLGSLIVGILGMATTASQKVGKATNKISGGDNNTANGTYLTIGGGDY 78
79NKTGGRYSTIGGGLFNEATNEYSTIGSGGYNKAKGRYSTIGGGGYNEATNQYSTIGGGDNNTAKGRYSTIGGGGYNEATI 158
160ENSTVGGGGYNQAKGRNSTVAGGYNNEATGTDSTIAGGRKNOATGKGSFAAGIDNKANADNAVALGNKNTIEGENSV 238
237IGSNNTVKKQQQNVFILGSNTDTTNAQNGSVLLGHNTAGKAATVNSAEVGGLSLTGFAGASKTGNGTVSVGKKKKERQ 316
317YHYGAGEISDTSTDAVNGSOLHALATVVAQNKADIKLDDEVGLLGEEINSLEGEIFNNQDAIAKNQADIKTLESNVEEG 398
397LIDLSGRLLDQKADIDNNNNIYELAQQQDQHSSDIKTKNNVEEGLDLSGRLLDQKADITKDIKALESNVEEGLDLSGR 480
481DQKADIAKNQADIAQNQTDIQLAAYNELQDAYAKQQTFAIDALNKASSANTDRIATAELGIAENKKDAQIAKAGANEN 560
560KDGIAKNQADIQLHDKKITNLGILHSMVARAVGNNTQGYATNKADIAKNQADIANNIKNIYELAQQQDQHSSDIKTLAK 638
638VSAANTDRIAKNAEADASFETLTKNQNTLIEQGEALVEQNKAINQELEGFAAHADVQDKQILQNOADITTNKTAIEQNIN 718
720RTVANGFEIEKNKAGIATNKQELILQNDRLNRINETNNHQQDKIDQLQYALKEQQQHFNRRISAVERTAGGIANAIATL 801
802PSPSRAGEHHVLFSGYHNGQAAVSLGAAGLSDTGKSTYKIGLSWSDAGGLSGGVGGSYRWK 883 (seq ID No:2)

9/20

Figure 6

453 ALESNVEEGLLDLSGRL453
481 DQKADIAKNQADIAQNQTDIQDLAAYNELQDAYAKQQT E AIDALNKASSANTDRIATAELGIAENKKDAQIAKAQANEN559
580 KDGIKNQADIQLHDKKTTNLGILHSMVARAVGNNTQG VATNKADIAKNQADIANNIKNIYELAQQQDQHSSDIKTLAK638
638 VSAANTDRIAKNKAEDASFETLTKNQNTLIEQGEALVEQNKAINQELEGFAAHADVQDKQILQNQADITTNKTAIEQNIN718
720 RTVANGFEIEKNKAGIATNKQELILQNDRLNRINETNNHQDQKIDQLGYALKEGGQHFNRRISAVERTAGGIANAIATL801
802 PPSRAGEHHVLFSGGYHNGQAAVSLGAAGLSDTGKSTYKGLSWSDAGLSGGVGGSYRWK883 (SEQ ID NO:3)

11/20

Figure 8

427 qhssdiktknnveeglldlsgrlidqkadltkdikalesnveeglldlsgrli⁴⁸⁰
481 dqkadiaknqadiagnqtdiqdlaaynelqdayakqqteaidalnkassantdriataelgiaenkkdaqiakaqanen⁵⁵⁹
560 kdgiaknqadiqlhdckitnlgilhsmvaravgntqgvatnkadiaknqadiannikniyelaqqqdqhssdiktlak⁶³⁸
639 ysaantdriaknkaeadasfetltknqnt⁶⁶⁸ (SEE ID NO: 5)

↑
T

13/20

Figure 10

83

ANEXO EXPLICATIVO DE MODIFICACIONES A LAS REIVINDICACIONES

En ejercicio del derecho conferido por el Artículo 28 numeral 1 del Tratado de Cooperación en materia de Patentes PCT, atentamente me permito informar a ese Despacho que el capítulo reivindicatorio tal como fue presentado originalmente en Fase Internacional ha sido modificado. '

Las modificaciones realizadas se encuentran plenamente sustentadas en la descripción de la presente invención y en este sentido, no configuran una ampliación del invento o de la divulgación contenida en la solicitud presentada.

PEPTIDOS TERAPEUTICOS

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un ligando aislado de proteína de membrana externa de *Moraxella catarrhalis* que se une a los receptores CEACAM, dicho ligando comprende un dominio enlazante de receptor que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo revelado o un fragmento, homólogo, equivalente funcional, derivado, producto degenerado o de hidroxilación, sulfonación o glicosilación u otro producto de procesamiento secundario del mismo. La invención proporciona además medicamentos y vacunas que comprenden dicho ligando, y su uso en el tratamiento o profilaxis de infección. También se proporciona un método de selección para la identificación de compuestos terapéuticos novedosos.

PEPTIDOS TERAPEUTICOS

Esta invención está relacionada con péptidos terapéuticos y en particular con péptidos terapéuticos que son útiles en la preparación de vacunas u otros tratamientos para la infección así como en la selección de compuestos para actividad farmacéutica potencial en el tratamiento de infecciones.

Los inventores presentes han identificado previamente que el antígeno Carcinoembrionario relacionado con las moléculas de adhesión celular (CEACAMs) son receptores para patógenos de membranas mucosas, especialmente para patógenos respiratorio tales como *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis*. Las CEACAMs pertenecen a la familia de Antígeno CarcinoEmbrionario (CEA), un miembro de la superfamilia de inmunoglobulina. La familia del gen CEA comprende sub-familias expresadas (CEA) y secretadas (glicoproteína específica de embarazo, PSG). La sub-familia asociada con membrana redefinida como CEACAM (molécula de adhesión celular relacionada con CEA)²⁰ comprende varias glicoproteínas relacionadas de las cuales la CEACAM1 es la más ampliamente expresada en diferentes tejidos humanos ¹². Los estudios reportados por los inventores principalmente usaron células de Ovario de Hámster Chino (CHO) transfectadas con CEACAM1 (previamente calificado CD66a y BGPc) que contienen cuatro dominios extracelulares, una región TM y una cola citoplásmica corta (S) y larga (L) (formula molecular: NA1BA2-TM-S o L). Además, se usaron construcciones truncadas solubles que contienen uno o más de los dominios extracelulares. Estudios previos demostraron que tanto la *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus influenzae* marcan principalmente el dominio N de varias CEACAMs ^{7,8,10}. Tal marcado puede conducir a la unión de superficie celular así como a la invasión celular⁹. Además, las bacterias pueden enlazarse a las CEACAMs sobre las células fagocíticas y los linfocitos T y B. Tales interacciones pueden conducir a muerte celular bacteriana ⁸, muerte celular marcan o inhibición de la función inmune, e.g., de los linfocitos T y B, cuando la *N. gonorrhoeae* (estrechamente relacionada con la *N. meningitidis*) se enlaza a las CEACAMs de estos linfocitos ^{21,22}.

La presencia de ligandos de enlace de CEACAM en la *Moraxella catarrhalis* y *Haemophilus influenzae* han sido un hallazgo sorprendente para los inventores presentes porque las CEACAMs han sido asociadas por largo tiempo con las proteínas Opa de membrana exterior, asociadas con la opacidad, de *Neisseriae* y, ni la *Haemophilus Influenzae* ni la *Moraxella Catarrhalis* producen proteínas Opa. En la siguiente descripción, la presente invención describirá en particular la relación con la infección de las membranas mucosas, especialmente de las membranas respiratorias, o la infección del oído (especialmente otitis media) pero se debe entender que la invención encuentra igual utilidad en otras áreas tales como mucosa genital o uretral, en donde los receptores CEACAM están implicados en la infección u otros procesos de ligamiento del receptor, o en cualquier otra parte de infección humana en donde las bacterias pueden llegar a diseminarse desde las superficies mucosas.

Los patógenos mucosos *Neisseria meningitidis* (Nm), *Haemophilus influenzae* (Hi) y *Moraxella catarrhalis* (Mx), son organismos específicos de humanos y residen en el tracto respiratorio superior desde donde se diseminan para causar infecciones serias. Las cepas meningocócicas de distintos serogrupos pueden ser cargadas dentro de la nasofaringe de hasta el 25% de los individuos adultos ¹. Sin embargo, en un número de sujetos, el organismo invade la barrera mucosa para causar una de las enfermedades de más rápido avance y extremadamente seria. Los factores precisos que aumentan la susceptibilidad del huésped a la infección meningocócica no están entendidos totalmente. Más aún, la protección limitada producida por vacunas específicas de grupo y la no inmunogenicidad del grupo B polisacárido recalca la necesidad de estudios fundamentales para entender que podría servir como objetivos comunes para combatir el meningococo. Los estudios de los presentes inventores han proporcionado un entendimiento de las bases moleculares de la colonización meningocócica, la naturaleza de sus interacciones con células barrera humanas (epitelial y endotelial) así como con células fagocíticas. En años recientes, las bases para la colonización mucosa del comensal *Neisseriae* han sido investigadas para entender las características que la diferencian entre colonizadores ampliamente inofensivos y patógenos ocasionales pero serios como la Nm. Adicionalmente, los estudios han determinado si el

comensal *Neisseriae* podría usarse como vehículo de antígenos de vacuna potenciales de Nm.

Hasta el 75% de individuos saludables pueden portar cepas que pertenecen a las especies *H. influenzae* ². Aunque, como resultado de la vacuna Hib, ha habido un decrecimiento dramático en la incidencia de la enfermedad de tipo b en el Oeste, la enfermedad causada por las cepas de Hi no clasificable (NTHi) permanece como un problema mayor. La NTHi causa infecciones tanto localizadas como diseminadas que incluyen epiglotitis, otitis media, celulitis, neumonía, endocarditis, bacteremia y meningitis. La otitis media es uno de los mayores problemas en la medicina pediátrica y la NTHi es responsable de más del 20% de episodios en los niños durante el primer año de vida ^{2,3}. La NTHi también está asociada con infecciones agudas recurrentes y persistentes en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) y fibrosis quística. Lo que determina las infecciones recurrentes por NTHi en estos pacientes, o episodios múltiples de otitis media en niños no es claro ^{2,3,4}.

La *Moraxella cararrhalis*, otro residente del tracto respiratorio humano, es usualmente aislada de los casos de infecciones localizadas junto con Hi. Ambos organismos están asociados con sinusitis y exacerbaciones de las condiciones asmáticas ^{5,6}. La Ms es la tercera causa más común de otitis media en niños (se estima que es responsable de 3-4 millones de casos anualmente). También causa infecciones del tracto respiratorio inferior en adultos, especialmente en pacientes con COPD ⁵. En raras ocasiones, ha sido asociada con infecciones diseminadas ⁵. Tanto la Hi como la Mx causan infecciones persistentes y se cree que escapan a los mecanismos inmunes del huésped y a los antibióticos mediante penetración del tejido ⁴. Varias proteínas de membrana exterior de Mx han sido estudiadas con respecto a sus propiedades adhesivas. Sin embargo, se han identificado pocos receptores celulares para Mx y muchos de los detalles de los mecanismos patogénicos permanecen en investigación ^{4,5,6}.

