

JOSE LLORED CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

Señor
SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
E. _____ S. _____ D. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 05-040022- -00007-0000

Fecha: 2009-07-03 16:16:24

Dep. 2020 NUECREACION

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 379 FASENACIONALI

Act. 444 RESPUESTAREQUE

Folios: 52

Re: P1.-UNIVERSITY OF BRISTOL.-Solicitud de Patente de Invención en Fase Nacional PCT para "PÉPTIDOS TERAPÉUTICOS".-Clase C07K 14/705.- Expediente número 05-040.022.-

1. Me refiero al auto dictado por ese Despacho notificado por fijación en lista el 03 de Abril de 2009.
2. Con el fin de responder a las objeciones expuestas por el señor Examinador en su Concepto Técnico No. **822** bajo los acápites de claridad de las reivindicaciones y nivel inventivo, atentamente me permito presentar los siguientes argumentos técnicos y las siguientes modificaciones, mediante lo cual no sólo se superan dichas objeciones, sino que además se demuestra en forma contundente la patentabilidad de la presente solicitud.

3. **MODIFICACIONES A LA SOLICITUD**

En primer lugar, me permito manifestar a este Despacho que es deseo del solicitante modificar voluntariamente el capítulo descriptivo de la solicitud bajo estudio, de acuerdo con las modificaciones hechas durante la Fase Internacional de la misma, en atención a lo prescrito en el Art. 34 del Tratado de Cooperación en material de Patentes (PCT), las cuales fueron oportunamente presentadas por el solicitante al momento de iniciar el trámite en Fase Nacional de la solicitud de la referencia.

En consecuencia, anexo al presente memorial me permito presentar una copia de la nueva descripción de la solicitud, la cual ha sido modificada tal y como me permito mencionar a continuación de manera detallada:

- a) En la página 10 (línea 20) de la descripción presentada en fase nacional se incluyó la expresión (SEC ID No:1). Dicha modificación corresponde a la corrección realizada en fase internacional en la página 9 del documento WO 2004/031236;

JOSE LLORED A CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

- b) En la página 11 (líneas 14 y 15) de la descripción presentada en fase nacional se incluyó la expresión (SEC ID No:4). Dicha modificación corresponde a la corrección realizada en fase internacional en la página 10 del documento WO 2004/031236;
- c) En la página 14 (líneas 18 y 19) de la descripción presentada en fase nacional se incluyeron las expresiones (SEC ID No:1) y (SEC ID No:6), respectivamente. Dichas modificaciones corresponden a las correcciones realizadas en fase internacional en la página 12 del documento WO 2004/031236;
- d) En la página 17 (líneas 21, 22 y 34) de la descripción presentada en fase nacional se incluyeron las expresiones (SEC ID No:4), (SEC ID No:7) y (SEC ID No:4), respectivamente. Dichas modificaciones corresponden a las correcciones realizadas en fase internacional en las páginas 15 y 16 del documento WO 2004/031236;
- e) En la figura 6 de la solicitud presentada en fase nacional se incluyó la expresión (SEC ID No:2). Dicha modificación corresponde a la corrección realizada en fase internacional en la figura 9/20 del documento WO 2004/031236;
- f) En la figura 8 de la solicitud presentada en fase nacional se incluyó la expresión (SEC ID No:3). Dicha modificación corresponde a la corrección realizada en fase internacional en la figura 11/20 del documento WO 2004/031236; y,
- g) En la figura 10 de la solicitud presentada en fase nacional se incluyó la expresión (SEC ID No:5). Dicha modificación corresponde a la corrección realizada en fase internacional en la figura 13/20 del documento WO 2004/031236.

De lo anterior es claro que las modificaciones realizadas en la descripción de la solicitud de patente en cuestión no amplían de manera alguna el alcance de la solicitud presentada originalmente, toda vez que se encuentran dirigidas exclusivamente a definir los números de secuencia de las listas de aminoácidos mencionadas a lo largo de dicho documento, y presentan pleno sustento en las modificaciones realizadas por el solicitante en fase internacional.

JOSE LLORED A CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

4. ANÁLISIS DE LA PRIORIDAD INVOCADA

Ahora bien, el señor Examinador afirma lo siguiente en su Concepto Técnico:

"De acuerdo con la reivisión del documento de prioridad citado por la solicitud, esta prioridad no puede ser aceptada debido a que no hace referencia a la misma materia que es divulgada en la presente solicitud.

La prioridad menciona que la molécula UspA1 tiene un sitio de unión al receptor CEACAM que está localizado entre los segmentos aminoácidos 463-863; mientras que en la presente solicitud se menciona que el ligando con actividad de unión al receptor CEACAM está definido por los segmentos 427 a 623 de acuerdo con la reivindicación 1, ó con los segmentos 463 a 863, 527 a 668, 527 a 863, 427 a 623, 427 a 668, 427 a 863 de acuerdo con la reivindicación 2.

Por tanto, en razón de la materia definida en la descripción y en las reivindicaciones 1 y 2 de la presente solicitud, el documento de prioridad invocado no puede ser aceptado."

En respuesta a lo anterior, inicialmente me permito señalar ante ese Despacho que el solicitante de la invención en cuestión ha decidido modificar el capítulo reivindicatorio de la siguiente manera:

- La reivindicación 1 se encuentra ahora dirigida a proteger un ligando que comprende la SEC ID No. 3 o un fragmento de ésta requerido para el enlace del receptor CEACAM.

En este sentido y de conformidad con las correcciones mencionadas en el numeral 3 del presente escrito, resulta de gran importancia señalar que la SEC ID No:3 corresponde a los aminoácidos 463 a 863 de un péptido tríptico de la proteína UspA1 de MX2, esto es, corresponde a la secuencia divulgada en la figura 8 de la descripción.

Por lo tanto, la nueva reivindicación 1 presenta adecuado sustento, por ejemplo, en las páginas 5 (líneas 25 a 30), 11 (líneas 9 a 14) y 17 (líneas 31 a 34) de la descripción; y

- La reivindicación 2 se encuentra ahora dirigida simplemente a especificar que el ligando de la nueva reivindicación 1 consiste de una secuencia de aminoácidos de la SEC ID No: 3.

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

Así las cosas, y teniendo en cuenta lo anterior, me permito manifestar que la materia técnica comprendida en las nuevas reivindicaciones 1 y 2 de la presente solicitud hace parte de la información técnica divulgada en la solicitud de patente GB 0222764.8 de Octubre 2 de 2002, la cual fue invocada como documento de prioridad en el presente caso.

Lo anterior es claro al tener en cuenta que, por ejemplo, en el Concepto Técnico N° 822 el señor Examinador afirma precisamente que el documento de prioridad invocado menciona que la molécula UspA1 tiene un sitio de unión al receptor CEACAM que está localizado en el segmento comprendido entre los aminoácidos 463 a 863 de dicha proteína.

Como consecuencia de lo anterior, es evidente que las modificaciones realizadas en el capítulo reivindicatorio de la solicitud de patente en cuestión permiten superar completamente las objeciones realizadas por el señor Examinador con respecto a la validez de la prioridad invocada por el solicitante en el presente caso.

5. CLARIDAD DE LA SOLICITUD

De otro lado, el señor Examinador ha objetado la claridad de la presente solicitud con base en los siguientes argumentos:

Reivindicaciones

"Pese a los argumentos del solicitante, se sigue apreciando una falsa dependencia entre la reivindicación 1 y la reivindicación 2, puesto que la primera hace referencia a un ligando que comprende:

- 1. los residuos 427 a 623 de la SEQ ID N°2, o*
- 2. un fragmento de este requerido para el enlace del receptor CEACAM*

mientras que la segunda reivindicación hace referencia a este ligando, definido por otros segmentos de esta secuencia de aminoácidos de manera que no están circunscritos en el segmento que se define en la reivindicación 1, sino que son más amplios que esta. La indicación de un fragmento se entiende como un segmento de la secuencia mencionada, pero no puede definir un segmento mucho mayor a la secuencia de la cual hace referencia."

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

Frente a éste particular me permito manifestar que, -tal como se mencionó previamente en el numeral 4 del presente escrito-, el capítulo reivindicatorio ha sido modificado de tal manera que ahora la reivindicación 1 se encuentra dirigida a proteger un ligando que comprende la SEC ID No. 3 o un fragmento de ésta requerido para el enlace del receptor CEACAM, y la reivindicación 2 se encuentra dirigida únicamente a especificar que el ligando de la reivindicación 1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID No. 3.

De lo anterior es absolutamente claro que la materia técnica definida en la nueva reivindicación 2 se encuentra dentro del alcance de la nueva reivindicación 1, razón por la cual la dependencia existente entre dichas reivindicaciones es completamente válida.

En otras palabras, me permito manifestar que como consecuencia de las modificaciones realizadas en el capítulo reivindicatorio de la solicitud, la nueva reivindicación 2 resulta ser claramente dependiente de la nueva reivindicación 1, con lo cual se supera completamente la objeción realizada por el señor Examinador a éste respecto.

6. EVALUACIÓN DEL NIVEL INVENTIVO

Ahora bien, el señor Examinador ha objetado nuevamente el nivel inventivo de la solicitud de patente en cuestión basándose en las enseñanzas de los siguientes documentos:

- WO 9828333 → (D1) y,
- Hill D. et al., Molecular microbiology, vol 48, N°1: 117-129 → (D2)

En este sentido, el señor Examinador argumenta básicamente que en el documento D1 se divulga la secuencia completa de la proteína UspA1, así como su empleo en vacunas para prevenir la infección por M. catarrhalis.

De acuerdo con el señor Examinador, la diferencia entre D1 y la solicitud en estudio es que ésta última identifica el segmento específico que se une al receptor CEACAM, mientras que en D1 se menciona la posible interacción de UspA1 con fibronectina en lugar del receptor CEACAM. Sin embargo, según el señor Examinador D2 ya divulgaba la actividad de UspA1 de M. Catarrhalis sobre el receptor CEACAM.

JOSE LLORED A CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

Finalmente, en el Concepto Técnico N° 822 se afirma que el aporte técnico de la presente solicitud consiste en haber identificado el segmento de UspA1 que tiene interacción con CEACAM, hecho que carece de nivel inventivo de acuerdo con el señor Examinador porque para el experto en la materia es habitual la determinación del sitio activo de una proteína mediante diversos tipos de experimentos.

