

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO	
RAD: 13-252702- -2	FECHA: 2015-10-14 17:51:16
DEP: 2020 DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES	EVE: 378 FASE NACIONAL INCLUIDO CAPITULO I
TRA: 11 PCT-PATENTE DE INVENCION CAPITULOS I Y II	FOLIOS: 22
ACT: 430 REQUERSOLICITA	

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

2020
Bogotá, D.C.,

Abogado(a)/Señor(a)
CARLOS R. OLARTE GARCIA

Asunto: Radicación: 13-252702- -2
Trámite: 11
Evento: 378
Actuación: 430
Oficio: 12288
Folios: 22

Patente de Invención	X			Patente de Modelo de Utilidad	
Vía Nacional					
Vía PCT (Fase Nacional)	X	Capítulo I	X	Capítulo II	
No. Solicitud Internacional	PCT/IB2012/051999				
Fecha de Presentación Internacional	20/04/2012				

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 comunica:

1. Documentos estudiados

Descripción:	Radicado N° 13 - 0252702 - 00000-0000	24/Octubre/2013
Reivindicaciones:	Radicado N° 13 - 0252702 - 00000-0000	24/Octubre/2013
Dibujos:	Radicado N° 13 - 0252702 - 00000-0000	24/Octubre/2013
Secuencias:	Radicado N° 13 - 0252702 - 00000-0000	24/Octubre/2013
Prioridad:	US 61/478,474	22/Abril/2011
	US 61/478,899	25/Abril/2011

2. Análisis de la Prioridad

Se acepta la reivindicación de prioridad porque ésta solicitud fue presentada dentro del plazo establecido (Art. 9 D 486) y su contenido técnico corresponde con el de la prioridad reivindicada.

3. Objeto de la invención

De acuerdo con lo establecido en el numeral 1.2.2.2 del Título 10 de la Circular Única para efectos del examen de patentabilidad, se tendrá en cuenta la tasa pagada por el solicitante al momento de comenzar el examen para las reivindicaciones adicionales; esto es que cuando la solicitud contenga más de diez (10) reivindicaciones y no se haya pagado la tasa complementaria, sólo se estudiarán las cubiertas por la tasa pagada. En el presente caso se estudiarán las reivindicaciones 1 a 151 del capítulo reivindicatorio del Radicado N° 13 - 0252702 - 00000-0000.

Título de la solicitud: "COMPOSICIONES RELACIONADAS CON UNA TOXINA DE *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* MUTANTE Y SUS MÉTODOS"

El problema planteado en esta solicitud consiste en la necesidad de generar tratamientos contra la recurrencia de la infección generada con *Clostridium difficile* (CDI).

Para resolver este problema técnico la solicitud en estudio proporciona composiciones inmunogénicas y/o terapéuticas que incluye una toxina A y B de *C. difficile* y métodos dirigidos contra esta.

El objeto de la presente solicitud se relaciona con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP): C07K 14/33, A61K 39/08, C07K 16/12

4. No es una invención (Art 15 D 486 literal (b))

El objeto de las reivindicaciones 124 - 127 no se considera una invención, por cuanto en su encabezado se define un método para producir un anticuerpo neutralizante contra las toxinas A y B de *C. difficile* mediante su administración a una mamífero, haciendo referencia a un proceso biológico tal y como ocurre en la naturaleza, por lo anterior no puede ser objeto de patente de conformidad con lo dispuesto en el artículo 15 lit. b) de la referida Decisión 486.

5. Excepción a la Patentabilidad (Art 20 D 486 literal (d))

El objeto de las reivindicaciones 139 – 151, no es patentable de acuerdo con el Art citado, debido a que hacen referencia a un método para tratar una infección generada por *C. difficile* en un mamífero. Se le recuerda a la solicitante que los métodos terapéuticos para el tratamiento humano o animal, así como los métodos de diagnóstico aplicados a los seres humanos o animales, no son patentables, de acuerdo al artículo citado.

6. De la solicitud de patente

Titulo

El título de la solicitud hace referencia a composiciones relacionadas con una toxina de *C. difficile*, lo cual incluye una gran variedad de toxinas, las cuales no se encuentran comprendidas dentro del objeto de la solicitud. Se le recomienda a la solicitante modificar el título mencionando que las toxinas de *C. difficile* son toxinas A y B recombinantes.