Un requerimiento primario para los patógenos mucosos respiratorios es el establecimiento de un contacto firme con las células epiteliales respiratorias. Los objetivos de estos patógenos tropicales humanos son moléculas específicas de humanos, y los estudios se han basado en tejido

humano *in vitro* y cultivos de órganos. La unión es usualmente mediada por estructuras de fase bacteriana y variables antigénicamente. En adición, se ha vuelto crecientemente claro que la unión de patógenos tiene múltiples facetas y la adaptación ambiental juega un papel significativo en la forma de unión. Aunque muchos estudios recientes han empezado a definir varias etapas en los mecanismos de marcado celular complejos, los detalles de la adaptación ambiental o inter-relación microbiana del huésped permanecen a ser descritos.

Estudios recientes de los inventores han mostrado que la Nm ⁷⁻⁹ y la Hi ^{10,11} comparten algunos mecanismos de marcado distintos y otros comunes de ciertas CEACAMs de receptores de superficie de célula humana ¹².

Además, los presentes inventores han identificado recientemente que los aislados clínicos de *Moraxella catarrhalis* también marcan las moléculas CEACAM humanas. Adicionalmente, ahora se ha encontrado que una proteína de membrana exterior de *Moraxella* de alto peso molecular se enlaza al receptor. Se ha demostrado la expresión de las CEACAMs en diferentes tejidos ¹² incluyendo células epiteliales respiratorias. Estas observaciones implican que el marcado específico de las CEACAMs es de ventaja particular para las bacterias respiratorias y puede haber surgido como resultado de la evolución convergente.

Entre los factores de adhesión elaborados por la *Neisseria meningitidis* están los pili (fimbrias) ^{13,14,16} y las proteínas de opacidad de membrana exterior, Opa y Opc ^{15,16}. Las pili de Nm son estructuras de proteína filamentosas largas compuestas de múltiples subunidades pili. Están referidas generalmente como las adhesinas más importantes en las bacterias capsuladas ^{13,14,15}, debido al hecho que la cápsula enmascara parcialmente o totalmente los ligandos de membrana exterior produciendo su reducida eficacia funcional, mientras que las pili atraviesan la cápsula y permanecen funcionales en la totalidad de las bacterias encapsuladas. Las Opa son una familia antigénicamente variable de proteínas y se encuentran tanto en la *N. meningitidis* como en la *N. gonorrhoeae*. En el meningococo, el código de los sitios 3 – 4 del gen *opa* para proteínas de transmembrana relacionadas con cuatro vueltas de superficie expuestas, tres de los cuales

llevan a la secuencia de variación ^{16,17}. Durante los últimos 12 años. Los presentes inventores han investigado las relaciones estructura/función de las pili de Nm, la virulencia potencial de las proteínas Opa y Opc, e identificaron dos receptores humanos para las proteínas de opacidad neisserial. Además, los presentes inventores han estudiado el papel de los ácidos siálicos de superficie en las interacciones bacterianas con células objetivo humanas, así como el papel de LPS y otros factores en la toxicidad celular.

La presente invención es el resultado de la identificación de los inventores de un ligando de alto peso molecular aislado de la proteína de membrana exterior de *Moraxella* que se enlaza a los receptores de CEACAM.

El ligando se puede caracterizar por su patrón de migración SDS-PAGE que es indicativo de la familia USP de proteínas en las que se rompe a monómeros que tienen un peso molecular entre aproximadamente 60 y 150 kD cuando son ebullidos por un período prolongado.

El ligando ha sido caracterizado en la cepa de Mx ATCC 25238 (MX2) como UspA1 y su secuencia de amino ácido ha sido determinada. El ligando ha sido caracterizado además para determinar la región de ligamento del receptor o dominio, i.e., características asociadas de péptido que se enlazan al receptor.

En consecuencia, la presente invención provee un ligando aislado de la proteína de membrana exterior de la *Moraxella catarrhalis*, que se enlaza a los receptores CEACAM, dicho ligando comprende un dominio de enlace de receptor que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo consistente de los residuos 463 a 863, 527 a 668, 527 a 863, 427 a 623, 427 a 668, y 427 a 863 de la secuencia mostrada en la Figura 6, o un fragmento, homólogo, equivalente funcional, derivado, degenerado o producto de hidroxilación, sulfonación o glicosilación, u otro producto de procesamiento secundario de esta.

El término ligando como se usa aquí denota tanto la molécula entera que se enlaza al receptor como cualquier parte de esta, que incluye el dominio de enlace del receptor de forma que retiene la propiedad enlazante

8 96

del receptor. Así, "ligando" abarca moléculas que consisten solo del dominio de enlace del receptor, *i.e.*, la región o regiones de péptido requeridas para el enlace del receptor.

En una realización, la presente invención provee un ligando que consiste de una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo consistente de los residuos 463 a 863, 527 a 668, 527 a 863, 427 a 623, 427 a 668, y 427 a 863 de la secuencia mostrada en la Figura 6, o un fragmento, homólogo, equivalente funcional, derivado, degenerado o producto de hidroxilación, sulfonación o glicosilación, u otro producto de procesamiento secundario de esta.

Dominios de enlace del receptor estructuralmente y/o funcionalmente equivalentes también se pueden encontrar en las proteínas tipo UspA ya que las proteínas híbridas se encuentran en la Mx que pueden contener epítopes mosaicos derivados de proteínas UspA y UspB ²³. Los ligandos que comprenden tales dominios de enlace de receptor equivalentes también están dentro del alcance de la invención.

Preferiblemente el dominio de enlace de receptor o ligando es adecuado para uso en la prevención o tratamiento de la infección.

La presente invención también provee una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína ligando de la presente invención junto con homólogos, polimorfismos, degenerados y variantes empalmadas de estos.

El ligando de la invención, o combinaciones de este se pueden usar en una vacuna u otro tratamiento profiláctico de la infección.

La vacuna u otro tratamiento profiláctico pueden comprender cualquier adyuvante, vehículo, excipiente, aglutinante, portador, preservativo y similares adecuados, para proporcionar una preparación farmacéuticamente aceptable del ligando para uso en el tratamiento de un paciente.

46

La invención también provee una preparación farmacéuticamente aceptable del ligando para uso en medicina.

La preparación farmacéuticamente aceptable del ligando se puede usar en el tratamiento o prevención de cualquier enfermedad en donde los receptores de CEACAM está implicados, por ejemplo, en el tratamiento o prevención de la infección, enfermedad respiratoria, enfermedades neoplásicas y condiciones asociadas de enfermedades neoplásicas, y angiogénesis.

Preferiblemente, cuando una infección es tratada, la infección es, o se encuentra en la membrana mucosa, especialmente una infección respiratoria.

Lo más preferido, el ligando se usa como una vacuna o en otra profilaxis tratamiento de la *Neisseris meningitidis*, *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis*. Idealmente, el ligando se usa como una vacuna o en otra profilaxis o tratamiento de otitis media.

En un aspecto adicional, el ligando de la presente invención se usa para identificar nuevos reactivos de bloqueo para uso como agentes terapéuticos para proteger grupos vulnerables y al público en general contra varios patógenos mucosos. Por ejemplo, el ligando se puede usar para identificar los análogos de receptor que son útiles para este propósito.

Así, la presente invención también provee un ensayo de selección para la identificación de nuevos reactivos de bloqueo para uso como agentes terapéuticos, el ensayo comprende los pasos de selección de agentes terapéuticos potenciales por su habilidad para imitar, o por su homología al ligando de la presente invención. La invención provee además agentes terapéuticos identificados mediante el ensayo de selección mencionado anteriormente.

Se pueden producir componentes de vacuna efectivos mediante el uso de la Información de los mecanismos de marcado del receptor identificados por la presente invención, tales como imitadores de péptido biológicamente activos. Estos podrían prevenir la colonización/invasión

bacteriana de la mucosa así como producir anticuerpos que puedan ser bloqueadores, opsónicos y bactericidas.

Las secuencias de péptido biológicamente activas derivadas bacteriamente, identificadas por el ligando de la presente invención se podrían usar para estudiar los roles de las CEACAMs in el cáncer y el desarrollo en la medida en que las moléculas están asociadas con estos procesos. Estos también tienen potencial como agentes anti-cáncer y para controlar o, de otra forma en el tratamiento de angiogénesis.

En una realización adicional, la invención provee el uso de un ligando de enlace del receptor de CEACAM en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de una enfermedad en la cual los receptores de CEACAM están involucrados en el marcado celular del patógeno que causa la enfermedad, en donde el ligando comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo consistente de los residuos 463 a 863, 527 a 668, 527 a 863, 427 a 623, 427 a 668, y 427 a 863 de la secuencia mostrada en la Figura 6, o un fragmento, homólogo, equivalente funcional, derivado, degenerado y producto de hidroxilación, sulfonación o glicosilación, u otro producto de procesamiento secundario de esta.

Preferiblemente, la enfermedad es seleccionada del grupo consistente de infección, enfermedad respiratoria, enfermedad neoplásica y condiciones asociadas de enfermedad neoplásica, y angiogénesis.

Los medicamentos como se describieron anteriormente, son de utilidad particular cuando el patógeno infecta, o entra mediante una membrana mucosa.

Los medicamentos como se describieron aquí son particularmente útiles en el tratamiento o prevención de infecciones (enfermedad) causada por la *Moraxella catarrhalis*. Sin embargo, los ligandos como se describen aquí son útiles en la fabricación de medicamentos para el tratamiento de cualquier enfermedad en donde los receptores de CEACAM están implicados, tales como enfermedades causadas por *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus influenzae*.

s 79

En una realización particularmente preferida, la enfermedad es otitis media.

Los ligandos de la invención también se pueden usar en el tratamiento de enfermedades causadas por otras bacterias orales tales como caries dental.

Las realizaciones de la presente invención serán ahora descritas únicamente a manera de ejemplo no limitante en el cual se hace referencia a los figuras de las cuales:

La Figura 1 es una gráfica que muestra los niveles relativos de enlace de la construcción de receptor soluble CEACAM1-Fc ($1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) solo (barras blanca, mano izquierda), o en presencia del anticuerpo YTH71.3 específico del dominio de N CEACAM1 (barras gris, central) para 3 cepas de Mx inmovilizadas sobre nitrocelulosa. El enlace CD33-Fc en cada caso fue insignificante (barras negra, derecha). Cepas 1, 2, 3: MX2 (ATCC 25238), MX3, MX4 (aislados clínicos) respectivamente. El ligamiento se determinó en una extensión con punto de mancha y la intensidad de las reacciones de cuantificó mediante análisis densiométrico usando el programa NIH Scion Image.