En respuesta a lo anterior, inicialmente resulta de gran importancia aclarar que como consecuencia de las modificaciones realizadas en el capítulo reivindicatorio de la solicitud de patente en cuestión (ver el numeral 4 del presente escrito), la prioridad reclamada por el solicitante en el presente caso tiene completa validez, **razón por la cual las enseñanzas del documento D2 citado por el señor Examinador, esto es, del documento Hill D. et al., Molecular microbiology, vol 48, N°1: 117-129, NO hacen parte del estado de la técnica anterior que puede tener en cuenta ese Despacho al momento de evaluar los méritos de patentabilidad de la presente invención toda vez que dicho documento fue publicado en Abril de 2003, es decir, fue publicado después de la fecha de presentación del documento de prioridad válidamente invocado por el solicitante (documento GB 0222764.3 de Octubre 2 de 2002).**

Por lo tanto, es claro que todas las objeciones de patentabilidad realizadas por el señor Examinador con base en las enseñanzas del documento D2 han sido completamente superadas.

Ahora bien, con respecto a las objeciones de nivel inventivo realizadas por el señor Examinador con base en las enseñanzas del documento D1, a continuación me permito presentar las siguientes consideraciones técnicas:

- El documento D1 revela básicamente la existencia de dos proteínas denominadas UspA1 y UspA2, así como sus respectivos genes codificantes uspA1 y uspA2. Adicionalmente, dicho documento proporciona métodos de uso de esas nuevas proteínas, por ejemplo, en la preparación de agentes para el tratamiento y la inhibición de infecciones ocasionadas por Moraxella catarrhalis.
- Por su parte, la presente invención es el resultado de la identificación por parte del solicitante de un ligando de alto peso molecular aislado de la proteína de membrana exterior de Moraxella catarrhalis que se enlaza a los receptores de CEACAM, donde dicho ligando comprende la SEC ID No. 3 ó un fragmento de ésta requerido para el enlace del receptor CEACAM.

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

- De lo anterior resulta claro que si bien la proteína UspA1 era conocida (su secuencia es revelada en D1), las propiedades para enlazar el receptor de CEACAM de dicha proteína no eran reveladas por el arte previo. De manera específica me permito señalar que en el documento D1 no se enseña y tampoco se sugiere que la proteína UspA1 se enlaza a CEACAM, toda vez que incluso, tal y como se afirma en el Reporte de Examen Preliminar Internacional de la solicitud, en las páginas 93 y 94 de D1 se sugiere que la UspA1 enlaza a fibronectina.
- En consecuencia, la materia revelada en la presente solicitud de patente presenta un inequívoco carácter inventivo frente a las enseñanzas del arte previo, toda vez que ningún documento anterior es capaz de proporcionar a una persona medianamente versada en la materia alguna sugerencia que lo lleve a localizar un dominio de enlace de receptor de CEACAM en la proteína UspA1, pues no existía ninguna sugerencia que indicara su existencia.

Unión
UspA1-CEA-
CAM no con-
cluye

A este respecto resulta de gran importancia destacar que las moléculas de adhesión celular relacionadas con antígeno carcinoembrionario (CEACAMs) han sido asociadas durante mucho tiempo con las proteínas Opa de membrana externa, las cuales se encuentran, por ejemplo, en patógenos *Neisseriae*. Sin embargo, los autores de la presente invención han identificado la presencia de ligandos de enlace de CEACAM en *Moraxella catarrhalis* y *Haemophilus influenzae*, hecho que resulta completamente sorpresivo en vista de que ninguno de estos patógenos produce proteínas Opa.

Invención
encuentra
ligando d'
recep. CEA
CAM no
rela Opa

- Finalmente resulta de gran importancia resaltar que aunque la capacidad de enlace al receptor de CEACAM por parte de algunos fragmentos de la proteína UspA1 sea algo intrínseco de dicha molécula, ésta característica no era conocida, lo cual concede un evidente carácter inventivo a la materia revelada en la presente solicitud de patente, así como a todas sus posibilidades de aplicación industrial.

De lo anterior es claro entonces que la materia técnica revelada en la solicitud de patente en cuestión presenta un inequívoco carácter inventivo frente a las enseñanzas del documento D1, cumpliendo a cabalidad con las disposiciones de patentabilidad establecidas en el artículo 18 de la Decisión 486 de 2000. Por lo tanto, atentamente me

JOSE LLORED A CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

permite solicitar al señor Examinador la reconsideración de sus objeciones en contra de la patentabilidad de la presente invención.

7. REPORTE DE EXÁMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL

Finalmente y aparte de lo planteado hasta el momento, considero de gran importancia resaltar una vez más ante ese Despacho que el documento WO 98/28333 (D1) fue citado en el Reporte del Examen Preliminar Internacional realizado a la invención en cuestión; sin embargo, dicho examen de patentabilidad concluyó que el documento D1 no afecta las características de novedad y nivel inventivo de la materia revelada en la presente solicitud de patente.

8. CONCLUSIÓN

De conformidad con las modificaciones realizadas en la descripción y en el capítulo reivindicatorio de la solicitud de patente en cuestión, así como teniendo en cuenta los argumentos técnicos presentados para demostrar el inequívoco carácter inventivo de dicho nuevo capítulo reivindicatorio con respecto a las enseñanzas del documento D1, es completamente claro que se han superado la totalidad de las objeciones expuestas por el señor Examinador en su Concepto Técnico N° 822, y por lo tanto, dicha invención es merecedora del privilegio de patente solicitado.

9. Anexo al presente memorial me permito presentar:

- (i) Recibo número 09-44,102, expedido por la Superintendencia de Industria y Comercio, que acredita el pago de las modificaciones mencionadas;
- (ii) Copia de la nueva descripción de la solicitud, en la cual se han realizado las modificaciones mencionadas en el numeral 3 del presente escrito;
- (iii) Copia del nuevo capítulo reivindicatorio (compuesto por 4 reivindicaciones), el cual reemplaza al presentado actualmente y en el que se han realizado las modificaciones previamente mencionadas; y
- (iv) Copia de las figuras, en las que se han modificado los aspectos antes señalados.

JOSE LLORED CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

10. En vista de lo anterior, ruego a usted proceder a estudiar nuevamente la solicitud a la luz de las argumentaciones y las modificaciones presentadas y conceder el privilegio de patente solicitado

Señor Superintendente,



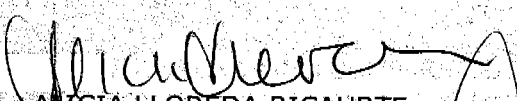
ALICIA LLORED RICAURTE

T.P. 53.215

El Notario 41 del círculo de Bogotá, da fe de que compareció personalmente Alicia Lloreda Ricaurte, identificada (o) con 39690713 y tarjeta profesional de abogado No. 33215 del Consejo Superior de la Judicatura, quien autentica la firma puesta por ella (el) mismo en este escrito.

(Art. 84 C. P. C. Decreto 2782/98 mod. 20)

25 JUN. 2009


ALICIA LLORED RICAURTE
C.C. No. 39.690.713 de Usaquén

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 900176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 44,102
FECHA : JUNIO 16 DE 2009

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
-------------	-----------	-------	--------	----------	-----------	----------

LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	79463521	16/06/2009	14,358,400.00
--------------------	--------------	-----------------	-----------	----------	------------	---------------

***** C O N C E P T O *****

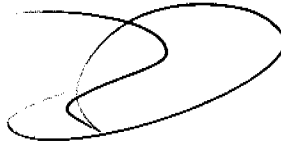
CANT. RENESISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
-------------------	----------	----------------

1	50005-01-03 CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	12 MARCAS Y LEMAS COMERCIALES	111,000.00
---	--	-------------------------------	------------

111,000.00

\$

SON: CIENTO ONCE MIL PESOS



RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

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 CarcinoEmbriónico (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) trasnfectadas 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 ^{7,9,10}. 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 lincofitos 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 Nm⁷⁻⁹ y la Hi^{10,11} comparten algunos mecanismos de marcado distintos y otros comunes de ciertas CEACAMs de receptores de superficie de célula humana¹².

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 tejidos¹² 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 ebullicos 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

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.

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, opsonicos 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, le enfermedad es seleccionada del grupo consistente de infección, enfermedad respiratoria, enfermedad neoplástica y condiciones asociadas de enfermedad neoplástica, 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*.

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

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 trípticos 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 trípticos 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 (SEC ID No:1)) (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 trípticos 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" (SEC ID No:4) que se encuentra después del sitio de clivado de tripsina en el aminoácido 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 μ g/ml, se obtuvo una inhibición significativa de una cepa heteróloga de *M. catarrhalis*, y a 10 μ g por ml, el enlace de *H. influenzae* se inhibió significativamente mediante el péptido recombinante UspA1 de *M. catarrhalis*.

Ejemplo 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 tetrazolio de nitroazul y 5-bromo-4-cloro-3-indoifosfato 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 (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 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 5×10^8 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 electroeluído 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 horas 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 electroeluída durante la noche. La proteína electroeluída 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 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 traslapo 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 epítopes 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 amplimeros de PCR fueron primero ligados en pCR2.1. Esto proporcionó un huésped estable del cual el amplimero 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 CaCl_2 .

Los transformantes fueron seleccionados sobre agar LB complementado con ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$) y kanamicina (25 $\mu\text{g/ml}$). 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 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina y 25 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina), con agitación a $\text{OD}_{600} = 0.5$ 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-PAGE 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, donde dicho ligando comprende la SEC ID No. 3 o un fragmento de éste requerido para el enlace del receptor CEACAM.
2. El ligando según la reivindicación 1, en donde el ligando consiste de una secuencia de aminoácidos de la SEC ID No: 3.
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. Una vacuna que comprende al ligando según la reivindicación 1 y uno o mas adyuvantes, vehículos, excipientes, aglutinantes, portadores o preservativos farmacéuticamente aceptables.