Reivindicaciones (Art 30 D 486, Art 22 PCT)

- 1- Las reivindicaciones 1 a 11 no son claras porque definen un polipéptido en términos de que este comprende al menos una cadena lateral de aminoácidos modificada, y no se define a partir de su estructura polipeptídica y de la posición específica en la que dicha cadena se encuentra ligada al polipéptido reclamado. Se le recuerda a la solicitante que un polipéptido se debe definir a partir de sus características técnicas esenciales, es decir su estructura completa, indicando su respectivo SEQ ID NO, con el fin de poder distinguirlo inequívocamente del estado de la técnica.
- 2- Las reivindicaciones 11, 14 y 19 no son claras porque definen una composición que comprende un polipéptido aislado en términos de su resultado alcanzar haciendo referencia a que este presenta un EC₅₀ de al menos aproximadamente 100ug/ml. En este caso las reivindicaciones incluirían no sólo la solución propuesta por el solicitante, sino todas las alternativas presentes o futuras que lleguen a ese resultado.
- 3- Las reivindicaciones 3 – 10, 12, 13, 15 – 18, 20, 38 – 41 no son claras porque definen una composición que comprende un polipéptido aislado en términos de que este comprende una cadena lateral de aminoácidos, la cual se encuentra modificada químicamente por EDC y NHS generando al menos modificaciones de tres posibles tipos tales como entrecruzamientos, aductos de glicina y aductos de beta – alanina, y no se define la composición a partir de la estructura aminoácida del polipéptido, y en términos de los ingredientes, excipientes y cantidades o proporciones propias de dicha composición.
- 4- Las reivindicaciones 12, 13, 15 – 18, 20, 38 – 41 y 42 no son claras porque definen una composición en términos de que sus componentes activos es decir los polipéptidos aislados correspondientes a la toxina A, comprenden al menos una cadena lateral de aminoácidos modificada, y no se define a partir de su estructura aminoácida y de la posición específica en la que dicha cadena se encuentra ligada al polipéptido reclamado. Se le recuerda a la solicitante que una composición de tipo biofarmacéutico debe ser definida exclusivamente a partir del principio activo referenciando su respectiva secuencia de aminoácidos SEQ ID NO, especificando los ingredientes, excipientes y cantidades o proporciones propias de dicha composición.
- 5- Las reivindicaciones 21 - 25, 27, 28, 30, 31 y 33 no son claras porque no definen una composición inmunogénica en términos de sus características técnicas esenciales, es decir la estructura aminoácida de la toxina A de *C. difficile*. Adicionalmente definen una composición de tipo biofarmacéutica a partir de los resultados que se pretenden alcanzar con la modificación estructural, indicando que la toxina A comprende un dominio de glucosiltransferasa que tiene al menos una o dos mutaciones que es una sustitución no

conservativa y que además comprende un dominio de cisteína proteasa que tiene al menos una mutación con respecto a la toxina silvestre. En este caso se deben indicar cuales son los aminoácidos que han sido sustituidos o deletados sobre la respectiva secuencia polipeptídica que define el componente activo. Se le recuerda a la solicitante que una composición de tipo biofarmacéutico debe ser definida a partir del principio activo referenciando su respectiva secuencia de aminoácidos SEQ ID NO, especificando los ingredientes, excipientes y cantidades o proporciones propias de dicha composición.

- 6- Las reivindicaciones 24, 25, 62 y 63 no son claras, ya que hacen referencia a porcentajes de similitud de las secuencias correspondientes a los componentes activos de las composiciones inmunogénicas, es decir a las toxina A y B de *C. difficile*. Se sugiere al solicitante caracterizar las posibles variantes estructurales de las secuencias citadas en estas reivindicaciones por sus secuencias completas, las cuales además debe ser adjuntadas en un listado aparte con su respectivo SEQ ID NO, dichas variantes deben estar completamente sustentadas en la descripción. Por último se recuerda al solicitante que no es correcto hacer definiciones indicando porcentajes de similitud, puesto que esta definición no permite establecer la secuencia aminoácida exacta a la que se refiere.
- 7- Las reivindicaciones 43 – 47 y 53 no son claras porque definen una composición en términos de que su componente activo es decir la toxina A, comprende un dominio de glucosiltransferasa y un dominio de cisteína que presentan sustituciones de aminoácidos, y no se especifica el tipo de sustitución ni el aminoácido que ha sido sustituido. Adicionalmente se define una composición a partir los resultados que se pretende alcanzar con la modificación estructural y el mecanismo de inactivación de las toxinas de *C. difficile* indicando que al menos un aminoácido se encuentra modificado químicamente por EDC y NHS generando un entrecruzamiento; y que la composición es reconocida por un anticuerpo neutralizante de anti – toxina A o fragmento de unión de este; y exhibe disminución de la citotoxicidad, con respecto a la correspondiente toxina tipo A de *C. difficile* . En este caso las reivindicaciones incluirían no sólo la solución propuesta por el solicitante, sino todas las alternativas presentes o futuras que lleguen a ese resultado. Se le recuerda a la solicitante que una composición de tipo biofarmacéutico debe ser definida exclusivamente a partir del principio activo referenciando su respectiva secuencia de aminoácidos SEQ ID NO, especificando los ingredientes, excipientes y cantidades o proporciones propias de dicha composición.
- 8- Las reivindicaciones 48 y 54 no son claras porque definen una composición que comprende un polipéptido aislado en términos de su resultado alcanzar haciendo referencia a su mecanismo de acción indicando que esta exhibe disminución de la citotoxicidad, con respecto a la correspondiente toxina tipo A de *C. difficile*. En este caso las reivindicaciones incluirían no sólo la solución propuesta por el solicitante, sino todas las alternativas presentes o futuras que lleguen a ese resultado. Se le recuerda a la solicitante que una composición de tipo biofarmacéutico debe ser definida exclusivamente a partir del principio activo referenciando su respectiva secuencia de aminoácidos SEQ ID NO, especificando los ingredientes, excipientes y cantidades o proporciones propias de dicha composición.
- 9- Las reivindicaciones 1 – 5, 7, 8, 11 – 15, 17 – 21, 24, 25, 27, 28, 30 , 31, 33, 43 – 47, 53, 59, 65, 66, 68, 69, 71, 76, 79, 81 – 85, 92 – 96, 115 – 117, 119 - 121 no son claras