La Figura 2 muestra una mancha de Western de las proteínas de cepa MX2 separadas bajo no disociación (no calentadas, pista 1) o después de ebullición por 10 min (pista 2). El manchado fue extendido con CEACAM1-Fc ($1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; a), anticuerpo péptido anti-UspA1 ($10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; b) y anticuerpo péptido anti-UspA2 ($10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; c). Note el perfil de migración similar de las proteínas de enlace de CEAM1-Fc y las proteínas de enlace Anti-UspA1 en las tres cepas. Los remanentes de proteínas no disociadas a c. 250 kDa, (detectados en este caso debido a la sensibilidad mayor de detección en el ensayo de fosfatasa alcalina) se enlazaron a CEACAM1-Fc. Estos son solamente reconocidos débilmente por los anticuerpos anti-péptidos, presumiblemente porque los epítopes contenidos en los péptidos sintéticos no están totalmente expuestos en la proteína nativa, que se torna progresivamente expuesta en la medida en que el complejo se desnaturaliza. Los anticuerpos anti-UspA2 se enlazan a las proteínas de

79

masas aparentes > 200 kDa, que permanecen no disociadas después de ebullición, una propiedad indicativa de las proteínas UspA2.

La Figura 4 muestra un espectro de masa de péptidos tripticos de la proteína de enlace CEACAM1 de MX2 siguiendo la electro-elución (4a). El resumen de la entrada de datos en la base de datos de identificación de proteína ProFound se muestra en (4b). Una tabla de las 10 proteínas identificadas y la probabilidad de valores se muestra en (4c). El detalle del candidato clasificado en el número 1, en este caso UspA1 con un puntaje Z de 2.34 se muestra en (4d) indicando el número de péptidos coincidentes, sus posiciones dentro de la proteína, el % de proteína cubierto y una lista de péptidos no coincidentes en esta ocasión.

La Figura 5 muestra un análisis de mancha de Western de fragmentos tripticos de UspA1 de MX2. A: Mancha de Control usando anticuerpos secundarios (mezcla de Fc anti-humano de cabra y Ig anti-conejo de cabra usados en B y C). B: mancha extendida con CEACAM1-Fc y Fc anti-humano de cabra. C: mancha extendida con anticuerpos de conejo purificados de afinidad elevados contra el péptido UspA1 (ETNNHQDQKIDQLGYALKEQGQHFNNR) (ver Figura 6) e Ig anti-conejo. * = pistas con marcadores de peso molecular – mostrados a la izquierda. Los péptidos mostrados mediante las flechas dobles reaccionan fuertemente con CEACAM1-Fc (B) así como con los anticuerpos de péptido anti-UspA1 (C). El enlace de los anticuerpos de péptido anti-UspA1 al péptido de más bajo PM (punta de la flecha) identifica este fragmento de enlace de CEACAM con el fragmento del terminal C contenido dentro del N-199 a K-863 de UspA1 de MX2 (Ver Figura 6).

La Figura 6 muestra la secuencia de aminoácido de la proteína UspA1 de MX2. el péptido específico de UspA1 usado para elevar el antisuero en conejos se muestra en negrita. La región de enlace de CEACAM está contenida en el fragmento subrayado del terminal C del UspA1 de MX2.

La Figura 7 muestra la separación de péptidos tripticos que reaccionan con las CEACAMs. La cepa MX2 de *M. catarrhalis* se trató con 1 mg/ml de tripsina a 37°C por 10 min. La muestra tripsinizada se electroeluyó durante la noche. La proteína electroeluida fue liofilizadas y resuspendida

en amortiguador, y se aplicó a un segundo gel. Parte del gel fue manchado en nitrocelulosa y las bandas de péptido que reaccionaron con CEACAM fueron identificadas mediante extensión con macha Western usando CEACAM-Fc (Mancha).

(*) denota bandas de péptido enviadas para el secuenciamiento del terminal N.

La Figura 8 muestra la secuencia de aminoácido de un péptido tríptico de la proteína UspA1 de MX2. El péptido tríptico de 50 kDa mostrado (aminoácidos 753-863) se enlaza a CEACAM y el antisuero contra el péptido UspA1 (aminoácidos 753-780 subrayados). La secuencia del terminal N del CEACAM de c. 50 kDa que enlaza al péptido es "ALESNVEEGL" que se encuentra después del sitio de clivado de tripsina en el amino ácido 462.

La Figura 9 muestra una representación diagramática de las posiciones de las plantillas usadas para generar los fragmentos del gen *uspA1* para la expresión de los péptidos recombinantes. El sitio de enlace de CEACAM1 fue codificado por el ADN amplificado mediante las plantillas P4 y P7, se diseñaron y usaron plantillas adicionales a lo largo de esta región (letras A-I).

La Figura 10 muestra la secuencia del fragmento recombinante 4-7. La región subrayada es la región del terminal N del péptido tríptico reactivo de CEACAM1. El peso molecular predicho del fragmento 4-7 es c. 26 kDa. El PM predicho del fragmento His-marcado: c. 28 kDa. La posición del péptido truncado está mostrada por "t" (Ver Figura 3).

La Figura 11 es un diagrama que muestra estrategia general de clonación, expresión y purificación para los péptidos UspA1 recombinantes, como lo ejemplariza el sistema pQE30.

La Figura 12 es un mapa del vector pQE30.

La Figura 13 muestra en enlace de CEACAM-Fc en extensión de mancha a los polipéptidos recombinantes 4-8 (pista 3), 4-T (pista 4) y 4-7 (pista 5). La pista 1 contenía un péptido recombinante de control Treponemal y la pista 2 contenía lisatos de M15 no inducido que contienen la construcción 4-8.

La Figura 14 muestra manchas de Western que muestran la reactividad del péptido recombinante con el anticuerpo etiqueta anti-His (superior) y CEACAM1-Fc (inferior). Las pistas 2-4 contenían el péptido 6-8, la pista 1 contenía 4-8 como control. Las posiciones de migración predichas de los péptidos se muestran a la derecha. Ambos péptidos se enlazan al anticuerpo anti-His. Sin embargo, mientras que 4-8 se enlaza al CEACAM1-Fc, 6-8 no lo hace.

La Figura 15 muestra que el polipéptido D-8 se enlaza a CEACAM1-Fc (pista 1) pero no a CD33-Fc usado como control (pista 2). El origen de este péptido se confirmó mediante reactividad con el anticuerpo de etiqueta anti-His (pista 3).

La Figura 16 es un diagrama esquemático de los tamaños y posiciones relativas de los fragmentos de rUspA1. El recombinante 4-7 se ha usado para el bloqueo bacteriano – ver Figura 17.

La Figura 17 muestra que los transfectantes CHO-CEACAM1 fueron incubados en ausencia de péptidos (A) o con el péptido de control recombinante (un péptido treponemal, B), o el péptido r4-7 de UspA1 (secuencia correspondiente a la cepa MX2, C y D) a las concentraciones mostradas, y se agregaron bacterias por un período de 2 horas. Al final de esta incubación, las bacterias no enlazadas fueron lavadas y las bacterias enlazadas fueron detectadas con antisuero policlonal de anti-*M. catarrhalis* y anticuerpo secundario conjugado de TRITC. A 1 µg/ml, se obtuvo una inhibición significativa de una cepa heteróloga de *M. catarrhalis*, y a 10 µg por ml, el enlace de *H. influenzae* se inhibió significativamente mediante el péptido recombinante UspA1 de *M. catarrhalis*.

Ejempl 1. Las cepas de *Moraxella Catarrhalis* se enlazan a CEACAM-Fc humana mediante las proteínas de UspA

Las cepas de *Moraxella catarrhalis* (Mx) usadas en este estudio incluyen aislados clínicos (MX3 y MX4) así como la cepa de referencia comprada en American Type Culture Collection (ATCC 25238, un cultivo clónico de esta fue designado MX2).

Ensayos de extensión del receptor muestran que la Mx se enlaza a las construcciones del receptor CEACAM-Fc

Para evaluar la interacción de las cepas de *M. catarrhalis* con CEACAM1, se aplicaron bacterias (c. $4 - 8 \times 10^6$) a nitrocelulosa, aire seco y los sitios de ligamiento no específico bloqueados en BAS-PBST al 3%. Las tiras de celulosa fueron recubiertas con CEACAM1-Fc ($1-2 \mu\text{g ml}^{-1}$) solo, o en presencia de el anticuerpo YTH71.3 del dominio de N de CEACAM1. Se uso CD33-Fc ($1-2 \mu\text{g ml}^{-1}$) como control negativo. Las construcciones de proteína quimérica se prepararon como se describió anteriormente ¹¹. El ligamiento del receptor quimérico se detectó mediante anticuerpos anti-humanos Fc de cabra conjugados ya sea con peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina. Se desarrollaron manchas con diamino bencideno y peróxido de hidrógeno, o sustratos de tetrazollo de nitroazul y 5-bromo-4-cloro-3-Indolifosfato respectivamente. Todas las cepas Mx se enlazaron a CEACAM1-Fc pero no a CD33-Fc (Fig. 1). El ligamiento del receptor se inhibió en presencia del anticuerpo YTH71.3 monoclonal, sugiriendo que las cepas se enlazaron al dominio del terminal N del receptor. En consecuencia, todas las cepas se enlazaron igualmente bien a la construcción N-Fc truncada de CEACAM1, que contenía solo el dominio N (no mostrado).

Identificación de la proteína de enlace de CEACAM1-Fc de *M. catarrhalis*

Lisatos de célula enteros de Mx (c. 3×10^7) fueron aplicados a pistas individuales de un gel de poliacrilamida bis-tris al 10% (Invitrogen), con tratamiento de calor o después de calentamiento a 100°C por 10 minutos, y sometidos a electroforesis por 45 min a 180 V. Las proteínas de los geles fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa usando condiciones de

manchado estándar. Las membranas de nitrocelulosa fueron extendidas con construcciones quiméricas solubles como se describió anteriormente. En cada caso, se observó que una proteína simple se enlazó específicamente a CEACAM1-Fc. La migración de la proteína sobre los geles fue indicativo de la proteína UspA de Mx, porque cuando los lisatos bacterianos fueron aplicados sin desnaturalización de calor, las proteínas de enlace de CEACAM1 migraron con una masa aparente de > 200 kDa, mientras que cuando los lisatos primero se calentaron, las proteínas de enlace de CEACAM1 migraron con una masa reducida de *circa* 92 kDa (Fig. 2).