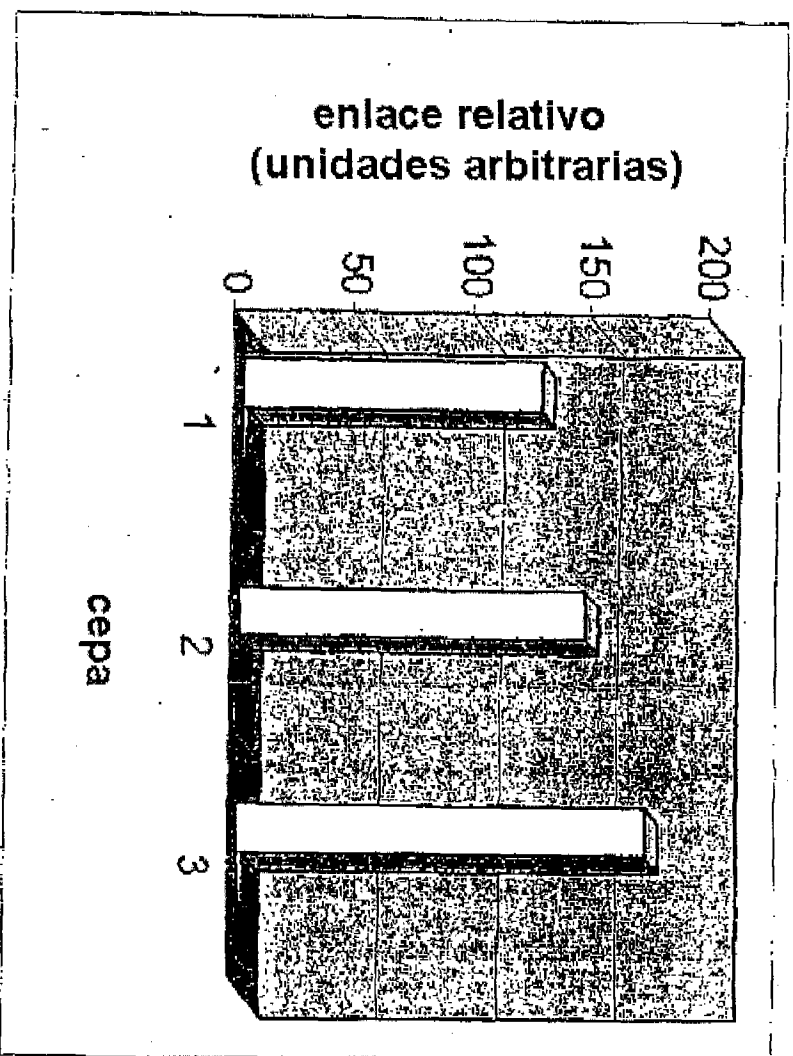


Figura 1

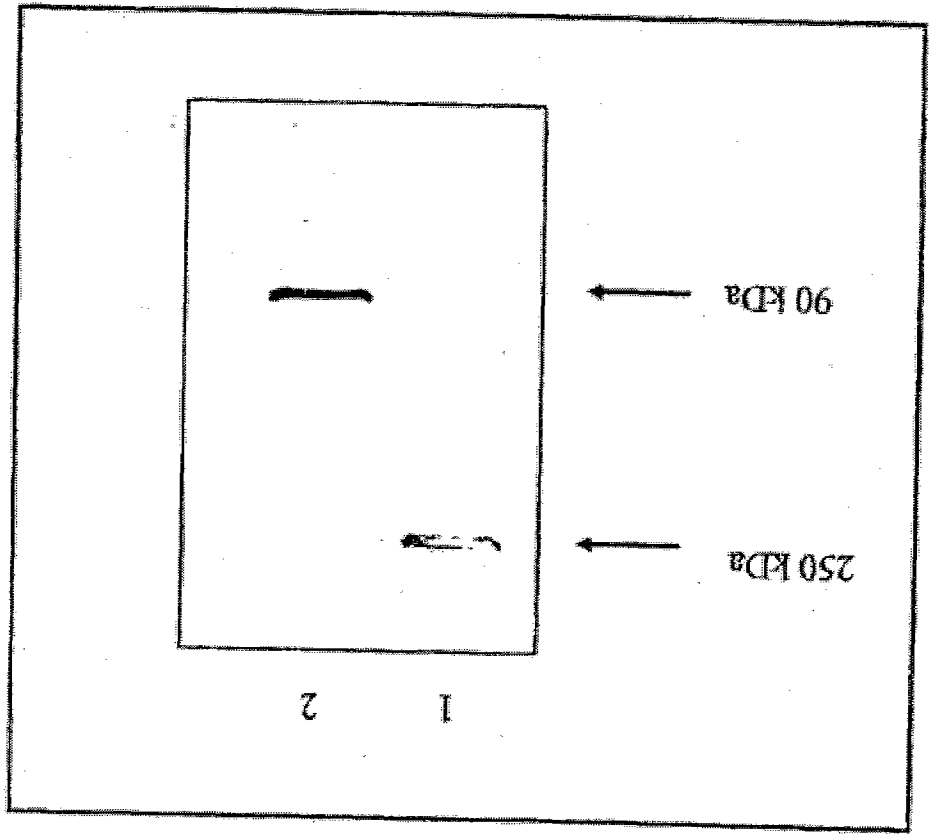


FIGURA.2

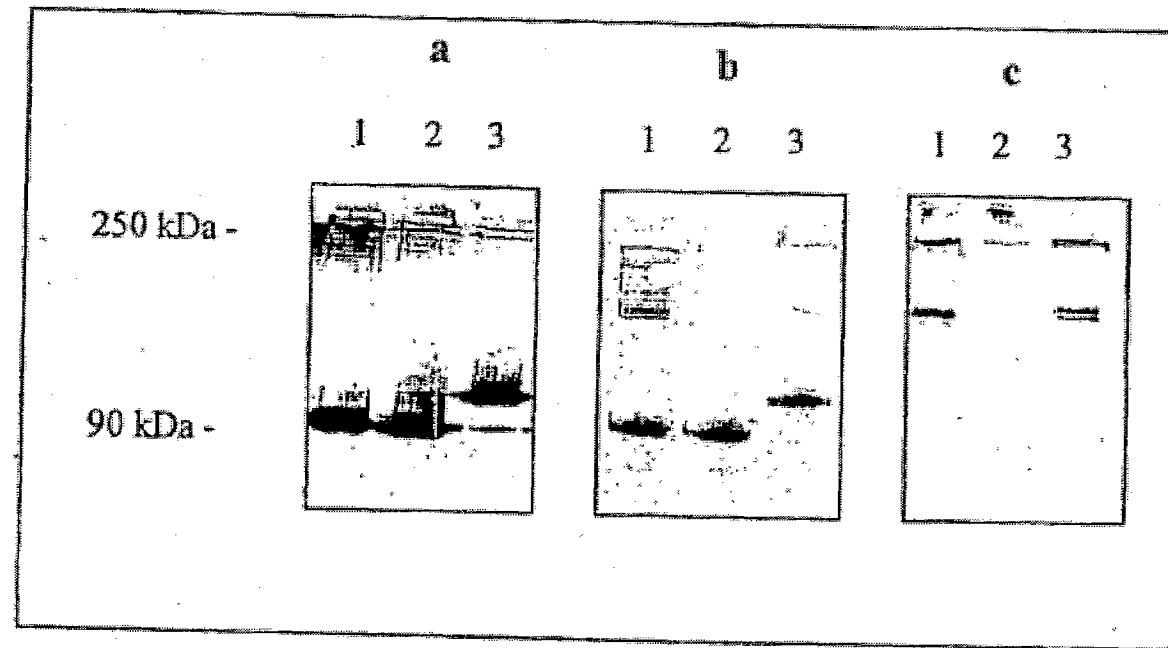


FIGURA.3

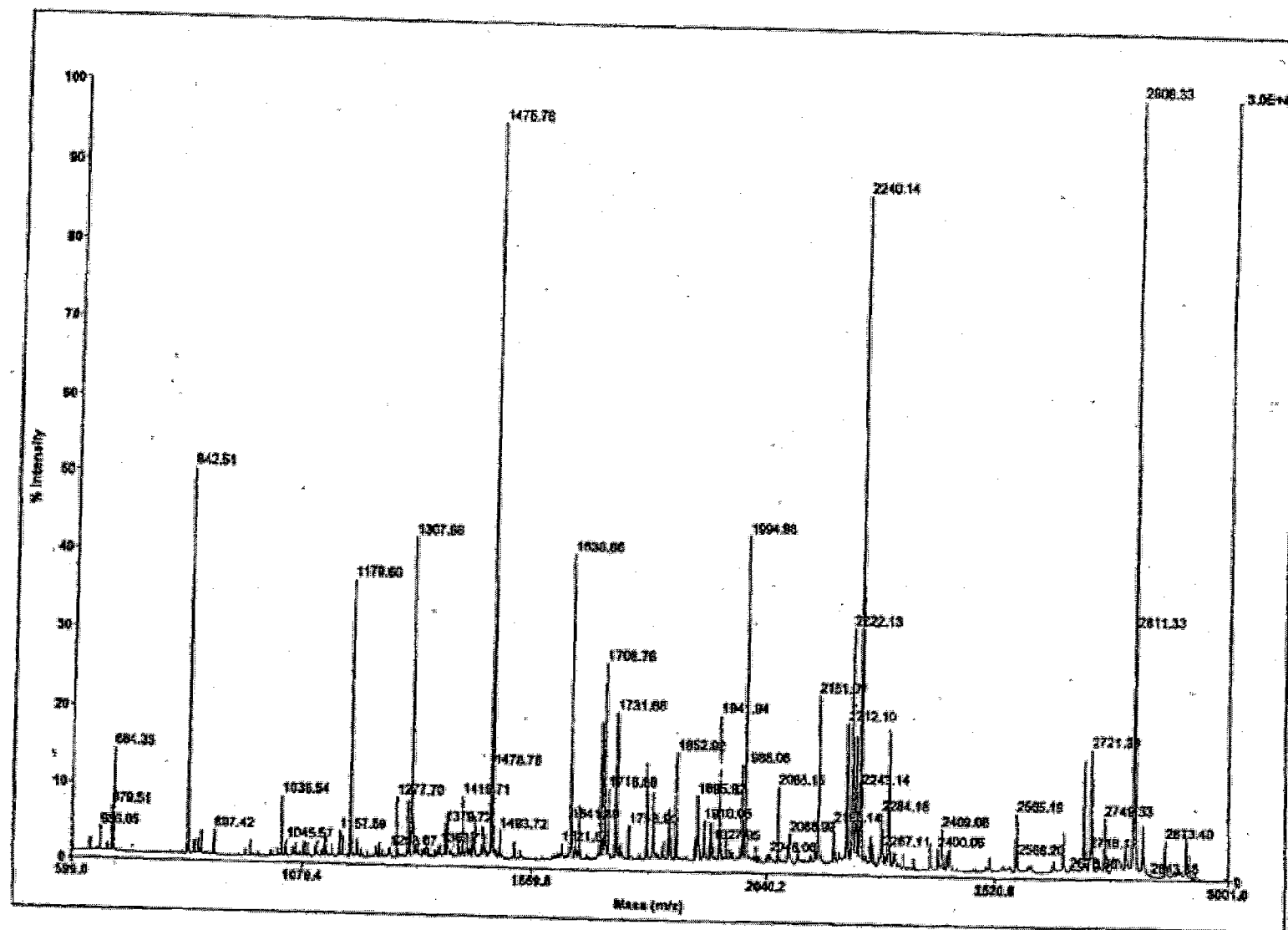


FIGURA 4a

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 (Da, Monoisotopic)	679.514	684.348	842.510	897.421	1036.535	1126.566	1157.592	1179.598	1277.702
	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 028ABE55D1DC-745F3E9 [731183 sequences searched]							
Rank	Probability	Est'd Z	Protein Information and Sequence Analyse Tools (T)	%	pI	kDa	@
1	1.0e+000	2.34	T_gi5453174 gb AA043465.1 AF113606.1 (AF113606) UspA1 [Moraxella catarrhalis]	18	5.7	90.52	@
			T_gi7208237 gb AA040122.1 AF181076.1 (AF181076) USPA1 [Moraxella catarrhalis]	14	5.4	91.86	@
			T_gi5453178 gb AA043467.1 AF113608.1 (AF113608) UspA1 [Moraxella catarrhalis]	15	5.7	99.06	@
			T_gi5453182 gb AA043469.1 AF113610.1 (AF113610) UspA1 [Moraxella catarrhalis]	13	5.3	95.75	@
			T_gi7208229 gb AA040118.1 AF181072.1 (AF181072) USPA1 [Moraxella catarrhalis]	11	5.6	96.95	@
			T_gi8572547 gb AA026359.2 (U57551) high molecular weight outer membrane protein [Moraxella catarrhalis]	8	4.9	88.27	@
2	1.6e-011		T_gi2128720 pirf 64449: hypothetical protein MJ1198 [Methanococcus jannaschii]	8	5.6	85.92	@
3	1.3e-012		T_gi7408403 gb AA036416.1 U61725.1 (U61725) USPA1 [Moraxella catarrhalis]	13	5.7	93.34	@
4	9.5e-013		T_gi13366277 emb CAC51587.2 (A1031687) d998116.1 (ortholog of rat PB-Cadherin) [Homo sapiens]	12	4.6	89.07	@
5	7.9e-013		T_gi11270805 pirf 181749: DNA topoisomerase I TC0012 [unported] - Chlamydia muridarum (strain Nigg)	10	9.2	97.92	@
6	5.4e-013		T_gi9629643 ref NP_044927.1 capsid [adeno-associated virus 4]	11	6.1	80.62	@
7	4.9e-013		T_gi7497063 pirf 15778: hypothetical protein C35B8.2 [Caenorhabditis elegans]	9	6.0	97.36	@
8	4.3e-013		T_gi14009690 gb AA051717.1 (AF148175) PA protein [Influenza A virus (A/Tsing Kong/1/68) (H2N1)]	9	5.3	82.91	@