porque los términos “opcionalmente”, “al menos”, “aproximadamente”, “cualquiera de las combinaciones”, “a lo sumo” son imprecisos, por lo cual no permite distinguir la invención del estado de la técnica. Se sugiere sustituirlo por un término preciso o un rango concreto.

- 10-Las reivindicaciones 59 – 61, 65, 66, 68, 69, 71, 76 – 86, 91 - 96 no son claras porque no definen una composición inmunogénica en términos de sus características técnicas esenciales, es decir la estructura aminoácida de la toxina B de *C. difficile*. Adicionalmente definen una composición de tipo biofarmacéutica a partir de los resultados que se pretenden alcanzar con la modificación estructural y el mecanismo de inactivación de las toxinas de *C. difficile*, indicando que la toxina b comprende un dominio de glucosiltransferasa que tiene al menos una o dos mutaciones que es una sustitución no conservativa de alanina; que al menos un aminoácido se encuentra modificado químicamente por EDC y NHS generando un entrecruzamiento; y que la composición es reconocida por un anticuerpo neutralizante de anti – toxina B o fragmento de unión de este; y exhibe disminución de la citotoxicidad, con respecto a la correspondiente toxina tipo B de *C. difficile*. En este caso se deben indicar las mutaciones puntuales estructurales, especificando las posiciones de aminoácidos que han sido sustituidos o deletados sobre la respectiva secuencia de aminoácidos que define el componente activo. Se le recuerda a la solicitante que una composición de tipo biofarmacéutico debe ser definida a partir del principio activo referenciando su respectiva secuencia de aminoácidos SEQ ID NO, especificando los ingredientes, excipientes y cantidades o proporciones propias de dicha composición.
- 11-Las reivindicaciones 97 - 102 no son claras ya que no se describe ni identifica el proceso para producir células transformadas como una línea celular. Se sugiere al solicitante modificar la redacción de las reivindicaciones mencionadas especificando la línea celular a ser transformada especificando su origen y tipo de célula.
- 12-Las reivindicaciones 103 – 109 no son claras porque definen una célula a partir los resultados que se pretenden alcanzar, al indicar que la célula deriva de una célula de bacteria grampositiva de *C. difficile*, que carece de un polinucleótido endógeno que codifica una toxina; que el gen de esporulación de dicha célula esta inactivado y comprende un gen *spo0A* o un gen *spoIIIE*. En este caso las reivindicaciones incluirían no sólo la solución propuesta por el solicitante, sino todas las alternativas presentes o futuras que lleguen a ese resultado. Se le sugiere a la solicitante definir una célula en términos de la línea celular a ser transformada especificando su origen y tipo de célula.
- 13-Las reivindicaciones 110 – 112 no son claras porque no definen un método para producir una toxina de *C. difficile*, en términos de sus características técnicas esenciales, especificando una secuencia lógica de etapas y condiciones específicas que permitan a la persona normalmente versada en la materia producir dicha toxina, y por lo tanto reproducir el método. Adicionalmente se encuentra definido a partir de los resultados que se pretenden alcanzar, al indicar que la célula comprende el polinucleótido que codifica la toxina de *C. difficile* mutante que comprende un dominio de glucosiltransferasa que tiene al menos una mutación y un dominio de cisteína proteasa; y que la célula carece de un polinucleótido endógeno que codifica una toxina. Se le sugiere a la solicitante definir el

método, especificando las características técnicas esenciales, con el objetivo de poder distinguir el método inequívocamente del estado de la técnica.

- 14-Las reivindicaciones 123, 132 y 138 no son claras porque no definen la composición inmunogénica en términos de sus características técnicas esenciales, especificando la estructura aminoácida de su componente activo y excipientes en las cantidades o proporciones específicas características de dicha composición.
- 15-Las reivindicaciones 128, 129, 133 y 134 no son claras porque el anticuerpo no se define a partir de sus características técnicas esenciales, es decir su estructura aminoácida completa, sino que se caracteriza en función de que este es específico para una composición inmunogénica que comprende secuencias de aminoácidos específicas para las toxinas A y B mutantes. Se le recuerda a la solicitante que no es correcto definir un anticuerpo en términos referentes a una composición inmunogénica, ya que este debe ser definido a partir de sus características técnicas esenciales, es decir su estructura aminoácida completa a partir de las secuencias que lo conforman en la cadena ligera y cadena pesada, o las secuencias variables de la cadena ligera y pesada o las secuencias de los 6 CDR's que conforman ambas cadenas, con el objetivo de poder distinguirlo inequívocamente del estado de la técnica.
- 16-Las reivindicaciones 114 – 123, no son claras porque hacen referencia a reivindicaciones no existentes. Se le sugiere a la solicitante realizar las correspondientes aclaraciones.
- 17-El capítulo reivindicatorio no es conciso porque reclama de forma repetitiva una composición que comprende polipéptidos que caracterizan las toxinas de *C. difficile* en más de una reivindicación independiente. Se le recuerda a la solicitante que por categoría inventiva de producto solo puede haber una reivindicación independiente y las demás si son verdaderas modalidades deben presentarse en la forma de reivindicaciones dependientes.