Los anticuerpos aumentados contra UspA1 pero no aquellos contra una proteína UspA2 similar se enlazaron a las proteínas de enlace de CEACAM1-Fc de las cepas de Mx

Se diseñaron péptidos según las secuencias publicadas para las proteínas UspA de cepas de *M. catarrhalis*. A saber,

ETNNRQDQKIDQLGYALKEQGQHFNNR (péptido de UspA1) y KDEHDKLITANKTAIDANKAS (péptido de UspA2). Los péptidos fueron acoplados a KHL por medio de un residuo de cisteína de terminal N que fue incorporado, y se usaron para inmunizar conejos (200 μ g de péptido por conejo) a intervalos de 14 días, inicialmente con adyuvante de Freund completo y posteriormente con adyuvante de Freund incompleto. Los conejos fueron sangrados a intervalos en el día 0 y en el día 14 post inmunización. Los anticuerpos policlonales fueron purificados usando el péptido apropiado acoplado a las columnas AminoLink Plus (Pierce). Se usaron anticuerpos específicos de UspA a una concentración de 1-10 μ g ml⁻¹ para recubrir la mancha Western y se detectaron con anticuerpo secundario de cabra anti-conejo acoplado a la fosfatasa alcalina. Las manchas se desarrollaron como se describió anteriormente. La migración de las proteínas de enlace de CEACAM1-Fc sobre SDS-PAGE de las tres cepas de Mx fue idéntica a la de las proteínas de enlace de anticuerpo de UspA1, pero no a las proteínas de enlace de anticuerpo de UspA2 (Fig. 3).

La co-precipitación del ligando de *M. catarrhalis* con CEACAM1-Fc es identificada como UspA1

Durante la noche, cultivos de bacterias fueron suspendidos en 100 nM de octil β D glucopiranosida en PBSB que contenía un cocktail de inhibidor de proteasa (pic; PMSF 1 nM, E-64 1 μ M, pepstatina A 1 μ M, bestatina 6 nM y EDTA 100 μ M). Las muestras fueron mezcladas de extremo a extremo durante la noche a 4°C. Mientras tanto 100 μ l de proteína A acoplada a sefarosa CL-4B (Sigma) se incubó en 20 μ g de CEACAM1-Fc o CD33-Fc (usado como control), durante la noche a 4°C, y posteriormente se lavó 3 veces con PBSB para remover cualquier receptor no enlazado. El material bacteriano insoluble fue removido por centrifugación a 15, 000 g por 30 min. El extracto soluble fue incubado con complejo receptor - sefarosa Proteína A por 2h a 4°C (a una relación de 5×10^6 bacterias por μ g de construcción de receptor). Seguido de un lavado extensivo con octil β D glucopiranosida 50 mM y PBSB, las muestras fueron analizadas mediante electroforesis SDS-PAGE y Manchado Western bajo condiciones de desnaturalización.

En los experimentos de co-precipitación con CEACAM1-Fc, las MX4 produjeron una proteína fuertemente colorante de c. 97 kDa y las MX3 produjeron una proteína de relativamente débilmente colorante de c. 92 kDa. Las masas de las proteínas co-precipitadas correspondían a las observadas en los experimentos de extensión del receptor (mostrados en la Fig. 3). Ninguna proteína se co-precipitó con CD33-Fc. Las proteínas co-precipitadas fueron además identificadas como proteínas UspA1 porque se enlazaron al anticuerpo de péptido anti-UspA1. Adicionalmente, siguiendo la extirpación del gel, la proteína de MX4 se sometió a espectrometría de masas MALDI-TOF (ver a continuación).

Identificación del ligando CEACAM1 mediante espectrometría de masas MALDI-TOF

(a) Muestras de extensión Western. Lisatos de célula entera de MX2 y MX3 fueron sometidos a SDS-PAGE en geles con surcos y la banda correspondiente al ligando de enlace de CEACAM1-Fc fue electroeluido del gel. La muestra fue concentrada y re-aplicada en una pista simple de un

segundo gel, sometida a electroforesis antes de la digestión de tripsina en el gel, de la proteína apropiada. Los péptidos resultantes fueron analizados mediante espectrometría de masas de desorción Láser asistida por Matriz/ionización de tiempo de vuelo (MALDI-TOF). Un ejemplo del espectro de masas resultante se muestra para la proteína de enlace CEACAM de MX2 (Fig. 4a). Las masas de péptido obtenidas fueron ingresadas al sitio de identificación de proteína ProFound y se obtuvieron los resultados como se muestran para esta proteína (Fig. 4b, c). En este caso 10 masas de péptido coincidieron con las masas predichas para péptidos tripticos de UspA1 de *M. catarrhalis* que cubren aproximadamente el 18% de la proteína (Fig. 4d). El puntaje Z de 2.34 es altamente sugestivo que es la proteína UspA1 (puntaje $Z > 1.65$ está por encima del 95 percentil); http://129.85.19.192/profpund_bin/webProfound.exe). Además, se identificó otra banda de alto peso molecular no enlazante de MX2 como UspA2 siguiendo un análisis similar. De la misma forma para la cepa MX3, se identificaron las proteínas CEACAM1 enlazantes y no-enlazantes, como UspA1 y UspA2 respectivamente.

(b) Muestras co-precipitadas: Para MX4, la proteína co-precipitada CEACAM-Fc (como se describió anteriormente) también se identificó como UspA1 mediante MALDI-TOF MS con un puntaje Z de 2.27 en toda la búsqueda taxones. Coincidieron 12 péptidos que cubren el 21% de la proteína.

Por lo tanto, este estudio ha identificado que la *Moraxella catarrhalis* marca CEACAM1 humano mediante la proteína UspA1 de alto peso molecular en la referencia y en las cepas clínicas indicadas.

Clivaje enzimático de UspA1 y péptido recombinante

(a) *Péptidos tripticos de UspA1 se enlazan a CEACAM1-Fc*

Las suspensiones bacterianas de MX2 (10^{10} ml⁻¹) fueron tratadas con tripsina (Sigma) a concentraciones de 0.1-1 mg/ml y se incubaron por 1-4 hrs a 37°C. Los lisatos digeridos fueron disociados en amortiguador de SDS-PAGE, ebullicos y sometidos a electroforesis. Después de la transferencia a nitrocelulosa, las manchas fueron extendidas con la

construcción del receptor CEACAM-Fc o los anticuerpos de péptido anti-UspA1 purificados por afinidad. Un pequeño fragmento que reacciona con el receptor también se enlazó a los anticuerpos específicos de anti-UspA1 (Fig. 5).

(b) Localización del dominio enlazante de CEACAM de UspA2 de la cepa MX2 de *M. catarrhalis*

Las suspensiones bacterianas de MX2 fueron tratadas con Tripsina a 1 mg/ml por 10 minutos a 37°C.

La muestra tripsinizada se corrió en un gel SDS-PAGE. Después de la coloración, la región de 50 kDa fue electroeluida durante la noche. La proteína electroeluida fue liofilizada y resuspendida en amortiguador, y aplicada a un segundo gel. Parte del gel fue manchado en nitrocelulosa y las bandas de péptido que reaccionan con CEACAM fueron identificadas mediante extensión de manchado Western usando CEACAM1-Fc (Fig. 7).

Las bandas de péptido que corresponden a péptidos de circa. 50 kDa y circa. 150 kDa se sometieron al secuenciamiento del terminal N. Las secuencias del terminal N fueron ALESNVEEGL (péptido de c. 50 kDa) y ALESNV (péptido de c. 150 kDa). La proteína de 150 kDa es aparentemente un trímero de la proteína de 50 kDa en la medida en que tengan la misma secuencia de terminal N. La secuencia de terminal C de este péptido de UspA1 de MX2 se muestra en la Figura 8.

(c) Péptido recombinante

El péptido de MX2 recombinante de terminal N que se construyó, consistente de los amino ácidos 1 a 449 de la secuencia mostrada en la Figura 6 no se enlaza a CEACAM. Esto además indica que el péptido tríptico de c. 50 kDa que consiste de los amino ácidos 463 a 863 de la secuencia mostrada en la Figura 8, que tiene la secuencia terminal de ALESNVEEGL contiene el dominio enlazante CEACAM.

Ejemplo 2: Identificación de los Dominios de Enlace de Receptor sobre Múltiples Determinantes de Virulencia de Patógenos Mucosos

La *M. meningitidis* y *H. influenzae* marcan las moléculas de CEACAM mediante ligandos que se enlazan a sitios de traslape superposición en la CEACAM. Los ligandos Mx de la presente invención también marcan el dominio de N. Estas observaciones señalan una posibilidad excitante que características similares sobre ligandos de diferentes patógenos mucosos puedan estar involucradas en el marcado del receptor.

Como las interacciones Nm y Hi con las CEACAMs están directamente afectadas por las características estructurales de la superficie expresada en dominios variables, esto sugiere que pueden contener amino ácidos cruciales similares en una configuración espacial que es capaz de enlazarse al receptor, y estos pueden ser conservados en proteínas variables de otra forma. De hecho nuestros estudios y los de otros sugieren que las dos vueltas hiper-variables de Opa (HV1 y HV2) pueden estar involucrados en el marcado CEACAM^{9,18}. Una técnica potente que puede identificar posibles determinantes de interacciones entre ligandos y receptores es el despliegue del fago, que se puede usar para identificar mimotopos (secuencias aleatorias para imitar los dominios de enlace)¹⁹, así como aptámeros (secuencias relacionadas muy de cerca con la estructura original que inhibe en enlace del ligando)²⁰.

La invención actual también hace altamente posible que el dominio del ligando Mx que se enlaza a las CEACAMs actúe como un imitador para otros patógenos mucosos que se enlazan a CEACAM, y las características estructurales de este ligando ayudarán a identificar las características salientes requeridas en los ligandos Nm y Hi para el marcado del dominio de N de CEACAM. Los anticuerpos al dominio de Mx podrían tener el potencial para identificar otros ligandos que tienen la capacidad de marcar las mismas, similares o regiones posicionadas muy cerca del receptor.

La identificación del dominio mínimo de enlace de CEACAM1 de UspA2 de MX2 está siendo asumida usando métodos conocidos de ingeniería de proteínas y tecnología de ADN recombinante. Los péptidos recombinantes pueden ser seleccionados in vitro mediante los ensayos de

extensión del receptor descritos anteriormente para detectar el dominio de MX2 que se enlaza al receptor. Los péptidos marcados con His pueden ser separados en una columna de níquel, His-Tag clivados y usados para inmunizar conejos y ratones para obtener anticuerpos para investigaciones adicionales.

Se puede determinar un péptido de longitud adecuada para aplicaciones biológicas mediante el examen de las propiedades estimuladoras inmunológicas así como otras funciones tales como bloqueo del enlace del receptor.