9	3.0e-013		T_gi14973264 gb AA075842.1 (AF007469) glycosyl transferase, family 8 [Streptococcus pneumoniae]	9	5.2	94.60	@
10	1.2e-013		T_gi13423336 gb AA023864.1 (AF005862) ribonucleotide reductase-related protein [Caulobacter crescentus]	10	5.1	98.47	@

FIGURA 4c

Version 4.105
The Rockefeller University Edition

Details for rank 1 candidate in search C2B4BEE0-01DC-7445F3EE0

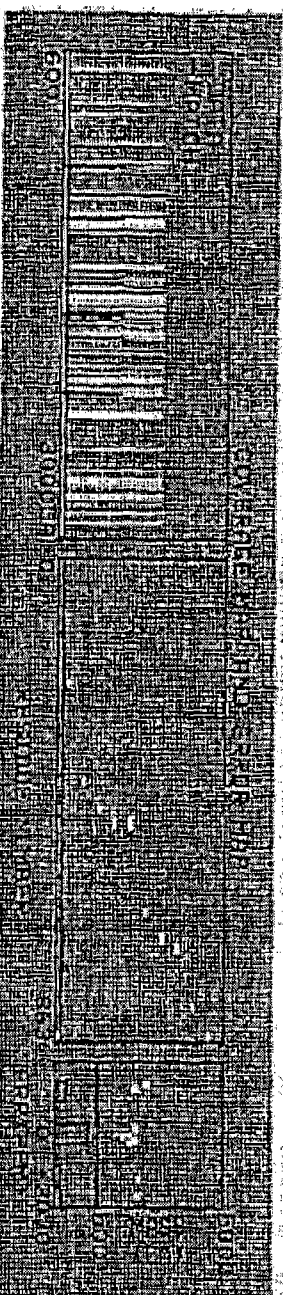
E15453174|E01AADM3465.1|AF113606.1 (AF113606) UspA1 [Moraxella catarhalis]

Sample ID: 13020EE20-7-01 (Pass:0)

Measured peptides

Matched peptides: 10

Min. sequence coverage: 100



Measured Mass (M)	Avg/ Mono	Computed Mass	Electro (ppm)	Residue start	Charge %c	Missed cut	Peptide sequence
1156.564	M	1156.583	0	215	226	0	ANADNVVALGNK
1414.706	M	1414.704	1	437	449	0	ANVEEGGLDISR
1700.661	M	1700.657	2	463	478	0	ALSSNVEEGGLDISR
1730.868	M	1730.868	0	388	403	0	TLESNVEEGGLDISR
1894.914	M	1894.916	-1	842	861	0	LELSNVDAGGLSGVGSYR
1908.046	M	1908.042	2	787	806	0	QVINGGIANNALVNTIPESR
1926.939	M	1926.964	-13	664	680	0	NQNTLIEEGGLVEGNK
1954.970	M	1954.938	17	661	696	0	ALNQLCEGNALVDVDR
2015.980	M	2015.954	13	618	634	0	NIYELDAQDQHSIDR
2298.174	M	2298.206	-14	463	483	1	ALSSNVEEGGLDISGLDOR

Unmatched Monoisotopic Masses:

6370 514.684 348.832 510.697 421.1036 535.1126 566 1179.598 1277.702 1300.538 1302.633 1306.630 1307.681
1311.689 1379.718 1383.708 1424.752 1434.769 1438.773 1440.774 1458.736 1474.731 1475.757 1637.850
1638.839 1648.850 1657.807 1700.854 1707.781 1715.823 1736.858 1757.875 1794.809 1807.903 1826.798
1837.968 1851.920 1890.972 1922.930 1940.931 1987.056 1993.976 2064.139 2081.967 2087.974 2150.075
2184.140 2211.104 2222.1129 2225.1279 2230.218 2239.136 2262.112 2283.164 2297.187 2383.981 2399.049
2408.087 2464.193 2663.346 2705.179 2727.129 2720.281 2748.314 2781.924 2791.004 2792.915 2803.359
2807.337 2825.331 2872.402 2918.356 2921.383