7. Unidad de invención (Art 25 D 486)

La solicitud no cumple con el requisito de unidad de invención porque se refiere a 5 grupos inventivos, los cuales representan características técnicas estructurales diferentes.

Como se puede observar en el siguiente análisis de las secuencias de aminoácidos reclamadas por la solicitante, no se guarda una estructura común entre todos los polipéptidos aislados correspondientes a las toxinas A y B de *C. difficile*.

Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1

1: WO2012143902_4	100.00	100.00	99.89	99.85	99.85	48.98	48.96	48.85	48.90	48.87
2: WO2012143902_83	100.00	100.00	99.89	99.85	99.85	48.96	48.96	48.83	48.87	48.87
3: WO2012143902_1	99.89	99.89	100.00	99.74	99.74	48.85	48.83	48.98	48.77	48.75
4: WO2012143902_7	99.85	99.85	99.74	100.00	100.00	48.90	48.87	48.77	49.07	49.04
5: WO2012143902_85	99.85	99.85	99.74	100.00	100.00	48.87	48.87	48.75	49.04	49.04
6: WO2012143902_6	48.98	48.96	48.85	48.90	48.87	100.00	100.00	99.87	99.83	99.83
7: WO2012143902_84	48.96	48.96	48.83	48.87	48.87	100.00	100.00	99.87	99.83	99.83
8: WO2012143902_2	48.85	48.83	48.98	48.77	48.75	99.87	99.87	100.00	99.70	99.70
9: WO2012143902_8	48.90	48.87	48.77	49.07	49.04	99.83	99.83	99.70	100.00	100.00
10: WO2012143902_86	48.87	48.87	48.75	49.04	49.04	99.83	99.83	99.70	100.00	100.00

Adicionalmente como se puede observar en el siguiente análisis de las secuencias de aminoácidos que comprenden las regiones determinantes de complementariedad CDRs, reclamadas por la solicitante, no se guarda una estructura común entre todos los CDRs que caracterizan los anticuerpos neutralizantes de TcdB de *C. difficile*.

Secuencias de aminoácidos correspondientes a la CDR1 de cadena pesada

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```
WO2012143902_41      GFTFTNYWMN 10
WO2012143902_73      GYPFTNYWMN 10
WO2012143902_51      GYSFTSYWMN 10
WO2012143902_62      GYTFTSYWMH 10
                        *: ** ***;
```

Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1

1: WO2012143902_41	100.00	80.00	70.00	70.00
2: WO2012143902_73	80.00	100.00	80.00	70.00
3: WO2012143902_51	70.00	80.00	100.00	80.00
4: WO2012143902_62	70.00	70.00	80.00	100.00

Secuencias de aminoácidos correspondientes a la CDR2 de cadena pesada

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```
WO2012143902_52      --RIDPSNSEIYYNQKF-- 15
WO2012143902_74      --RIDPSNSEIYYNQKF-- 15
WO2012143902_63      --VINPSNGRSTYSEKF-- 15
WO2012143902_42      EIRLKSHNYATHFAESVKG 19
                        :.. * : ..
```

Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1

1: WO2012143902_52	100.00	100.00	46.67	13.33
2: WO2012143902_74	100.00	100.00	46.67	13.33
3: WO2012143902_63	46.67	46.67	100.00	13.33
4: WO2012143902_42	13.33	13.33	13.33	100.00

Secuencias de aminoácidos correspondientes a la CDR3 de cadena pesada

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```
WO2012143902_53      GHYG-SIFAY-- 9
WO2012143902_75      GHYG-SIFAY-- 9
WO2012143902_43      DYYGNPAFVY-- 10
WO2012143902_64      AYYSTSYYAMDY 12
                        :* . . :.
1: WO2012143902_53    100.00  100.00  44.44  33.33
2: WO2012143902_75    100.00  100.00  44.44  33.33
3: WO2012143902_43    44.44   44.44  100.00  20.00
4: WO2012143902_64    33.33   33.33   20.00  100.00
```

Secuencias de aminoácidos correspondientes a la CDR1 de cadena ligera

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```
WO2012143902_57      RASKSISK----YLA 11
WO2012143902_79      RASKSISK----YLA 11
WO2012143902_38      RSSQSLIHSNGNTYLH 16
WO2012143902_68      RSSQNIVHSNGNTYLE 16
                        *:*.:.: **
```

Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1

```
1: WO2012143902_57    100.00  100.00  45.45  45.45
2: WO2012143902_79    100.00  100.00  45.45  45.45
3: WO2012143902_38    45.45   45.45  100.00  75.00
4: WO2012143902_68    45.45   45.45   75.00  100.00
```

Secuencias de aminoácidos correspondientes a la CDR2 de cadena ligera

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```
WO2012143902_58      -SGSTLQS 7
WO2012143902_80      -SGSTLQS 7
WO2012143902_39      KVSNRFS- 7
WO2012143902_69      KVSNRFS- 7
                        .. :.
1: WO2012143902_58    100.00  100.00   0.00   0.00
2: WO2012143902_80    100.00  100.00   0.00   0.00
3: WO2012143902_39     0.00   0.00  100.00  100.00
4: WO2012143902_69     0.00   0.00  100.00  100.00
```

Secuencias de aminoácidos correspondientes a la CDR3 de cadena ligera

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```
WO2012143902_59      QQHNEYPLT 9
WO2012143902_81      QQHNEYPLT 9
WO2012143902_40      SQTTFYPYT 9
WO2012143902_70      FQGSHFPFT 9
                        * . :* *
```

Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1

1: WO2012143902_59	100.00	100.00	33.33	33.33
2: WO2012143902_81	100.00	100.00	33.33	33.33
3: WO2012143902_40	33.33	33.33	100.00	44.44
4: WO2012143902_70	33.33	33.33	44.44	100.00

Los grupos inventivos están definidos por las siguientes características técnicas esenciales:

- Grupo inventivo I. Composición inmunogénica que comprende un polipéptido aislado que comprende las siguientes secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1, 4, 7, 83 y 85.
- Grupo inventivo II. Composición inmunogénica que comprende un polipéptido aislado que comprende las siguientes secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 2, 6, 8, 84 y 86.
- Grupo inventivo III. anticuerpo o fragmento de unión del anticuerpo de este que comprende las secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de complementariedad de la cadena pesada (CDR) expuesta en la SEQ ID NO: 41(CDR H1), SEQ ID NO: 42 (CDR H2) y SEQ ID NO: 43 (CDR H3), y las secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena liviana se muestran en las SEQ ID NO: 38 (CDR L1), SEQ ID NO: 39 (CDR L2) y SEQ ID NO: 40 (CDR L3).
- Grupo inventivo IV. anticuerpo o fragmento de unión del anticuerpo de este que comprende las secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de complementariedad de la cadena pesada (CDR) expuesta en la SEQ ID NO: 62 (CDR H1), SEQ ID NO: 63 (CDR H2) y SEQ ID NO: 64 (CDR H3), y las secuencias de aminoácidos de las CDR de la cadena liviana como se muestra en las SEQ ID NO: 68 (CDR L1), SEQ ID NO: 69 (CDR L2) y SEQ ID NO: 70 (CDR L3).
- Grupo inventivo V. anticuerpo o fragmento de unión del anticuerpo de este que comprende las secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de complementariedad de la cadena pesada (CDR) expuesta en la SEQ ID NO: 51 y 73(CDR H1), SEQ ID NO: 52 y 74 (CDR H2) y SEQ ID NO: 53 y 75 (CDR H3), y las secuencias de aminoácidos de la CDR de la cadena liviana como se muestra en las SEQ ID NO: 57 y 79 (CDR L1), SEQ ID NO: 58 y 80 (CDR L2) y SEQ ID NO: 59 y 81 (CDR L3).

En el caso de los grupos inventivos I – II, no se guarda un concepto común porque las composiciones no comparten una estructura esencial para la actividad común. Así mismo, el único concepto común, una composición inmunogénica que comprende una toxina de *C. difficile*, ya había sido divulgado con anterioridad en el documento, el cual divulga una composición inmunogénica que incluye al menos una proteína recombinante, donde el gen que codifica el componente proteico es aislado de una cepa de *Clostridium difficile*. En realizaciones preferidas el componente proteico es una toxina A o B o un fragmento inmunogénico de la misma (Pág. 3, Párr. [0026]).

En referencia a los grupos inventivos III – V, no se guarda un concepto común porque los anticuerpos no comparten una estructura esencial para la actividad común. Así mismo, el único concepto común, un anticuerpo neutralizante de TcdA y TcdB de *C. difficile*, ya había sido divulgado con anterioridad en el documento WO2010094970, el cual divulga anticuerpos que se unen y/o neutralizan la actividad biológica de las toxina A o B o un fragmento de estas de *C. difficile*, con el objetivo de prevenir o tratar la infección generada por *Clostridium difficile* (CDI) (Pág. 3, párr. 1 – 5).