Ejemplo 3. Características notables del Receptor requerido para las Interacciones del ligando

Como el dominio de N de CEACAM es suficiente para las interacciones de las proteínas Opa, la presente invención está usando una técnica de despliegue del fago también para investigar los epítopos adhesivos del dominio de N de CEACAM. El conocimiento de la(s) región(es) de enlace del ligando en el receptor, que ha sido estudiado por los presentes inventores por medio de mutagénesis de rastreo de alanina del receptor ⁹, ha facilitado este estudio. También en este caso, un ensayo de extensión de ligando está disponible para la biofiltración (concentración de afinidad) de fagos quiméricos que portan las secuencias del receptor.

Los análogos de receptor tienen el potencial de bloquear cepas múltiples independientemente del tipo de Opa producida ya que nuestros estudios ya mostraron que a pesar de su variación antigénica, las diferentes proteínas Opa requieren características comunes en el receptor para la adhesión primaria ⁹. También es de interés notar que los antígenos de CEA están despojados de la mucosa intestinal y pueden bloquear la adhesión de las cepas *E. coli* también conocidas por marcar las CEACAMs. Esto se ha propuesto como un mecanismo de inmunidad innato vs. patógenos entéricos. ¹² Así, estos análogos de receptores actúan como agentes terapéuticos.

Ejemplo 4. Producción de los los péptidos recombinantes de UspA de *Moraxella catarrhalis* que enlazan el CEACAM

Resumen:

La amplificación de PCR de varios fragmentos a lo largo de la longitud de UspA1 se realizó usando las plantillas mostradas en la Figura 9. Los péptidos recombinantes se obtuvieron como se describe a continuación. En la primera ronda, se encontró que el péptido recombinante que se enlaza a CEACAM1 estaba codificado por el ADN amplificado por las plantillas P4 y P8, pero no el codificado por la región entre P1 y P5. Además, el recombinante P4 – P7 se enlazó a CEACAM1 pero no P 6 – P8. Se usaron plantillas adicionales entre la región P4 y P7. La región D7 retuvo el enlace CEACAM. La secuencia del fragmento 4-7 se muestra en la Figura 10.

Estrategia de clonación, expresión y purificación general para los péptidos UspA1 recombinantes

El fragmento 1-5 de UspA1 se produjo usando el sistema pBAD. Los productos de PCR requeridos fueron clonados a TA en el vector pBAD, y se uso la cepa TOP10 de *E. coli* para la amplificación. El resto del procedimiento fue como se muestra en la Fig. 11 con excepción que la pBAD se indujo usando arabinosa. El fragmento 4-7 se produjo usando los sistemas pBAD y pQE30 (Fig. 11) con resultados de enlace de cEACAM similares. El resto de los fragmentos se produjeron usando la estrategia de la Fig. 11.

Vector y el sistema de expresión de pQE30

Se uso el vector pQE30 (Fig. 12) en conjunción con la cepa M15 de *E. coli*. La M15 contiene el plásmido pREP4 que codifica un represor, que restringe la transcripción de ADN clonado en pQE30. La adición de IPTG a una concentración de 1 mM evita la codificación de este represor y así, la transcripción de los fragmentos clonados en pQE30.

La estrategia de clonación

Los amplímeros de PCR fueron primero ligados en pCR2.1. Esto proporcionó un huésped estable del cual el amplímero podía ser recuperado mediante la digestión de restricción (*Bam*HI/*Pst*I), asegurando que cada extremo del fragmento del gen fue cortado. La pQE30 se digirió en forma similar y se recuperó mediante purificación del gel, que también aseguró que ambos sitios de restricción habían sido cortados. El pQE30 digerido y el amplímero de UspA1 fueron ligados durante la noche a 16°C con ligasa de ADN T4, y se transformaron en M15 de *E. coli* competente de CaCl₂.

Los transformantes fueron seleccionados sobre agar LB complementado con ampicilina (100 µg/ml) y kanamicina (25 µg/ml). Se recogieron 4-8 colonias y se cultivaron en caldo LB con antibióticos. Las bacterias de 3-4 ml de cultivo fueron recolectadas mediante centrifugación y se sometieron al método de lisis miniprep alcalina. El vector purificado fue digerido como se indicó anteriormente para verificar el *inserto de uspA1*. Las bacterias que contenían pQE30 con un inserto de tamaño correcto fueron cultivadas en cultivos de 50 ml e inducidas con IPTG (ver más adelante). Entonces se usaron Manchas Western para seleccionar la producción de proteína recombinante. Además, los vectores fueron secuenciados para determinar que el inserto estuviera en la región correcta de ADN y verificar cualquier error de secuencia.

Expresión y Purificación

M15 que contenía construcciones de pQE30/uspA1 fueron cultivadas en caldo LB (complementados con 100 µg/ml de ampicilina y 25 µg/ml de kanamicina), con agitación a OD₆₀₀ = 0.5 antes de la adición de IPTG a una concentración 1 mM. Los cultivos fueron incubados por unas 3-4 horas adicionales y las bacterias se recuperaron mediante centrifugación. Los pellets bacterianos fueron solubilizados en amortiguador B (urea 8M, Tris 50 mM, etanol al 10%, Tween al 2%, imidazol 5mM, pH 7) por 1-3 horas, y el material de membrana fue removido por centrifugación a 20,000 g por 20 min. Los sobrenadantes fueron incubados con resina de níquel por 1-2 horas en un mezclador rotatorio, y pasados a través de una columna de

polipropileno. La resina retenida fue lavada con 5-10 ml de amortiguador B y la proteína enlazada fue eluida con eluciones de 0.5 ml de amortiguador B complementado con imidazol 100 mM. Las proteínas eluidas fueron verificadas mediante SDS-PHAGE antes de la diálisis para remover la urea y otras sales.

Fragmentos Recombinantes

A: Fragmentos 1-5 y 4-8

Estos fragmentos producidos por el sistema pBAD mostraron que 1-5 no se enlazó a CEACAM1 pero 4-8 si.

B: Fragmentos 4-8, 4-8T, 4-7 y 6-8 producidos usando el sistema pQE30.

El fragmento 4-8 fue el primer fragmento de rUspA1 producido, y se encontró que se enlaza a CEACAM con una alta afinidad en los ensayos de extensión de mancha. Además del péptido rUspA1 4-8 de longitud total, se observó una proteína más pequeña truncada. Este péptido (designada 4-T) también se enlazó a CEACAM1 y parece estar expresado en niveles más bajos que en 4-8 (Fig. 13). El análisis de secuencia de pQE30/4-T encontró una disparidad (CAA a TAA) que condujo a un codón de terminación en el residuo Q624 (ver Fig. 10).

Los péptidos 4-7 y 6-8 se produjeron con el fin de descartar la posibilidad que se encontrara un segundo sitio de enlace de CEACAM en 6-8. Como se predijo del péptido 4-T, 4-7 demostró enlace de CEACAM (Fig. 13) pero no de 6-8 (Fig. 14).

C: Fragmentos D-8 y D-7 producidos por el sistema pQE30

Se encontró que ambos fragmentos de rUspA1 D-8 (Fig. 15) y D-7 (no mostrado) se enlazaron a CEACAM1.

Actividad Biológica del péptido recombinante 4-7

La cepa MX1 de *M. catarrhalis* y la cepa Rd de *H. influenzae* se enlazan a las células de Ovario de Hámster Chino (CHO) trasnfectadas con CEACAM1. Su enlace puede ser bloqueado con el péptido recombinante 4-7 de UspA1 de *M. catarrhalis*, pero no a un péptido de control (Fig. 17).

Referencias:

1. Cartwright et al. 1995. En *Meningococcal Disease*. John Wiley & Sons.
2. van Alphen, L. & van Ham, S.M. 1994, *Rev Med Microbiol* 5:245.
3. Foxwell, A. R. et al. 1998. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:294:
4. van Alphen L. et al. 1995. *Am J Respir Crit Car Med* 151:2094.
5. Karalus, R. et al. 2000. *Microbes & Infection* 2:5.
6. Kraft, M. 2000. *Clin Chest Med* 21:301.
7. Virji, M. et al. 1996. *Mol Microbiol* 22:929.
8. Virji, M. et al. 1996. *Mol Microbiol* 22:921.
9. Virji, M. et al. 1999. *Mol Microbiol* 34:538.
10. Virji, M. et al. 2000. *Mol Microbiol* 36:784.
11. Hill, D. et al. 2001 *Mol Microbiol* 39:850.
12. Hammarström, S. 1999 *Cancer Biol* 9:67.
13. Stephens, D. S. 1989. *Clin Microbiol Rev* 2:S104.
14. Virji, M. et al. 1991. *Mol Microbiol* 5:1831.
15. Achtman, M. 1995 *Trends Microbiol* 3:186.
16. Merz, A. J. & So, M. 2000 *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:423.
17. Woods, J.P. & Cannon, J. G. 1990 *Infect Immun* 58:569.
18. Wang, L-F & Yu, M. 1996, En *Methods Mol Biol* 66:269 (Morris, G.E. ed). Humana Press.
19. Colman-Lerner. 2000. *Trends Guide* p.56 (Wilson, E. ed.).
20. Beauchemin, N., et al., 1999 *Exp Cell Res* 252: 243-249.
21. Boulton I.C. & Gray-Owen S.D. 2002 *Nat Immunol* 3(3):229-36.
22. Chen T. et al., 2001 *J Leukoc Biol* 70(2):335-40.
23. Lafontaine, E.R., et al., *J Bacteriol* 182:1364-1373.
24. Virji, M. 2001 *Trends in Microbiol*, 9:258-259.

REIVINDICACIONES

1. Un ligando que es parte de la molécula UspA1 entera, que incluye el dominio de enlace del receptor CEACAM, dicho ligando comprende los residuos 427 a 623 de la SEC ID No. 2, o un fragmento de esta requerido para el enlace del receptor CEACAM.
2. El ligando según la reivindicación 1, en donde el ligando consiste de una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo consistente de los residuos 463 a 863, 527 a 668, 527 a 863, 427 a 623, 427 a 668, y 427 a 863 de la SEC ID No: 2.
3. Un medicamento que comprende el ligando según la reivindicación 1 o reivindicación 2, y uno o más adyuvantes, vehículos, excipientes, aglutinantes, portadores o preservativos farmacéuticamente aceptables.
4. El uso de un medicamento según la reivindicación 3 para el tratamiento o profilaxis de infección.
5. El uso de un medicamento según la reivindicación 3 para el tratamiento o prevención de una enfermedad en donde los receptores CEACAM están implicados en el marcado celular del patógeno que causa la enfermedad.
6. El uso según la reivindicación 5 para el tratamiento o prevención de infección, enfermedad respiratoria, enfermedades neoplásicas y condiciones asociadas con enfermedades neoplásicas y angiogénesis.
7. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en donde la infección está o aparece en una membrana mucosa.
8. El uso según la reivindicación 7, en donde la infección es causada por *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* o *Moraxella catarrhalis*.
9. El uso de un medicamento según la reivindicación 3 para la profilaxis o tratamiento de otitis media.