Research again using unmatched masses

Search for

single proteins only



All 1830

FIGURA 4d

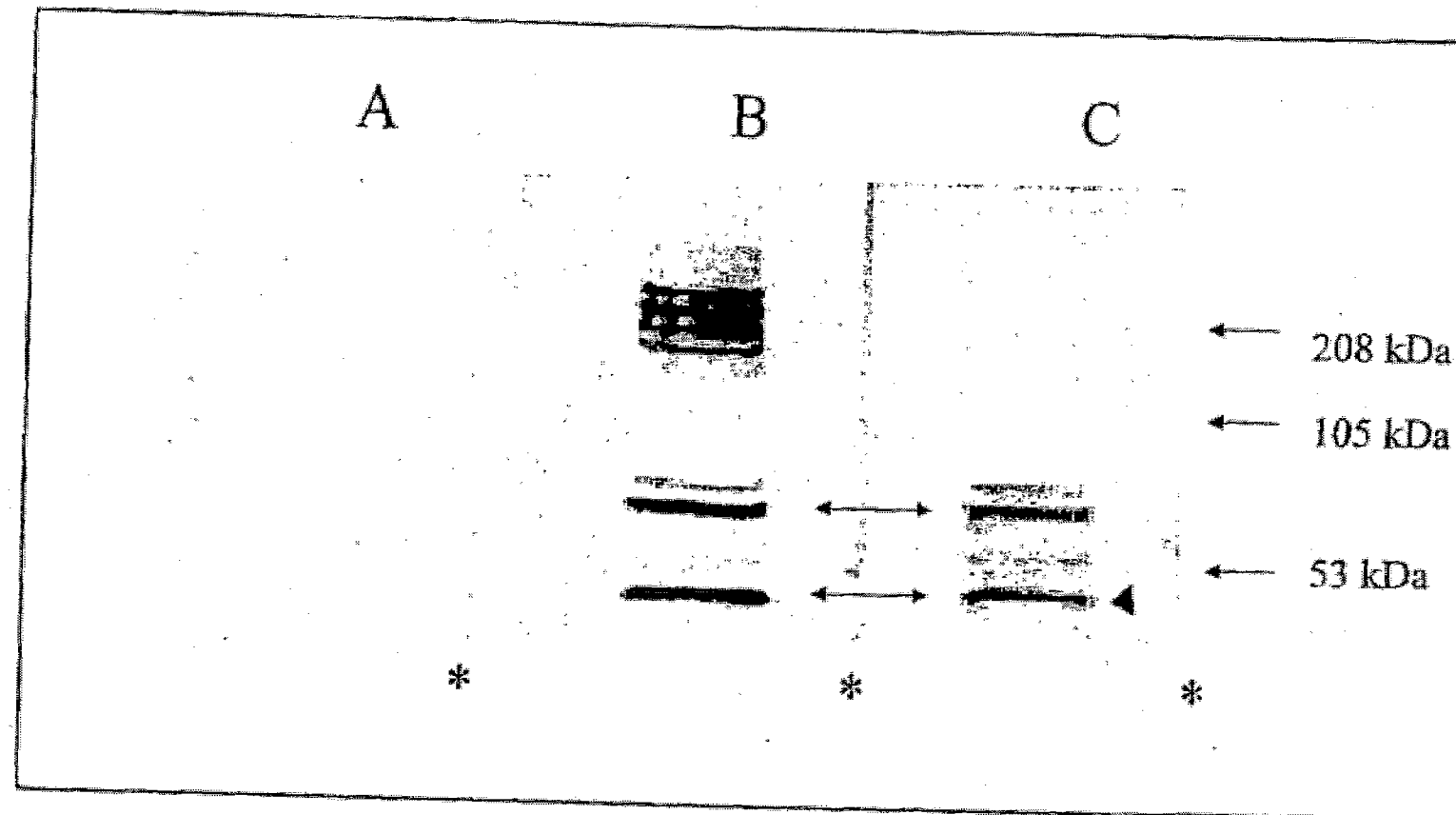


FIGURA.5

SEC ID No: 2

¹MNKIYKVKKNAAGHLVACSEFAKGHTKKAVLGSLIVGILGMATTASAKVGKATNKISGGDNNTANGTYLTIGGGDY ⁷⁶
⁷⁹NKTKGRYSTIGGGGFNEATNEYSTIGSGGYNKAKGRYSTIGGGGYNEATNQYSTIGGGDNNTAKGRYSTIGGGGYNEATI¹⁵⁸
¹⁵⁹ENSTVGGGGYNOAKGRNSTVAGGYNNEATGTDSTIAGGRKNQATGKGSFAAGIDNKANADNAVALGNKNTIEGENSV²³⁶
²³⁷IGSNNTVKKGQQNVFILGSNTDTTNAQNGSVLLGHNTAGKAATIVNSAEVGGLSLTGFAGASKTGNGTVSVGKKGKERQI³¹⁶
³¹⁷VHVGAGEISDTSTDAVNGSQLHALATVVAQNKADIKDLDEVGILLGEEINSLEGEIFNNQDAIAKNQADIKTLESNVEEG³⁹⁶
³⁹⁷LLDLSGRLLDQKADIDNNINNIYELAQQQDQHSSDIKTLKNNVEEGLLDLSGRLLDOKADLT KDIAKLESNVEEGLLDLSGRI⁴⁸⁰
⁴⁸¹DQKADIAKNQADIAQNQTDIQDLAAYNELQDAYAKQOTEADALNKASSANTDRIATAELGIAENKKDAQIAKAQANEN⁵⁵⁹
⁵⁶⁰KDGIKNQADIQLHDKKITNLGILHSMVARAVGNNTQGVATNKADIAKNQADIANNIKNIYELAQQQDQHSSDIKTLAK⁶³⁸
⁶³⁹VSAANTDRIAKNKAEDASFETLTKNQNTLIEQGEALVEQNKAINQEELEGFAAHADVQDKQILQNOADITTNKTAIEQNIN⁷¹⁹
⁷²⁰RTVANGFEIEKNKAGIATNKQELILQNDRLNRINETNNHQDQKIDQLGYALKEQQQHFNRRISAVERTAGGIANAIATL⁸⁰¹
⁸⁰²PSPSRAGEHHVLFSGYHNGQAAVSLGAAGLSDTGKSTYKIGLSWSDAGGLSGGVGGSYRWK⁸⁶³

FIGURA.6

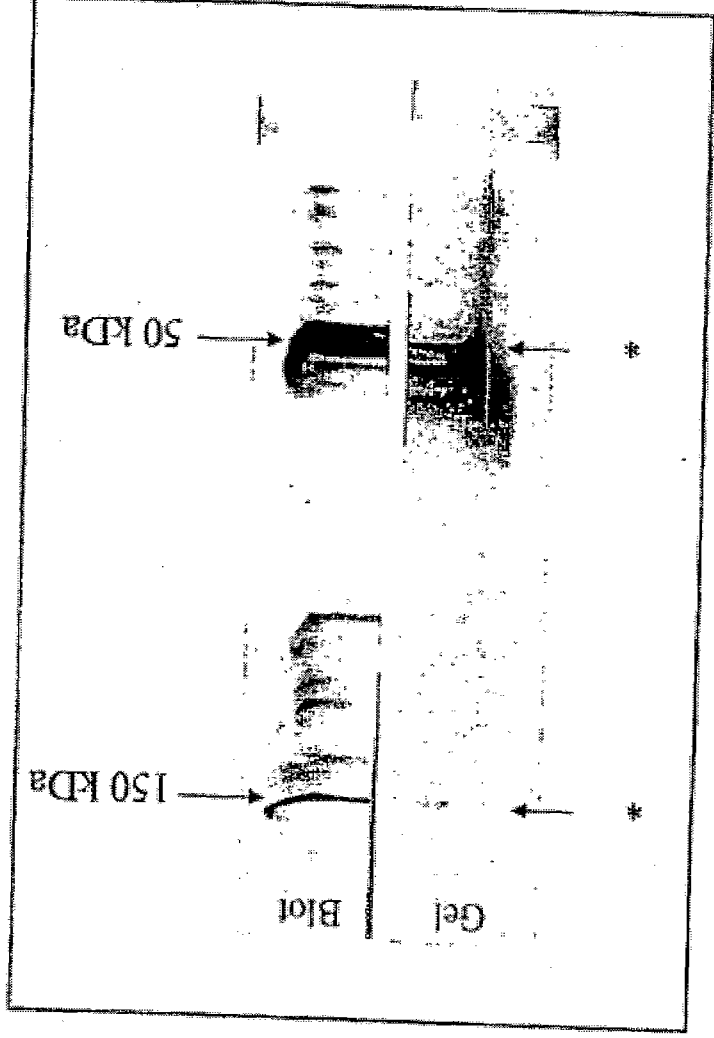


FIGURA.7

SEC ID No: 3

463 ALESNVEEGLLDLSGRLI469

491 DOKADIKNQADIAQNQTDIQDLAAYNELQDAYAKQQT EADALNKASSANTDRIATAELGIAENKKDAGIAKAQANEN559

580 KDGIKNQADIQLHDKKITNLGILHSMVARAVGNNTQGVATNKADIKNQADIANNIKNIYELAQQQDQHSSDIKTLAK638

639 VSAANTDRIKNKAEADASFETLTKNQNTLIEQGEALVEQNKAINGELEGFAAHADVQOKQILQNGADITTNKTAIEQNIN719

720 RTVANGFEIEKNKAGIATNKQELILQNDRLNRINETNNHQDQKIDQLGYALKEGGQHFNRRISAVERO TAGGIANAIAIATL801

802 PPSRAGEHHVLFSGSYHNGQAAVSLGAAGLSDTGKSTYKIGLSWSDAGGLSGGVGGSYRWK863

Figura 8

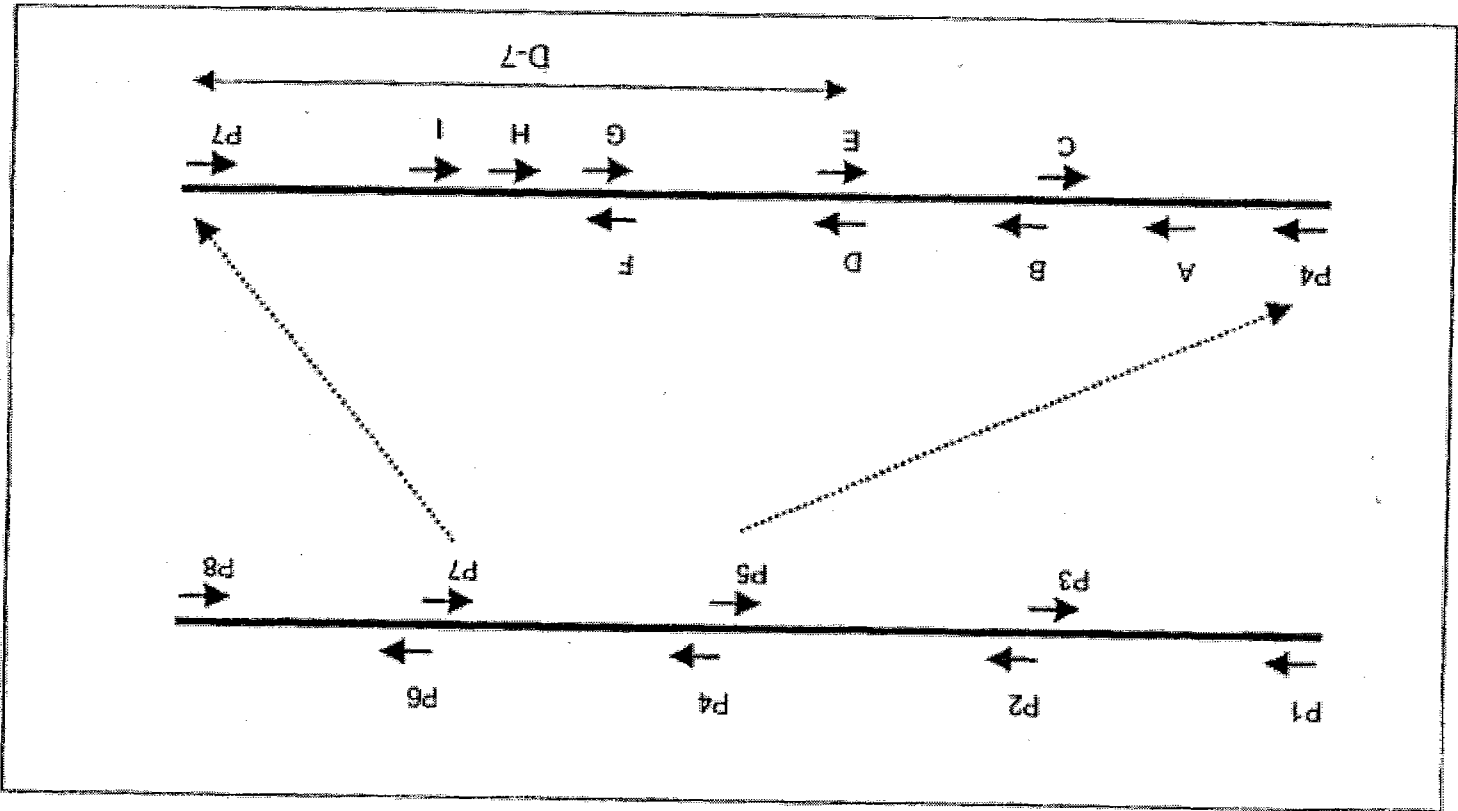


FIGURA.9

SEC ID No: 5

⁴²⁷qhssdiklknveeglldlsgrlidqkadltkdikalesnveeglldlsgrli⁴⁸⁰
⁴⁸¹dqkadiaknqadiaqnqtdiqdlaaynelqdayakqqteaialnkassantdriataelgiaenkkdaqiakaqanen⁵⁵⁹
⁵⁶⁰kdgiaknqadiqlhdkkitnlgilhsmvaravgntqgvatnkadiaknqadiannikniyelaqqqdqhssdiklak⁶³⁸
⁶³⁹vsaantdriaknkaeadasfetltknqntl⁶⁶⁸