Se le sugiere a la solicitante limitar el objeto de la solicitud en un solo grupo inventivo, o se le sugiere presentar las respectivas solicitudes divisionales para cada uno de los grupos inventivos referidos en esta solicitud

8. Determinación del Estado de la Técnica

El estado de la técnica se determinó con base en la fecha de presentación de la solicitud de prioridad: 22 de abril de 2011, y se encontraron los siguientes documentos que anticipan el objeto de esta solicitud:

Ítem	Documento	Título	Fecha de Publicación
D1	WO2010094970	“Antibodies To <i>Clostridium Difficile</i> Toxins”	26/Agosto/2010
D2	US 20110053244	“Novel Protein Delivery System To Generate Induced Pluripotent Stem (ips) Cells Or Tissue-specific Cells”	03/Marzo/2011
D3	Egerer M. et al., 2009. <i>The Journal of Biological Chemistry</i> . Vol. 284, No. 6, Pág. 3389 – 3395.	“Autocatalytic Processing of <i>Clostridium difficile</i> Toxin B Binding of Inositol Hexakisphosphate”	06/Febrero/2009
D4	WO 2006121422	“Antibodies against <i>Clostridium difficile</i> toxins and uses thereof”	16/Noviembre/2006
D5	US 20050020506	“Crosslinked compositions comprising collagen and demineralized bone matrix, methods of making and methods of use”	27/Enero/2005

El documento D1¹ divulga una composición de anticuerpos que comprende anticuerpos ovinos, útiles en la prevención o el tratamiento de infecciones causadas por *C. difficile*, en donde los anticuerpos se unen a toxinas de *C. difficile* (Abstract)

El documento D2² divulga un constructo para la generación de células madre pluripotentes que comprende dominios de enlace a un receptor, un dominio de translocación y un dominio de soporte de carga de exotoxinas producidas por *C. difficile* (Pág. 2, párr. [0011]).

El documento D3³ divulga un estudio que clarifica la actividad proteasa con más detalle en fragmentos de la toxina B de *C. difficile*, a través de su interacción con el inositol hexafosfato (IP6) (Abstract).

1 <http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?CC=WO&NR=2010094970A1&KC=A1&FT=D>
2 <http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?CC=US&NR=2011053244A1&KC=A1&FT=D>
3 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19047051>

El documento D4⁴ divulga anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos, que se unen específicamente a las toxinas de *C. difficile*, y los métodos de producción y el uso de dichos anticuerpos (Abstract).

El documento D5⁵ divulga una composición que comprende una proteína de colágeno, en donde dicha composición es entrecruzada químicamente por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N -hidroxisuccinimida (NHS) (Abstract).

9. Examen de Patentabilidad (Art 14 D486)

Novedad (Art 16 D486)

La reivindicación 128 consiste en “*Un anticuerpo o fragmento de unión del anticuerpo de este específico para una composición inmunogénica, dicha composición inmunogénica que comprende la SEQ ID NO: 4 donde el residuo de metionina de la posición 1 opcionalmente no está presente, o SEQ ID NO: 7 donde el residuo de metionina de la posición 1 opcionalmente no está presente*” (Radicado N° 13 - 0252702 - 00000-0000).

Comparación de las características técnicas esenciales, con las del estado de la técnica:

Características esenciales	D1
Anticuerpo o fragmento de unión del anticuerpo de este específico para una composición inmunogénica	Composición de anticuerpo que se unen a la toxina de <i>C. difficile</i> A y la toxina de <i>C. difficile</i> a B. (Pág. 41, Rv. 4)

Las características esenciales de un anticuerpo o fragmento de unión del anticuerpo de este reclamado en la reivindicación 128 habían sido divulgadas previamente en el documento D1, en el cual se divulgan anticuerpos que se unen y/o neutralizan la actividad biológica de las toxina A o B o un fragmento de estas de *C. difficile*, con el objetivo de prevenir o tratar la infección generada por *Clostridium difficile* (CDI) (Pág. 3, párr. 1 – 5).

En consecuencia, la reivindicación 128 carece de novedad, según lo divulgado en los documento D1.

La reivindicación dependiente 129 no menciona características novedosas para el anticuerpo o fragmento de unión del anticuerpo de la reivindicación 128, por lo cual se considera que tampoco es nueva.

Nivel inventivo (Art18 D486)

Análisis de patentabilidad para el grupo inventivo I.

La reivindicación 1 consiste en “*Un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4, donde el residuo de metionina en la posición 1 opcionalmente no está presente, y donde el polipéptido comprende al menos una cadena lateral de aminoácidos modificada químicamente por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS)*” (13 - 0252702 -

4 <http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?CC=WO&NR=2006121422A2&KC=A2&FT=D>

5 <http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?CC=US&NR=2005020506A1&KC=A1&FT=D>

00000-0000)".

Comparación de las características técnicas esenciales, con las del estado de la técnica:

Características esenciales	D2	D1
Polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4.	Polipéptido caracterizado por la SEQ ID NO: 3 (Pág. 4, párr. [0036]) que presenta un 99% de identidad con la SEQ ID NO: 4 reclamada en la solicitud.	Secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 que caracteriza la toxina A de <i>Clostridium difficile</i> (Pág. 36 – 37),
Modificación química de la cadena lateral del polipéptido por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS).	No registra	Modificación por tratamiento químico (Pág. 9, párr. 3).