10. El uso del ligando según la reivindicación 1 en un ensayo de selección para la identificación de nuevos reactivos de bloqueo para uso como agentes terapéuticos, que comprende la selección de agentes terapéuticos potenciales por su habilidad para imitar, o por su homología a dicho ligando.
11. Una vacuna que comprende al ligando según la reivindicación 1 y uno o más adyuvantes, vehículos, excipientes, aglutinantes, portadores o preservativos farmacéuticamente aceptables.
12. Un método para tratar o prevenir la infección en un individuo en necesidad de este, que comprende la administración de una cantidad efectiva de un medicamento según la reivindicación 2.
13. Un ligando sustancialmente como el descrito aquí con referencia y como se ilustra en la Figura 6 de los dibujos acompañantes.
14. Un medicamento sustancialmente como el descrito aquí, que comprende el ligando de la reivindicación 13.
15. El uso de un ligando de enlace del receptor CEACAM en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de una enfermedad, en la cual los receptores CEACAM están involucrados en el marcado celular del patógeno que causa la enfermedad, en donde el ligando es una parte de la molécula UspA1 entera, que incluye un dominio de enlace del receptor CEACAM, dicho ligando comprende una secuencia de amino ácido seleccionada del grupo consistente de los residuos 463 a 863, 527 a 668, 527 a 863, 427 a 623, 427 a 668, y 427 a 863 de la SEC ID. No: 2, o un fragmento o equivalente funcional de esta que retiene la habilidad de enlace a CEACAM.
16. El uso según la reivindicación 15, en donde la enfermedad es seleccionada del grupo consistente de infección, enfermedad respiratoria, enfermedades neoplásicas y condiciones asociadas con enfermedades neoplásicas y angiogénesis.
17. El uso según la reivindicación 15 o 16, en donde el patógeno infecta o entra por una membrana mucosa.

18. El uso según las reivindicaciones 15 a 17, en donde el patógeno que causa la enfermedad es seleccionado del grupo consistente de *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis*.

19. El uso según la reivindicación 18, en donde la enfermedad de otitis media.

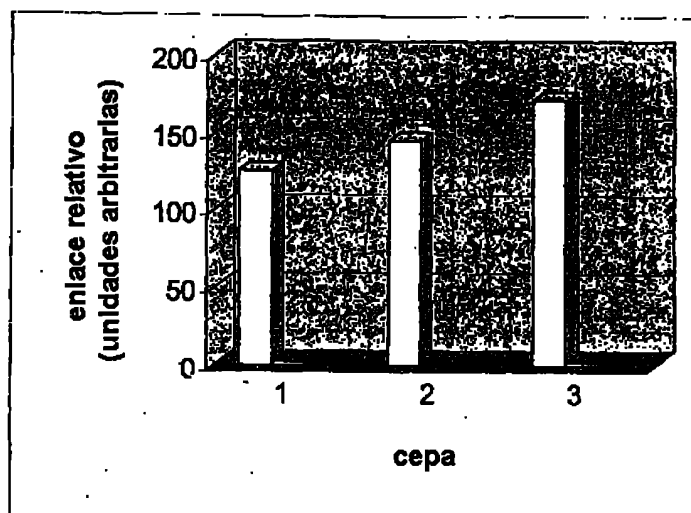


Figura 1

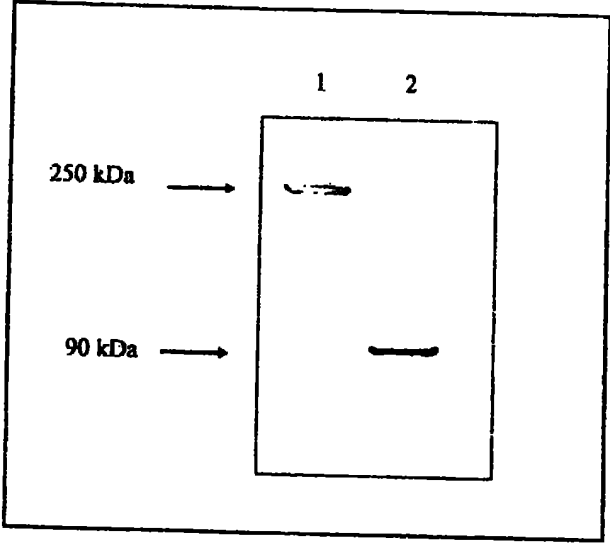


FIGURA.2

99

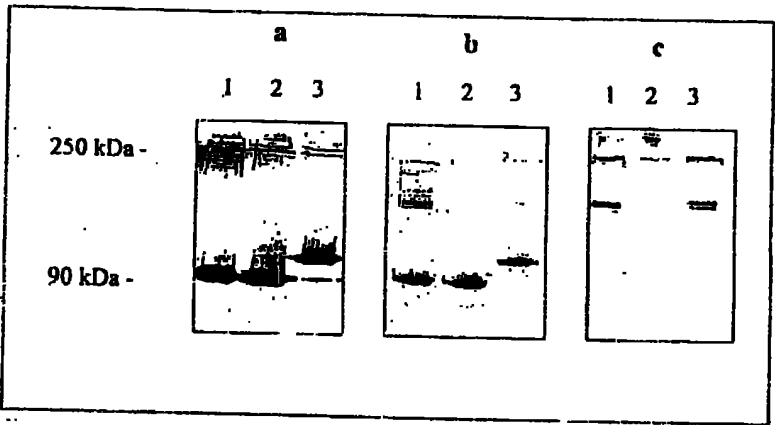


FIGURA.3

100

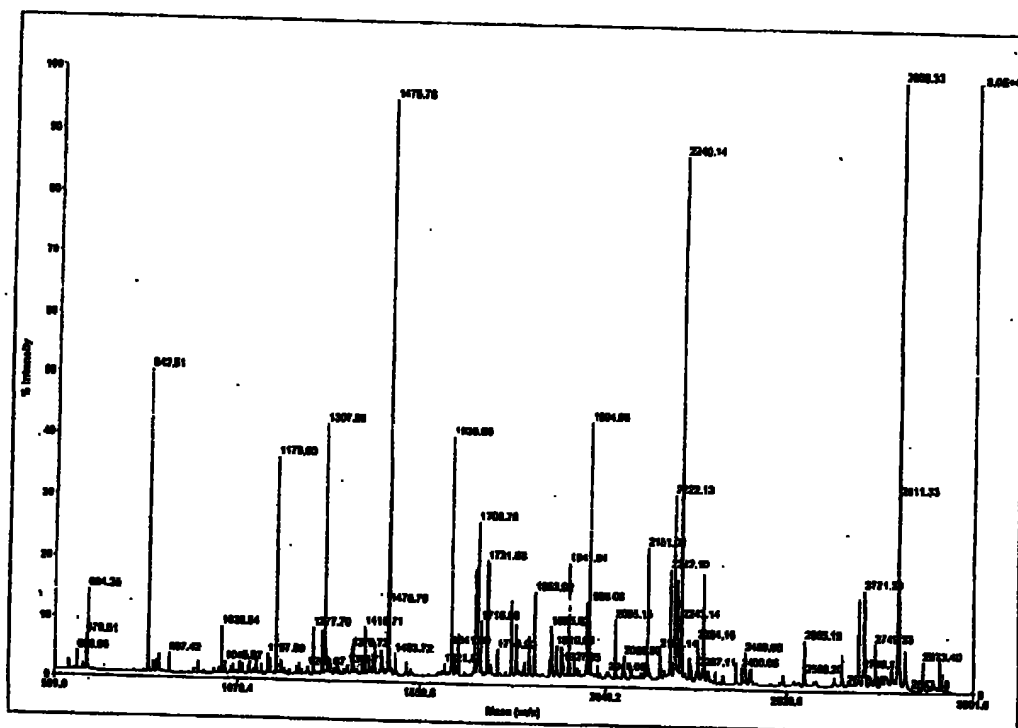


FIGURA 4a

107

Input Summary												
Date & Time Thu Aug 02 11:55:23 2001 UTC (Search Time: 17.38 sec)												
Sample ID 11020EE20-7-01												
Database NCBI nr (2001/07/29)												
Taxonomy Category All-taxa												
Protein Mass Range 80 - 100 kDa												
Protein pI Range 0.0 - 14.0												
Search for Single protein only												
Digest Chemistry Trypsin												
Max Missed Cut 1												
Modifications None												
Charge State MH+												
Peptide Masses (Da, Average)												
Tolerance (AVG) 1.00 ppm												
Peptide Masses 679.514 684.348 842.510 897.421 1036.535 1126.566 1157.592 1179.598 1277.702												
(Da, Monoisotopic) 1300.538 1302.633 1306.630 1307.681 1311.689 1379.718 1383.708 1415.714												
1424.752 1434.769 1438.723 1440.774 1458.736 1474.731 1475.757 1637.850												
1638.859 1648.850 1657.807 1700.854 1701.869 1707.781 1715.823 1716.858												
1731.876 1757.875 1794.809 1807.903 1826.798 1837.968 1851.920 1890.972												
1895.922 1909.054 1922.930 1927.947 1940.931 1955.978 1987.056 1993.976												
2016.988 2064.139 2081.967 2087.974 2150.075 2184.140 2211.104 2221.129												
2225.129 2230.218 2239.136 2261.122 2283.164 2297.197 2299.182 2383.981												
2399.049 2408.087 2564.193 2663.346 2705.179 2717.129 2720.281 2748.314												
2781.924 2791.004 2792.915 2805.359 2807.327 2825.331 2872.402 2914.526												
2921.383												
Tolerance (MON) 20.00 ppm												
Number of Peptides 82												