↑
T

FIGURA.10

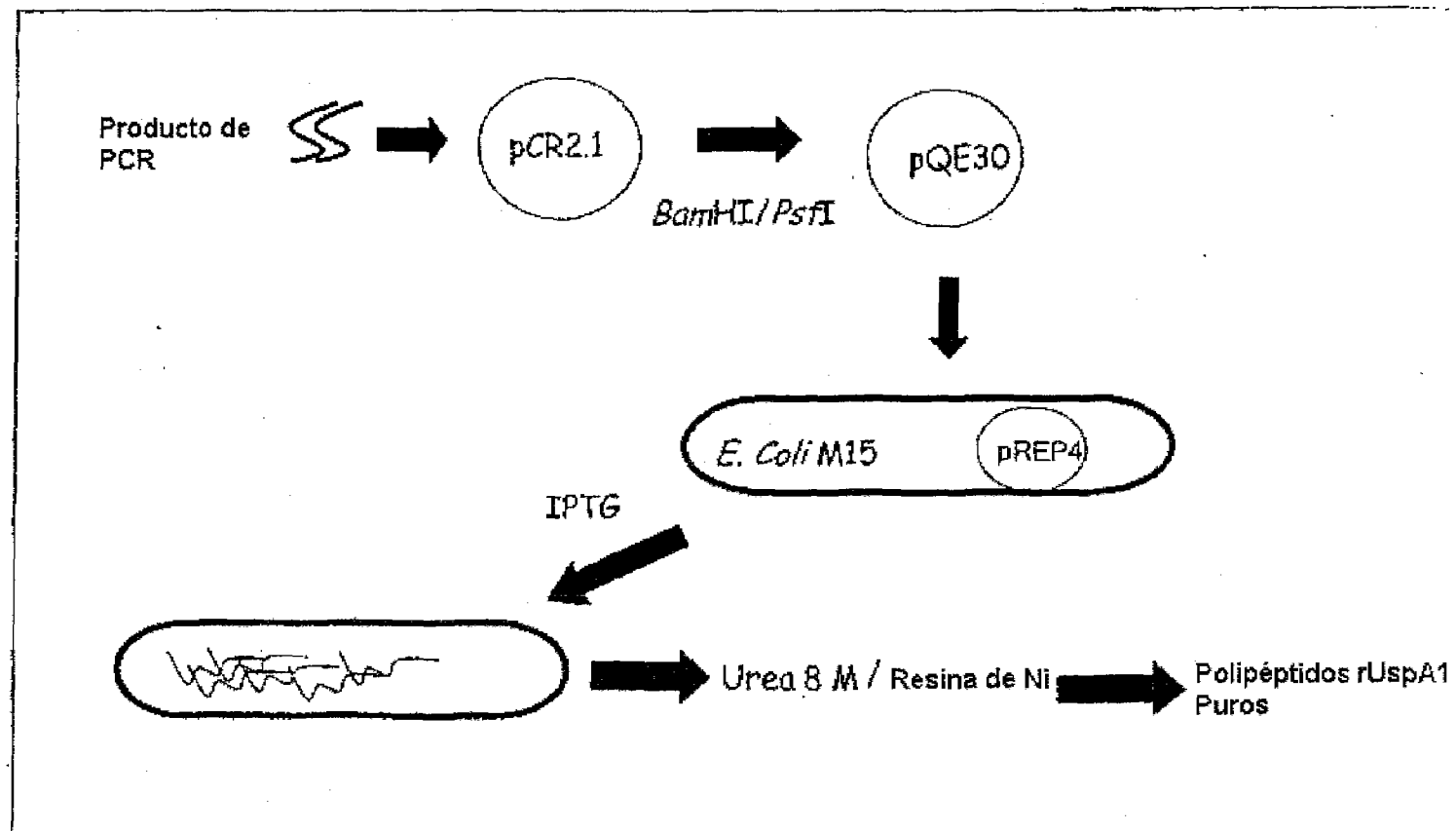


Figura 11



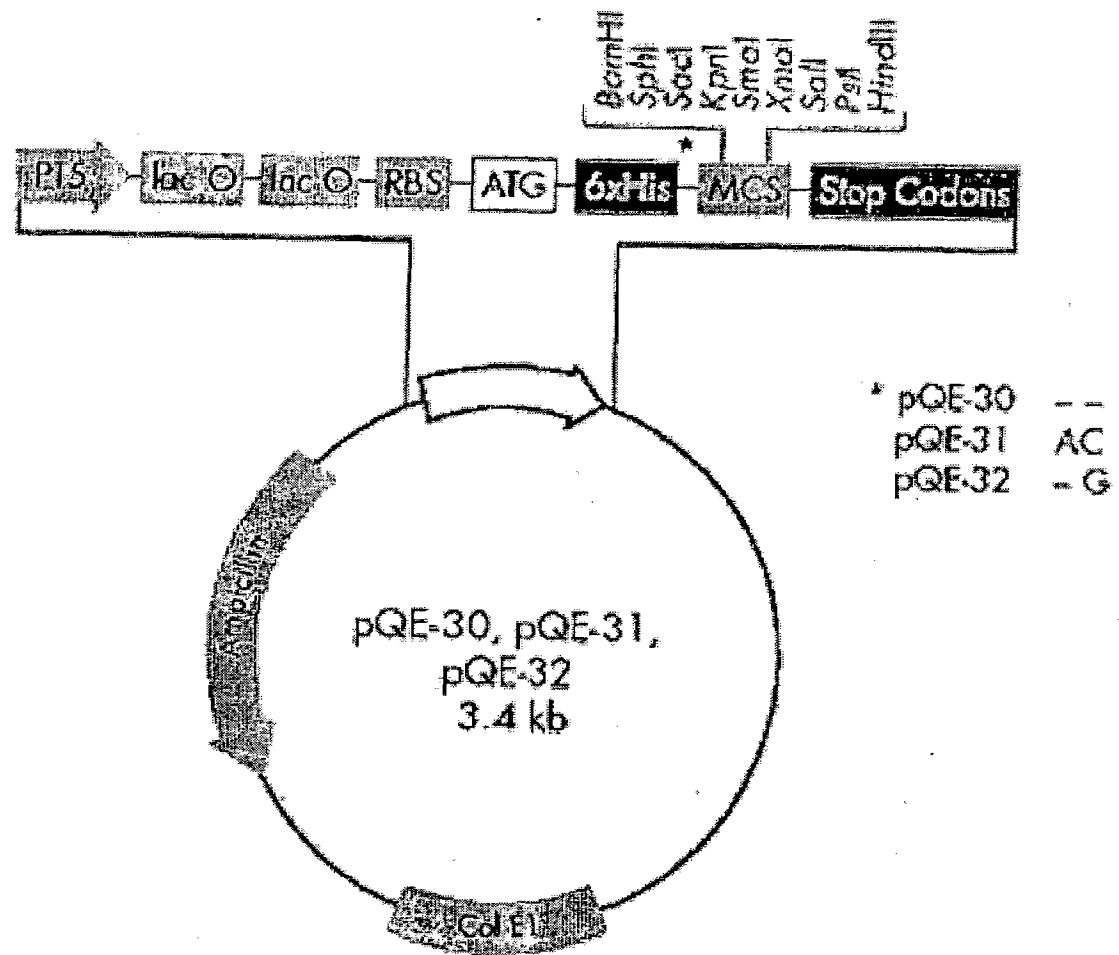


FIGURA 12

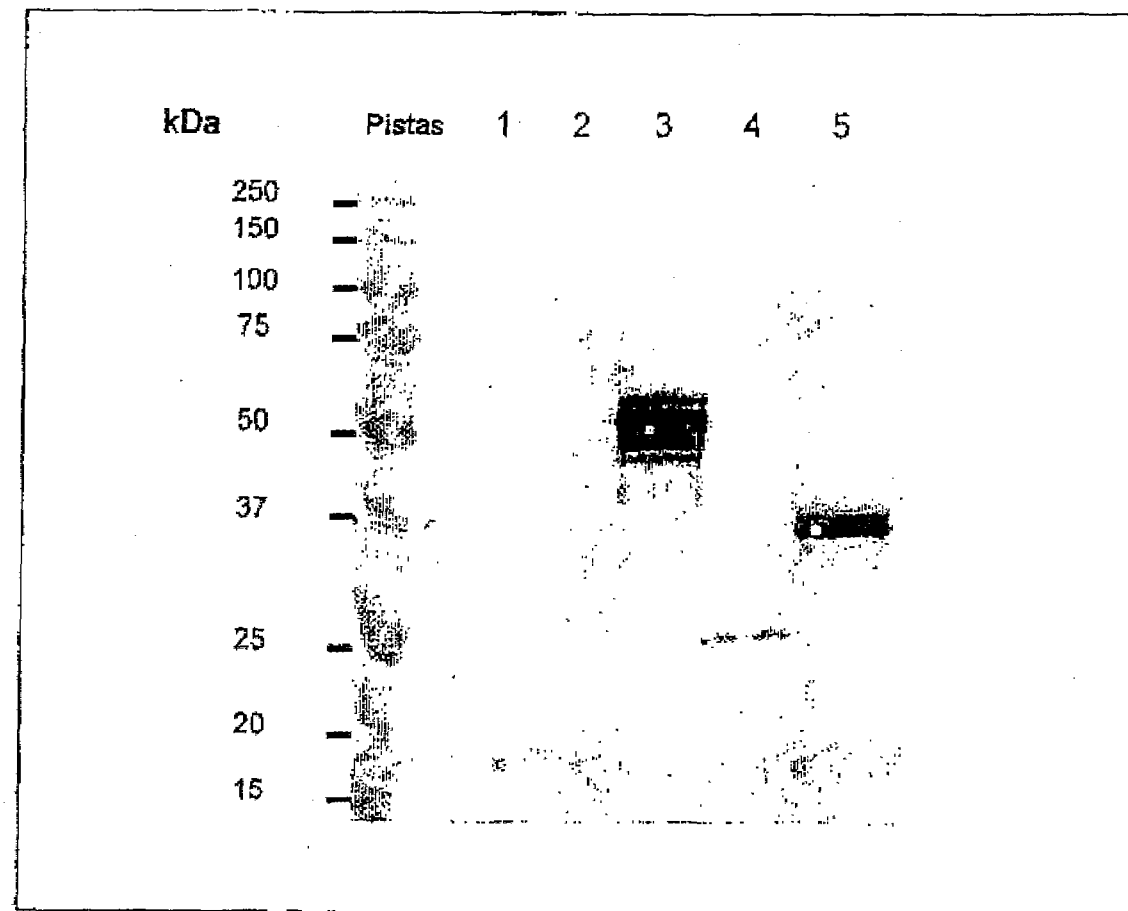


Figura 13



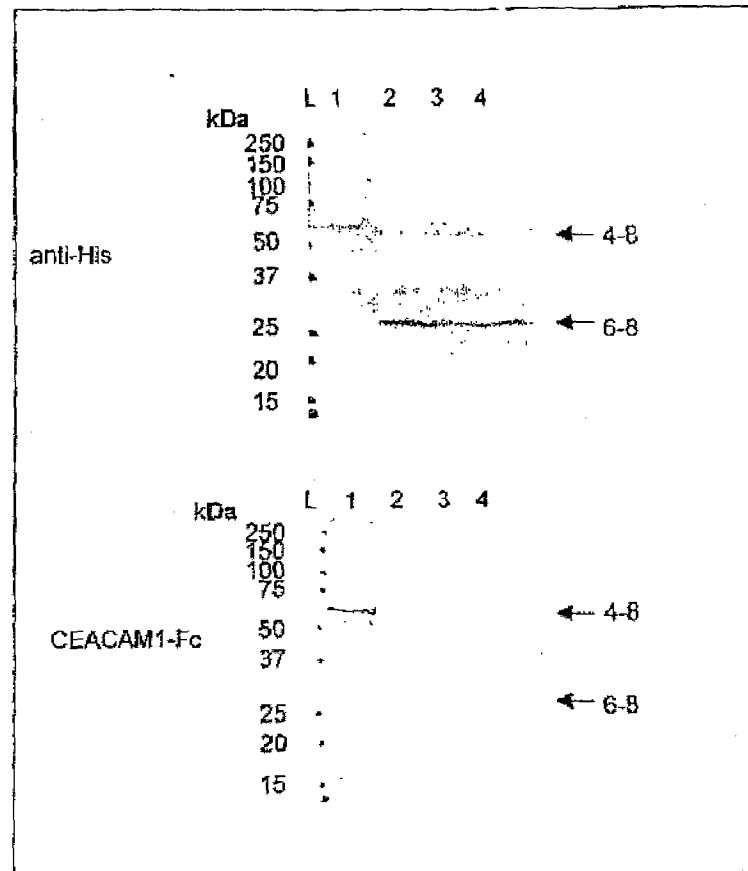
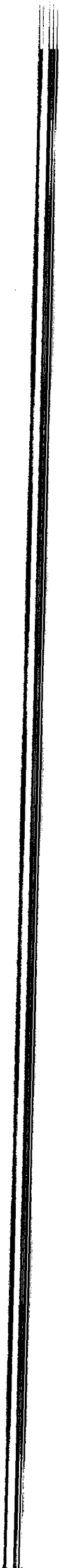