El documento D2 se considera el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 1 puesto que divulga constructos de las toxinas A (TcdA) y B (TcdB) de *Clostridium difficile*, que comprenden tres dominios funcionales (Pág. 3, párr. [0031]). Específicamente se divulga la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3 que caracteriza un constructo Oct4 – aTcdA que comprende un dominio CBD el cual corresponde a una porción inactiva del dominio de glucosiltransferasa (GT) y un dominio CPD que representa un dominio intrínseco de cisteína proteasa entre otros dominios (Pág. 4, párr. [0036]), la cual presenta un 99% de identidad (se muestra solo una parte del alineamiento) respecto a la SEQ ID NO: 4 reclamada por la solicitante.

Query: SEQ ID NO: 3 de D2
Sbjct: SEQ ID NO: 4 de la solicitud

Range 1: 2 to 2710		Graphics		Next Match		Previous Match	
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps		
5428 bits (14082)	0.0	Compositional matrix adjust.	2702/2709(99%)	2703/2709(99%)	0/2709(0%)		
Query 420	SLTSKEELIKLAVSIRPRENEYKTLT	SLTSKEELIKLAVSIRPRENEYKTLT	SLTSKEELIKLAVSIRPRENEYKTLT	SLTSKEELIKLAVSIRPRENEYKTLT	SLTSKEELIKLAVSIRPRENEYKTLT	479	
Sbjct 2	SLTSKEELIKLAVSIRPRENEYKTLT	SLTSKEELIKLAVSIRPRENEYKTLT	SLTSKEELIKLAVSIRPRENEYKTLT	SLTSKEELIKLAVSIRPRENEYKTLT	SLTSKEELIKLAVSIRPRENEYKTLT	61	
Query 480	YKTSRNRALSMILKKDILKEVILTKNSNTSPVEKHLHFVNIIGGEVSDIALEYIKQWADIN	YKTSRNRALSMILKKDILKEVILTKNSNTSPVEKHLHFVNIIGGEVSDIALEYIKQWADIN	YKTSRNRALSMILKKDILKEVILTKNSNTSPVEKHLHFVNIIGGEVSDIALEYIKQWADIN	YKTSRNRALSMILKKDILKEVILTKNSNTSPVEKHLHFVNIIGGEVSDIALEYIKQWADIN	YKTSRNRALSMILKKDILKEVILTKNSNTSPVEKHLHFVNIIGGEVSDIALEYIKQWADIN	539	
Sbjct 62	YKTSRNRALSMILKKDILKEVILTKNSNTSPVEKHLHFVNIIGGEVSDIALEYIKQWADIN	YKTSRNRALSMILKKDILKEVILTKNSNTSPVEKHLHFVNIIGGEVSDIALEYIKQWADIN	YKTSRNRALSMILKKDILKEVILTKNSNTSPVEKHLHFVNIIGGEVSDIALEYIKQWADIN	YKTSRNRALSMILKKDILKEVILTKNSNTSPVEKHLHFVNIIGGEVSDIALEYIKQWADIN	YKTSRNRALSMILKKDILKEVILTKNSNTSPVEKHLHFVNIIGGEVSDIALEYIKQWADIN	121	
Query 540	AEYNIKLVYDSEAFVNTLKKAVESSTTEALQLEEEIQNPQDNMFYKKRHEFIYDR	AEYNIKLVYDSEAFVNTLKKAVESSTTEALQLEEEIQNPQDNMFYKKRHEFIYDR	AEYNIKLVYDSEAFVNTLKKAVESSTTEALQLEEEIQNPQDNMFYKKRHEFIYDR	AEYNIKLVYDSEAFVNTLKKAVESSTTEALQLEEEIQNPQDNMFYKKRHEFIYDR	AEYNIKLVYDSEAFVNTLKKAVESSTTEALQLEEEIQNPQDNMFYKKRHEFIYDR	599	
Sbjct 122	AEYNIKLVYDSEAFVNTLKKAVESSTTEALQLEEEIQNPQDNMFYKKRHEFIYDR	AEYNIKLVYDSEAFVNTLKKAVESSTTEALQLEEEIQNPQDNMFYKKRHEFIYDR	AEYNIKLVYDSEAFVNTLKKAVESSTTEALQLEEEIQNPQDNMFYKKRHEFIYDR	AEYNIKLVYDSEAFVNTLKKAVESSTTEALQLEEEIQNPQDNMFYKKRHEFIYDR	AEYNIKLVYDSEAFVNTLKKAVESSTTEALQLEEEIQNPQDNMFYKKRHEFIYDR	181	