FIGURA 4b

ProFound - Search Result Summary				Version 4.10.5 The Rockefeller University Edition			
Protein Candidates for search C28ABE6901DC-745F3ee [731183 sequences searched]							
Rank	Probability	Estat Z	Protein Information and Sequence Analysis Tools (T)	%	pI	kDa	
1	1.0e+000	2.14	T.gi545312426 AAAD3465.1 AF113606.1 AF113606 UspA1 [Moraxella catarrhalis]	18	5.7	90.52	Ⓢ
			T.gi7208237 gb AAAF40122.1 AF181076.1 AF181076 USPA1 [Moraxella catarrhalis]	14	5.4	91.86	Ⓢ
			T.gi5453178 gb AAD43467.1 AF113608.1 AF113608 UspA1 [Moraxella catarrhalis]	15	5.7	99.06	Ⓢ
			T.gi5453187 gb AAATM3469.1 AF113610.1 AF113610 UspA1 [Moraxella catarrhalis]	13	5.3	95.75	Ⓢ
			T.gi4082296 AAAF40118.1 AF181072.1 AF181072 USPA1 [Moraxella catarrhalis]	11	5.6	96.95	Ⓢ
			T.gi8572547 gb AAB96359.2 U57531 high molecular weight outer membrane protein [Moraxella catarrhalis]	8	4.9	88.27	Ⓢ
2	1.6e-011		T.gi212872 gb U64449 hypothetical protein bJ1198 - Methanococcus jannaschii	8	5.6	85.92	Ⓢ
3	1.3e-012		T.gi7108403 gb AAAF36416.1 U61725.1 U61725 USPA1 [Moraxella catarrhalis]	12	5.7	93.34	Ⓢ
4	4.6e-013		T.gi1336627 emb CAC51587.2 A1031687 dj998116.1 (ortholog of rat PE-Cadherin) [Homo sapiens]	12	4.6	89.07	Ⓢ
5	7.9e-015		T.gi11270895 gi 1181749 DNA topoisomerase I [C0012 [uniprot]] [Chlamydia muridarum (strain Nigg)]	10	9.2	97.92	Ⓢ
6	5.4e-013		T.gi9629643 ref NP_044927.1 capsid [adenovirus 4]	11	6.1	80.62	Ⓢ
7	4.9e-013		T.gi7427065 tr 115778 hypothetical protein K35D8.2 - Cacanthabasis elegans	9	6.0	97.36	Ⓢ
8	4.3e-013		T.gi4002690 gb AAK51717.1 AF148175 PA protein [influenza A virus (A/Hong Kong/1/68)(H3N2)]	9	5.3	82.98	Ⓢ
9	3.6e-013		T.gi14923264 gb AAK75842.1 AF007469 glycosyl transferase, family 8 [Streptococcus pneumoniae]	9	5.2	94.60	Ⓢ
10	1.2e-013		T.gi12423336 gb AAK23864.1 AF005862 ribonucleotide reductase-related protein [Caulobacter crescentus]	10	5.1	98.47	Ⓢ

FIGURA 4c

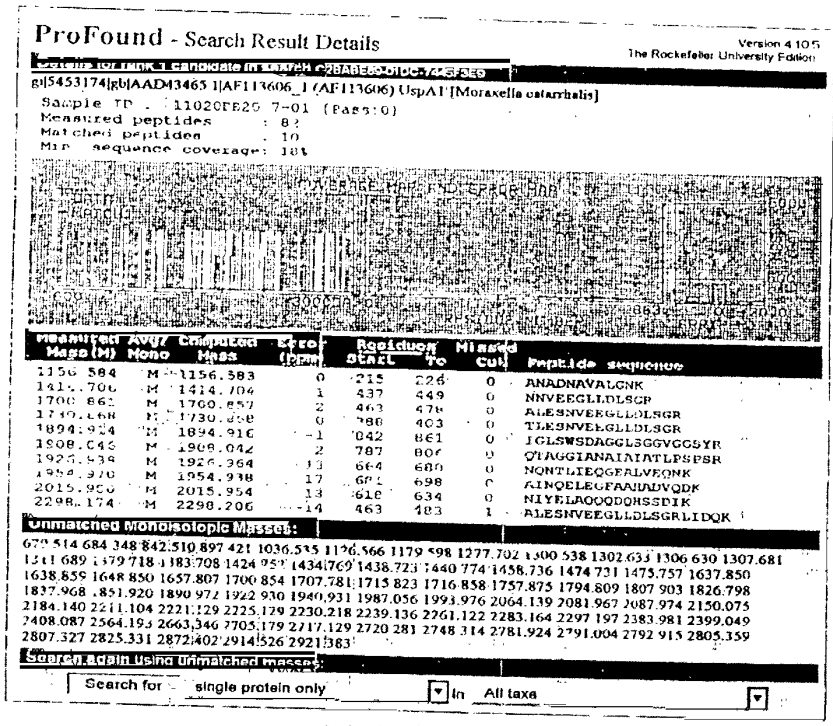


FIGURA 4d

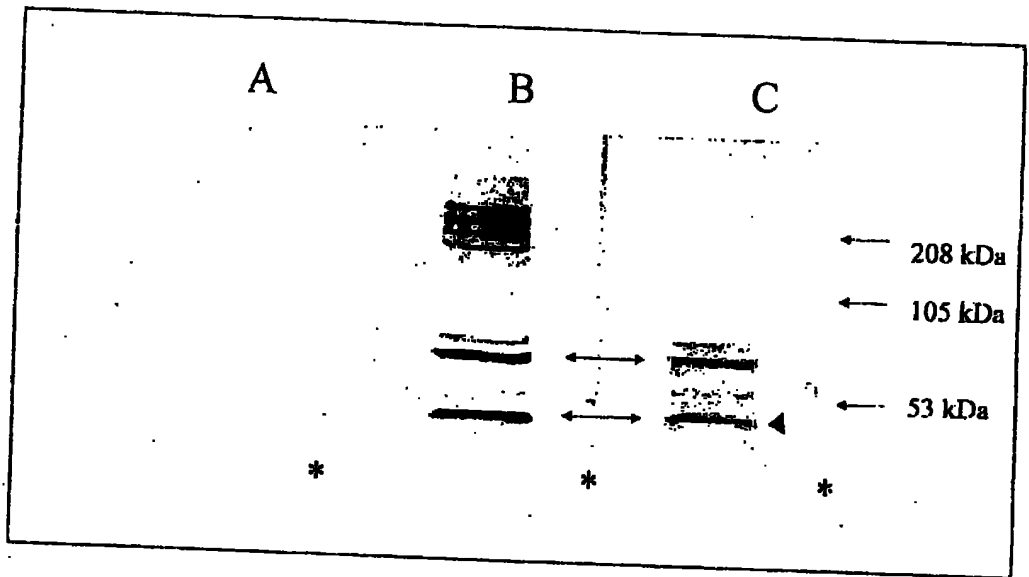


FIGURA.5

105

1MNKIYKVKKNAAGHLVACSEFAKGHTKKAVLGSLLVGILGMATTASAKVKGATNKISGGDNNTANGTYLTIGGGDY 79
 79NKTGGRYSTIGGGLFNEATNEYSTIGSGGYNKAGRYSTIGGGGYNEATNQYSTIGGGDNNTAKGRYSTIGGGGYNEATI 108
 159ENSTVGGGGYNOAKGRNSTVAGGYNNEATGTDSTAGGRKNOATOKGSFAAGIDNKANADNAVALGNKNTIEGENSYA 228
 227GSNNTVKKGGQONVEILGSNTDTTNAQNGSVLLGHNTAGKAATVNSAEVGGLSLTGFAGASKTCNGTVSVGKKGKERQ 296
 317VHYGAGEISOTSIDAVNGSQLHALATVVAQNKADIKDLDEEVGLLGEINSLEGEIFNNQDAIAKNOADIKTLESNVEEG 385
 387LLDLSGRLLDQKADIDNNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLKNNVEEGLLDLSGRLDQKADLTQKIKALESNVEEGLLDLSGRL 455
 481DQKADIAKNOADIAQNOQTDIQDLAAYNELQDAYAKQOTEIDA LNKASSANTDRIATAELGIAENKKDAQIAKAOANEN 528
 529DQGIKNOADIQLHDKKITNLGILHSMVARAVGNNTQGVATNKADIAKNOADIANNIKNIYELAQQQDQHSSDIKTLAK 598
 639VSAANTDRIAKNAEADASFETLTKNQNTLIEQGEALVEQNKAINQELGFAAHADYQDKQILQNOADITTNKTAIEQNIN 719
 720RTVANGFEIEKNKAGIATNKQELILQNDRLNRINETNNHQQKIDQLGYALKEGGQHFNRI SAVERQTAGGIANAIATL 801
 822PSPSRAGEHIMLEGSGYHNGQAAYSLGAAGLSDTGKSTYKIGLSWSDAGGLSGGVGGSYRWK 883

FIGURA.6

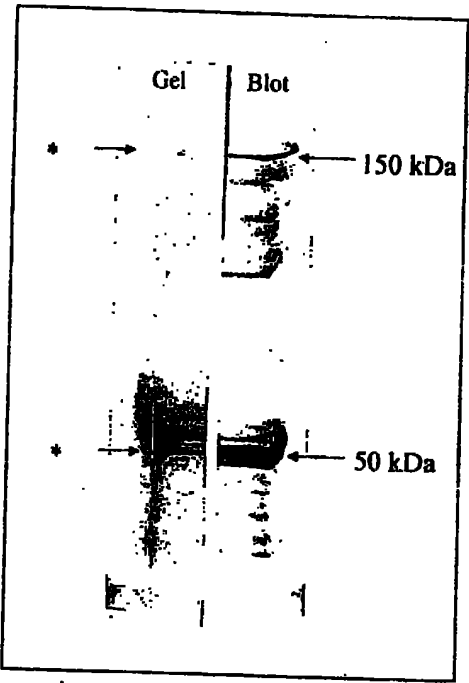


FIGURA.7

AD7

403 ALESNVEEQLLDLSGRLI 400

411 DQKADIKNQADIAQNGTDIQDLAAYNELQDAYAKQQT EADALNKASSANTDRIATAELGIAENKKDAQIAKAQANEN 600

500 KDGIAKNQADIQLHDKKITMLGILHSMVARAVGNNTQGVATNKADIKNQADIANNIKNIYELAQGGQGHSSDIKTLAK 630

630 VSAANTDRIAKNAEADASFETLTKNQNTLIEQGEALVEQNKAINQELGFAAHADVQDKQILQNGADIITNKTAIEQNIN 710

720 RTVANGFEIEKNKAGIATNKQELILQNDRLNRINETNNHQQDKIDQLGYALKEQSQHFNNRISAVERO TAGGIANAIATL 801

802 PSPSRAGEHHVLFQSGYHNGQAAYSLGAAGLSDTGKSTYKGLSWSDAGGLSGGVGGSYRWK 803

Figura 8

108

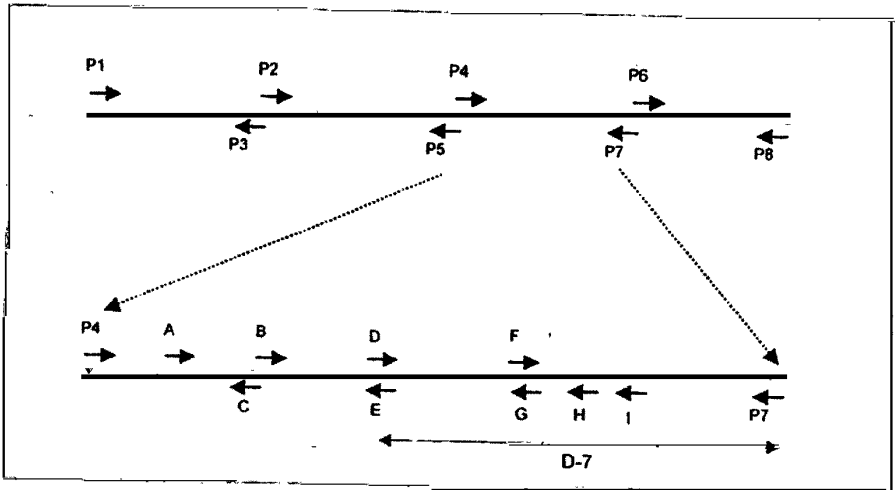


FIGURA.9

109

⁴²⁷qhssdiktlnnveeglldsgrldqkadltkdikalesnveeglldsgrli⁴⁸⁰

⁴⁸¹dqkadiaknqadiagnqtdiqdlaaynelqdayakqqteaidalnkassantdriataelgiaenkkdaqiakaganen⁵⁵⁹