Figura 14



marcadores L1 L2 L3

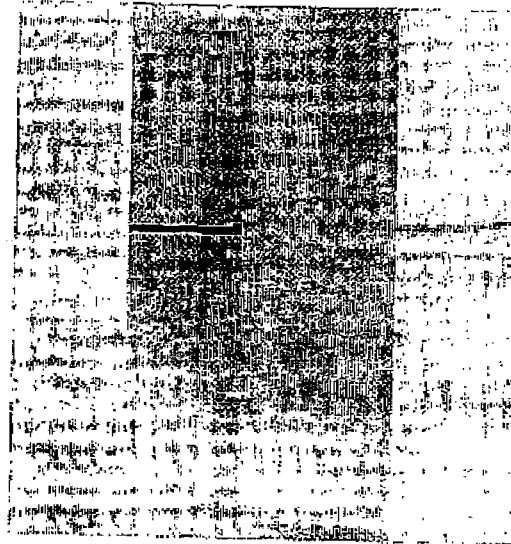
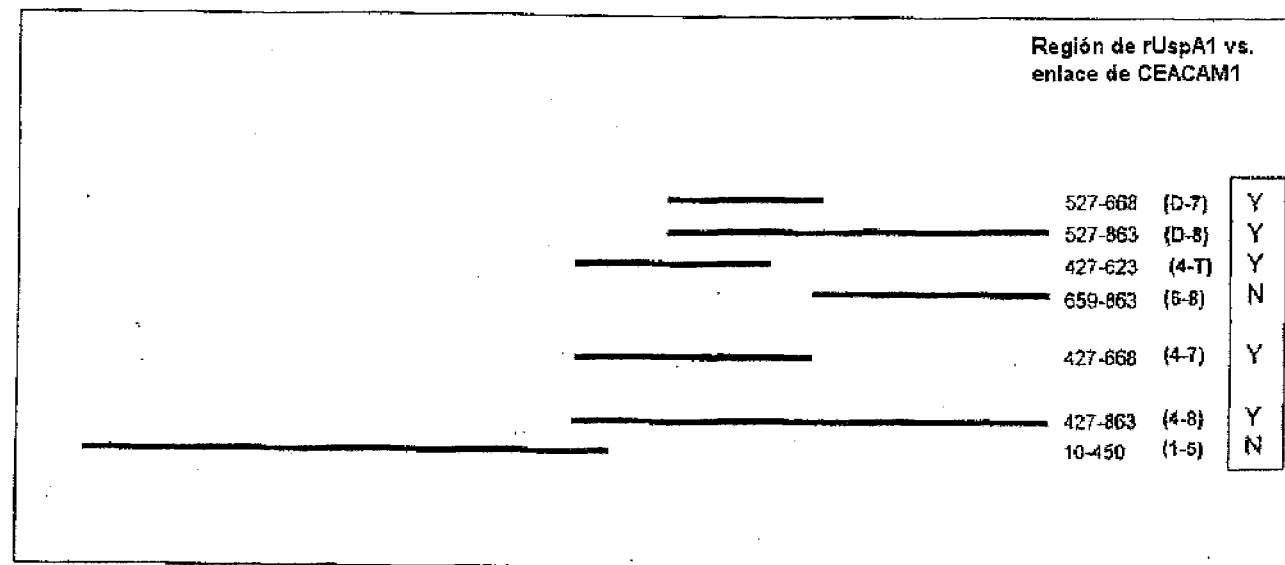


Figura 15



Fragmentos 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

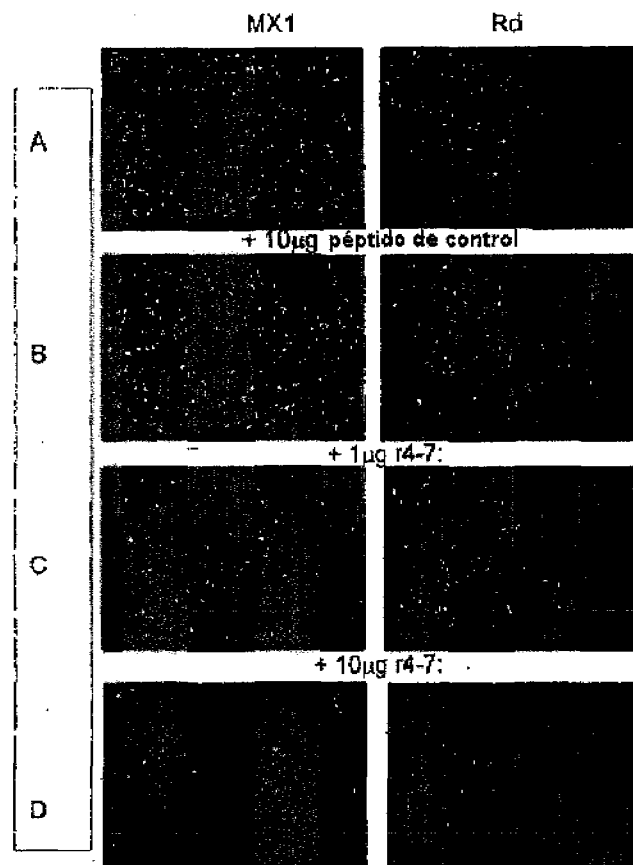


Figura 17

Protein-Protein Interactions: Methods for Detection and Analysis

ERIC M. PHIZICKY¹* AND STANLEY FIELDS²

Department of Biochemistry, University of Rochester Medical School, Rochester, New York 14642,¹ and Department of Molecular Genetics and Microbiology, State University of New York at Stony Brook, Stony Brook, New York 11794²

INTRODUCTION	95
PHYSICAL METHODS TO SELECT AND DETECT PROTEINS THAT BIND ANOTHER PROTEIN	96
Protein Affinity Chromatography	96
Purity of the coupled protein and use of protein fusions	97
Influence of modification state	97
Retention of native structure of the coupled protein	97
Concentration of the coupled protein	98
Amount of extract applied	98
Other considerations	98
Affinity Blotting	98
Immunoprecipitation	99
Cross-Linking	100
Determination of architecture	100
Detection of interacting proteins	101
(i) Detection in vivo	101
(ii) Detection in vitro	101
(iii) Other considerations	102
LIBRARY-BASED METHODS	102
Protein Probing	102
Phage Display	103
Basic approach	103
Related methods	104
(i) Antibody phage	104
(ii) Peptides on plasmids	105
Two-Hybrid System	105
Other Library-Based Methods	106
GENETIC METHODS	106
Extragenic Suppressors	107
Synthetic Lethal Effects	107
Overproduction Phenotypes	108
Overproduction of wild-type proteins	108
Overproduction of mutant proteins	108
Unlinked Noncomplementation	109
POPULAR METHODS TO ESTIMATE AND DETERMINE BINDING CONSTANTS	109
Importance of Characterization of the Binding Interaction	109
Binding constant	109
Concentrations of species	109
Influence of competing proteins	109
Influence of cofactors	109
Effect of cellular compartmentation	109
Solution conditions	109
Limits of Binding-Constant Considerations	109
Methods for Determining Binding Constants	110
Binding to immobilized proteins	110
Sedimentation through gradients	111
Gel filtration columns	111
(i) Nonequilibrium "small-zone" gel filtration columns	111
(ii) Hummel-Dreyer method of equilibrium gel filtration	111
(iii) Large-zone equilibrium gel filtration	112
Sedimentation equilibrium	112

* Corresponding author. Mailing address: Department of Biochemistry, University of Rochester Medical School, 601 Elmwood Ave., Box 607, Rochester, NY 14642. Phone: (716) 275-7268. Fax: (716) 271-2683.

Fluorescence methods	112
(i) Fluorescence spectrum	113
(ii) Fluorescence polarization or anisotropy with tagged molecules	113
Solution equilibrium measured with immobilized binding protein	114
Surface plasmon resonance	114
Limits to Detection	115
EXAMPLES OF WELL-CHARACTERIZED DOMAINS	115
Leucine Zipper	116
Structure	116
Stability	116
Specificity	116
Regulation	116
SH2 Domain	116
SH3 Domain	117
CONCLUDING REMARKS	118
ACKNOWLEDGMENTS	118
REFERENCES	118

INTRODUCTION

Protein-protein interactions are intrinsic to virtually every cellular process. Any listing of major research topics in biology—for example, DNA replication, transcription, translation, splicing, secretion, cell cycle control, signal transduction, and intermediary metabolism—is also a listing of processes in which protein complexes have been implicated as essential components. In consequence, the analysis of the proteins in these complexes is no longer the exclusive domain of biochemists; geneticists, cell biologists, developmental biologists, molecular biologists, and biophysicists have by necessity all gotten into the act. We attempt in this review to summarize both classical and recent methods to identify proteins that interact and to assess the strengths of these interactions.

Proteins that are composed of more than one subunit are found in many different classes of proteins. Some of the best-characterized multisubunit proteins are those that, as originally purified, contained two or more different components. These include classical proteins such as hemoglobin, tryptophan synthetase, aspartate transcarbamylase, core RNA polymerase, Q β -replicase, and glycyl-tRNA synthetase. Since these proteins purified as multisubunit complexes, their protein-protein interactions were self-evident.

Other well-known examples of multisubunit proteins include much more complicated assemblies of polypeptides. These include metabolic enzymes such as the pyruvate dehydrogenase and α -ketoglutarate dehydrogenase complexes, the DNA replication complex of *Escherichia coli* and other organisms, the bacterial flagellar apparatus, the nuclear pore complex, and the tail assembly of bacteriophage T4. Also included in this group are ribonucleoprotein complexes, such as the signal recognition particle of the glycosylation pathway, small nuclear ribonucleoproteins of the spliceosome, and the ribosome itself. Although some of the subunits of these protein complexes are not tightly bound, activity is associated with a large structure that in many cases is called a protein machine (5).

There are also a large number of transient protein-protein interactions, which in turn control a large number of cellular processes. All modifications of proteins necessarily involve such transient protein-protein interactions. These include the interactions of protein kinases, protein phosphatases, glycosyl transferases, acyl transferases, proteases, etc., with their substrate proteins. Such protein-modifying enzymes encompass a large number of protein-protein interactions in the cell and regulate all manner of fundamental processes such as cell growth, cell cycle, metabolic pathways, and signal transduction.

Transient protein-protein interactions are also involved in the recruitment and assembly of the transcription complex to specific promoters, the transport of proteins across membranes, the folding of native proteins catalyzed by chaperonins, individual steps of the translation cycle, and the breakdown and re-formation of subcellular structures during the cell cycle (such as the cytoplasmic microtubules, the spindle apparatus, nuclear lamina, and the nuclear pore complex). Transient complexes are much more difficult to study, because the proteins or conditions responsible for the transient reaction have to be identified first. Part of the goal of this review is to describe recent methods and developments that have allowed their identification and characterization.

Protein-protein interactions can have a number of different measurable effects. First, they can alter the kinetic properties of proteins. This can be reflected in altered binding of substrates, altered catalysis, or (as first enunciated by Monod et al. [153]) altered allosteric properties of the complex. Thus, the interaction of proliferating-cell nuclear antigen with DNA polymerase δ alters the processivity of the polymerase (174), the interaction of succinate thiokinase and α -ketoglutarate dehydrogenase lowers the K_m for succinyl coenzyme A by 30-fold (171), and the cooperative binding of oxygen to hemoglobin and the allosteric regulation of aspartate transcarbamylase are regulated by interactions of the protomers. Second, protein-protein interactions are one common mechanism to allow for substrate channeling. The paradigm for this type of complex is tryptophan synthetase from *Neurospora crassa*. It is a complex of two subunits, each of which carries out one of the two steps of reaction (formation of indole from indole 3-glycerol phosphate, followed by conversion of indole to tryptophan). The intermediate indole is noncovalently bound, but it is preferentially channeled to form tryptophan (241). Many similar examples of metabolic channeling have been demonstrated, both between different subunits of a complex and between different domains of a single multifunctional polypeptide (see reference 208 for a review). Third, protein-protein interactions can result in the formation of a new binding site. Thus, an ADP site forms at the interface of the α and β subunits of *Escherichia coli* F₁-ATPase (228), yeast hexokinase binds one ATP molecule at the interface of the asymmetric homodimer (209), and phosphofructokinase from *Bacillus stearothermophilus* binds both fructose 6-phosphate and ADP at the interface between subunits (60). Fourth, protein-protein interactions can inactivate a protein; this is the case with the interaction of phage P22 repressor with its antirepressor (213), with the interaction of trypsin with trypsin inhibitor (221), and with the interaction of

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES**

Abogada
Alicia Lloreda Ricaurte

ASUNTO	Radicación	05-40022
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	430
	Oficio	08490
	Folios	6

Patente de Invención ☒ Patente de Modelo de Utilidad ☐

Vía Nacional ☐

Vía PCT (fase nacional) ☒ Cap. I ☐ Cap. II ☒

No. Sol. Internacional PCT/GB2003/004273

Fecha de Presentación Internal. 01/10/2003

Como resultado del examen de fondo, realizado con fundamento en el artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica:

Se aceptó la divisional de esta solicitud, por tanto este concepto técnico hace referencia al expediente 05-07268 que corresponde a la solicitud original. no

1. Documentos estudiados

Descripción: Folios: 71 a 94 como se radicó inicialmente.

Reivindicaciones: Folios: 95 a 97 como se radicó inicialmente.
Folios: 152 modificadas el 18/03/2008

Figuras: Folios: 98 a 117 como se radicó inicialmente.

2. Análisis de la prioridad

Prioridad: 02/10/2002, Gran Bretaña, GB0222764.3

De acuerdo con los ajustes realizados al capítulo reivindicatorio presentado el 03/07/2009, se acepta el documento GB0222764.3 como prioridad de la solicitud en estudio. Con lo anterior, toda la materia de la solicitud se debe referir a un péptido (derivado de UspA1) con un sitio de unión al receptor CEACAM que esta localizado entre los segmentos aminoácidos 463-863.

3. Objeto de la invención

Título de la solicitud: "Péptidos terapéuticos".

La presente solicitud se refiere a un ligando que comprende los residuos 427 a 623 de la secuencia SEQ ID N°2 de UspA1, que incluye el dominio de enlace del receptor CEACAM. También se reclama el ligando que presenta una secuencia escogida entre los residuos 463 a 863, 527 a 668, 527 a 863, 427 a 623, 427 a 668, 427 a 863 de la SEQ ID N°2. Adicionalmente se reclama el medicamento que comprende cualquiera de los anteriores ligandos.

El problema planteado en esta solicitud es la necesidad de medicamentos que interactúen con el receptor CEACAM de manera que disminuyan la infección en la membrana mucoide por acción de los patógenos mucosos *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* y *Moraxela catarrhalis*.

Para solucionar este problema técnico la solicitud en estudio proporciona un ligando que hace parte de la molécula UspA1, que incluye el dominio de enlace del receptor CEACAM y el medicamento y vacuna que comprende dicho ligando, de manera que se puede usar para la infección para cualquiera de los tres patógenos mucosos mencionados.

IPC: C07K 14/705.

4. De la solicitud de Patente

4.1. Reivindicaciones (artículo 30 D 486)

El capítulo reivindicatorio presentado carece de claridad por cuanto:

- La reivindicación 3 se refiere a un medicamento que comprende el ligando según la reivindicación 1 y la reivindicación 4 se refiere a una vacuna que comprende el mismo ligando. Sin embargo, estas dos RV no se diferencian por ninguna de las características técnicas, puesto que ambas tienen los mismos elementos secundarios enunciados y carecen de información sobre la composición específica o la proporción de estos.

El capítulo reivindicatorio presentado no se ajusta a los requisitos estipulados en el artículo 30 de la D486.

5. Reivindicaciones relativas a un uso o a un segundo uso (artículos 14 y 21 D 486)

Las reivindicaciones 3 y 4, tal como se mencionó en el numeral anterior, reclaman un medicamento y una vacuna que comprende el ligando definido en la reivindicación 1. Sin embargo, estas reivindicaciones se diferencian entre sí únicamente por el preambulo de las mismas, pareciendo indicar un uso particular que se le puede dar al ligando.

De esta manera y de acuerdo a lo establecido en los artículos 14 y 21 de la Decisión 486 la materia de las reivindicaciones 3 y 4 no es admisible tal como esta reivindicada.

6. Determinación del Estado de la Técnica

La fecha que se ha tenido en cuenta para determinar el Estado de la Técnica es:

Fecha de presentación de la solicitud prioritaria: 02/10/2002

Teniendo en cuenta la fecha indicada se realizó la búsqueda en el estado de la técnica de documentos relacionados con la solicitud encontrándose los siguientes documentos más relevantes:

Nº	Documento	Título	Fecha de publicación
D1	WO 98/28333	"UspA1 and UspA2 antigens of <i>Moraxella catarrhalis</i> "	02/07/1998
D3	MICROBIOLOGICAL REVIEWS, 1995, Vol. 59, No. 1: 94-123	"Protein-Protein Interactions: Methods for Detection and Analysis"	Marzo, 1995

7. Análisis de patentabilidad (artículo 14 D486)

7.1. Nivel inventivo (Artículo 18 de D486)

La reivindicación 1 hace referencia a un ligando del receptor CEACAM, el cual comprende los residuos 427 a 623 de la SEQ ID N°2 de UspA1 o cualquier fragmento de la misma. La reivindicación 2, reclama el ligando que presenta una secuencia escogida entre los residuos 463 a 863, 527 a 668, 527 a 863, 427 a 623, 427 a 668, 427 a 863 de la SEQ ID N°2. Adicionalmente se reclama el medicamento que comprende cualquiera de los anteriores ligandos.

El documento WO 98/28333 (D1), tal como se había mencionado en los conceptos técnicos anteriores, divulga la secuencia completa de la proteína UspA1 así como su empleo en vacunas para prevenir la infección por *M.catarrhalis* (ver todo el documento).

La diferencia entre D1 y la solicitud en estudio es que esta última identifica el segmento específico que se une al receptor CEACAM, es decir el segmento aminoácido 427 a 623 y que el documento D1 mencionaba la posible interacción de UspA1 con fibronectina en lugar del receptor CEACAM.

Por tanto, el aporte de esta solicitud consiste en identificar la interacción de la proteína UspA1 y el receptor CEACAM, así como el segmento específico que tiene esta interacción. Sin embargo, para un experto en la materia resulta una técnica habitual determinar el sitio activo de una proteína o su sitio de interacción realizando experimentos de competencia para unión al receptor o experimentos de inhibición de acción de enzimas digestivas, o cualquier otra técnica habitual de interacción, tal como se ilustra en el documento D3 (ver todo el documento).

Por tanto, la estandarización de una de estas técnicas para la obtención del sitio específico de interacción entre UspA1 y CEACAM, se considera carente de nivel inventivo pues un experto en la materia podría realizar la invención tal como es planteada en la solicitud. Por lo tanto, la invención no cumple con el requisito de nivel inventivo establecido en el artículo 18 de la Decisión 486.

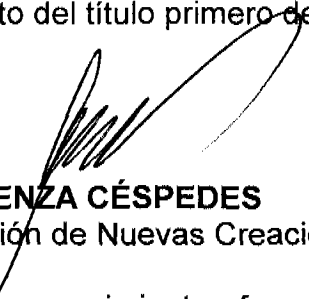
8. Conclusión:

Los requisitos de patentabilidad de la presente solicitud se encuentran afectados así:

Nº	Documento N°	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D1	WO 98/28333	1-4	Nivel inventivo
D3	MICROBIOLOGICAL REVIEWS, Vol. 59, No.1: 94-123	1-4	Nivel inventivo

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de 60 días contados a partir de la fecha de notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento, o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

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 CÉSPEDES
Jefe de División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha
24 JUL. 2009

CONCEPTO TÉCNICO No. 2417	EXAMINADOR TÉCNICO Código No.202052
-------------------------------------	---