⁵⁶⁰kdgiaqnqadiqlhdckitnlgilhsmvaravgnntqgvatnkadiaknqadiannikniyelagqqdqhssdiktak⁶³⁸

⁶³⁹vsaantdriaknkaeadasfetltnqntl⁶⁶⁸



FIGURA.10

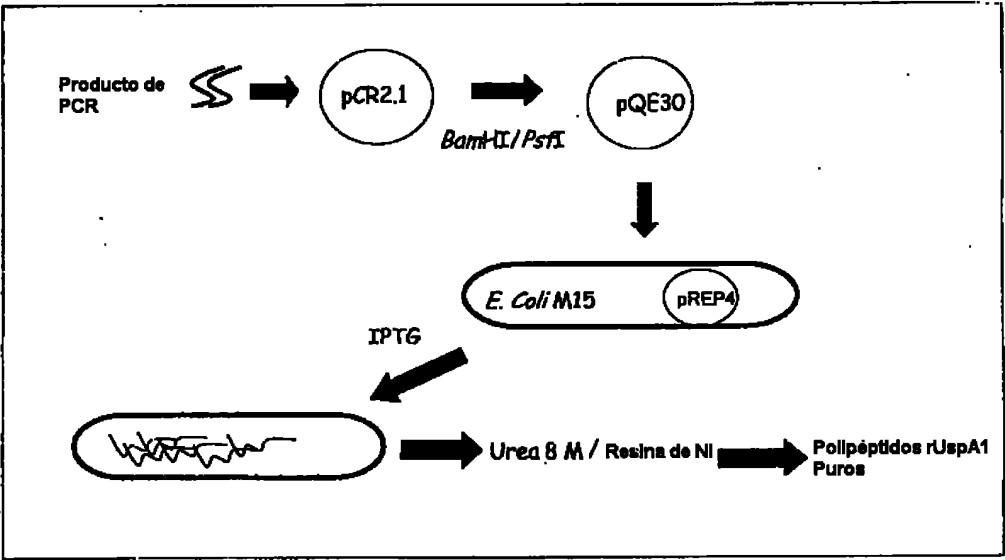


Figura 11

444

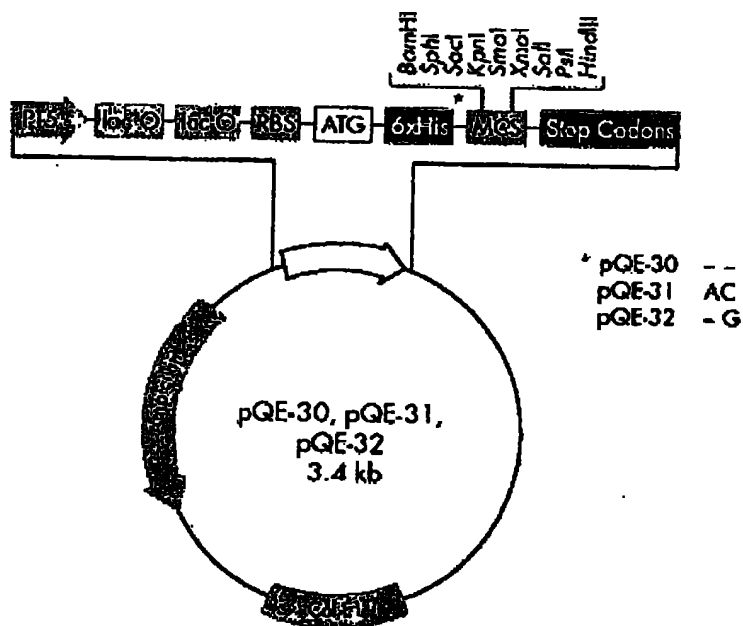


FIGURA 12

442

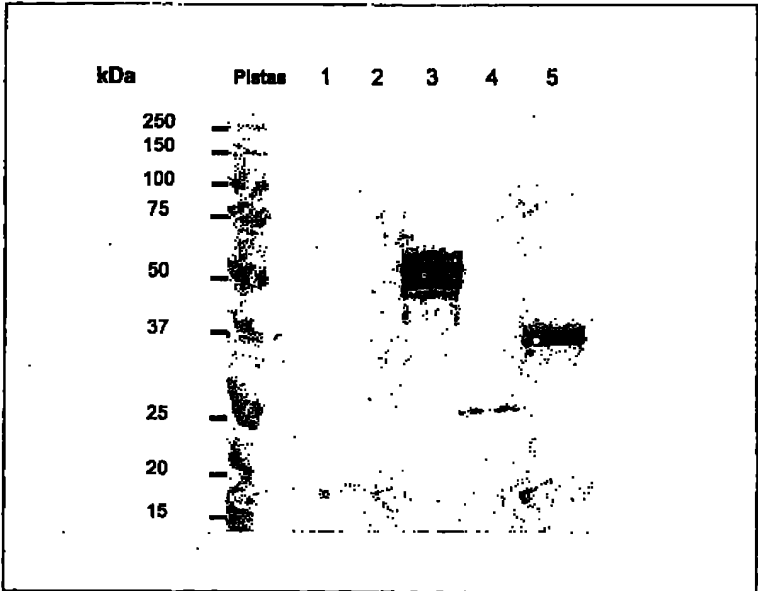


Figura 13

113

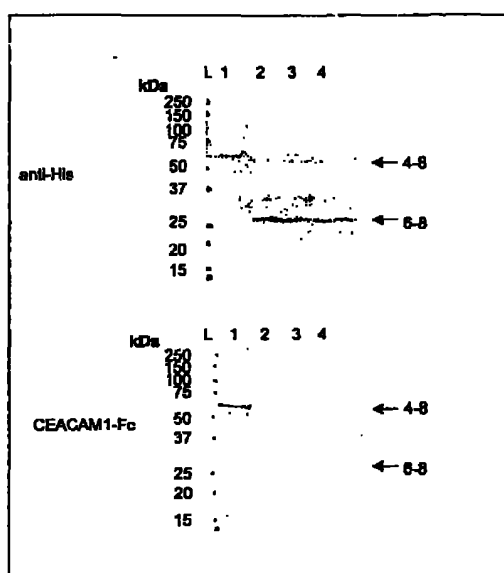


Figura 14

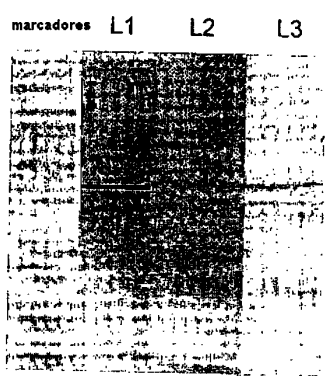
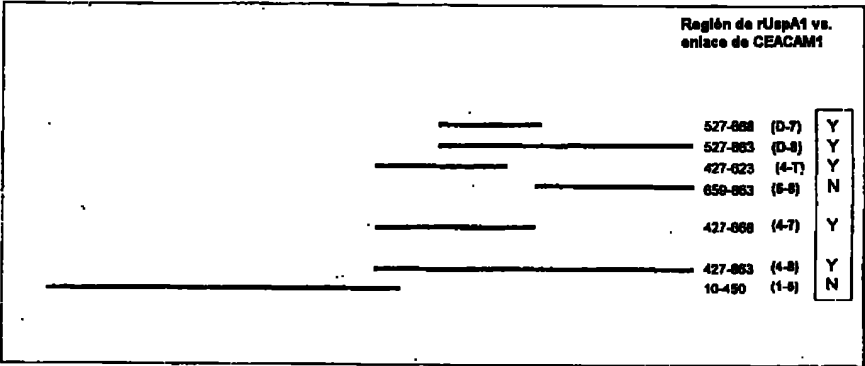


Figura 15

78



Fragments y PMs predichos (kDa)

D-7	c. 15
D-8	36
4-T	21
6-8	22
4-7	26
4-8	47
1-5	40

para péptidos recombinantes, ad c. 2 kDa

Figura 16

445

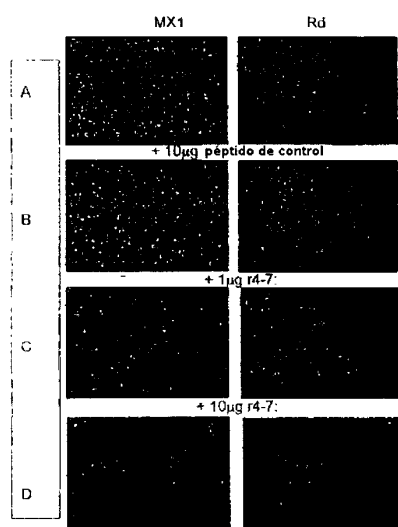


Figura 17

118



**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION [x]

MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [x] 1
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [x] 1
- ◆ Descripción de la invención [x] 70
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes [x] 98
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [x] 2

COMPLETA [x]

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

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

COMPLETA []

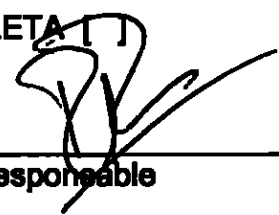
INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

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

COMPLETA []

INCOMPLETA []


Firma Responsable

Fecha _____

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

2020
Bogotá, D.C.,

119

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Doctora:
ALICIA LLOREDA RICAURTE
UNIVERSITY OF BRISTOL
Solicitante

Oficio N° 12948

ASUNTO:	Radicación N°	05-40022
	Solicitud internacional	PCT/GB2003/004273
	Fecha inicio fase nacional	02/05/2005
	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 la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486).
- La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los 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 ésta fuere persona jurídica.

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.


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

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha, 17 JUN 2005

202030

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5 y 10
Commutador: 334 12 21-2-3-4
Fax: 281 31 25 e-mail: info@sic.gov.co
Santa Fe de Bogotá D.C. - Colombia