Query 600	QKRFINYKQINKPTVPTIDDIKSHLVSEYNRDETVEYRTNSLRKINSNHGIDIRA	QKRFINYKQINKPTVPTIDDIKSHLVSEYNRDETVEYRTNSLRKINSNHGIDIRA	QKRFINYKQINKPTVPTIDDIKSHLVSEYNRDETVEYRTNSLRKINSNHGIDIRA	QKRFINYKQINKPTVPTIDDIKSHLVSEYNRDETVEYRTNSLRKINSNHGIDIRA	QKRFINYKQINKPTVPTIDDIKSHLVSEYNRDETVEYRTNSLRKINSNHGIDIRA	659	
Sbjct 182	QKRFINYKQINKPTVPTIDDIKSHLVSEYNRDETVEYRTNSLRKINSNHGIDIRA	QKRFINYKQINKPTVPTIDDIKSHLVSEYNRDETVEYRTNSLRKINSNHGIDIRA	QKRFINYKQINKPTVPTIDDIKSHLVSEYNRDETVEYRTNSLRKINSNHGIDIRA	QKRFINYKQINKPTVPTIDDIKSHLVSEYNRDETVEYRTNSLRKINSNHGIDIRA	QKRFINYKQINKPTVPTIDDIKSHLVSEYNRDETVEYRTNSLRKINSNHGIDIRA	241	
Query 660	NSLFTQEQLLNIZYSQELNRRGNLAAASDVRLALKNFGGVYLAVAMLPGIHSLFKTIS	NSLFTQEQLLNIZYSQELNRRGNLAAASDVRLALKNFGGVYLAVAMLPGIHSLFKTIS	NSLFTQEQLLNIZYSQELNRRGNLAAASDVRLALKNFGGVYLAVAMLPGIHSLFKTIS	NSLFTQEQLLNIZYSQELNRRGNLAAASDVRLALKNFGGVYLAVAMLPGIHSLFKTIS	NSLFTQEQLLNIZYSQELNRRGNLAAASDVRLALKNFGGVYLAVAMLPGIHSLFKTIS	719	
Sbjct 242	NSLFTQEQLLNIZYSQELNRRGNLAAASDVRLALKNFGGVYLAVAMLPGIHSLFKTIS	NSLFTQEQLLNIZYSQELNRRGNLAAASDVRLALKNFGGVYLAVAMLPGIHSLFKTIS	NSLFTQEQLLNIZYSQELNRRGNLAAASDVRLALKNFGGVYLAVAMLPGIHSLFKTIS	NSLFTQEQLLNIZYSQELNRRGNLAAASDVRLALKNFGGVYLAVAMLPGIHSLFKTIS	NSLFTQEQLLNIZYSQELNRRGNLAAASDVRLALKNFGGVYLAVAMLPGIHSLFKTIS	301	
Query 720	RPSSIGLDRHEIKLEAIMKYKYYINNYTSENFDKLQQLKDNFKLIESKSEKSEIFSK	RPSSIGLDRHEIKLEAIMKYKYYINNYTSENFDKLQQLKDNFKLIESKSEKSEIFSK	RPSSIGLDRHEIKLEAIMKYKYYINNYTSENFDKLQQLKDNFKLIESKSEKSEIFSK	RPSSIGLDRHEIKLEAIMKYKYYINNYTSENFDKLQQLKDNFKLIESKSEKSEIFSK	RPSSIGLDRHEIKLEAIMKYKYYINNYTSENFDKLQQLKDNFKLIESKSEKSEIFSK	779	
Sbjct 302	RPSSIGLDRHEIKLEAIMKYKYYINNYTSENFDKLQQLKDNFKLIESKSEKSEIFSK	RPSSIGLDRHEIKLEAIMKYKYYINNYTSENFDKLQQLKDNFKLIESKSEKSEIFSK	RPSSIGLDRHEIKLEAIMKYKYYINNYTSENFDKLQQLKDNFKLIESKSEKSEIFSK	RPSSIGLDRHEIKLEAIMKYKYYINNYTSENFDKLQQLKDNFKLIESKSEKSEIFSK	RPSSIGLDRHEIKLEAIMKYKYYINNYTSENFDKLQQLKDNFKLIESKSEKSEIFSK	361	
Query 780	LENLNVSDLEIKAFALGSVINQALISKQGSYLTNLVIEQVKNRYQFLNQHLNPAIESDN	LENLNVSDLEIKAFALGSVINQALISKQGSYLTNLVIEQVKNRYQFLNQHLNPAIESDN	LENLNVSDLEIKAFALGSVINQALISKQGSYLTNLVIEQVKNRYQFLNQHLNPAIESDN	LENLNVSDLEIKAFALGSVINQALISKQGSYLTNLVIEQVKNRYQFLNQHLNPAIESDN	LENLNVSDLEIKAFALGSVINQALISKQGSYLTNLVIEQVKNRYQFLNQHLNPAIESDN	839	
Sbjct 362	LENLNVSDLEIKAFALGSVINQALISKQGSYLTNLVIEQVKNRYQFLNQHLNPAIESDN	LENLNVSDLEIKAFALGSVINQALISKQGSYLTNLVIEQVKNRYQFLNQHLNPAIESDN	LENLNVSDLEIKAFALGSVINQALISKQGSYLTNLVIEQVKNRYQFLNQHLNPAIESDN	LENLNVSDLEIKAFALGSVINQALISKQGSYLTNLVIEQVKNRYQFLNQHLNPAIESDN	LENLNVSDLEIKAFALGSVINQALISKQGSYLTNLVIEQVKNRYQFLNQHLNPAIESDN	421	
Query 840	NFTDTTKIFHDSLFNSATAENSHFLTKIAPYLQVGFHPEARSTISLSGPGAYASAYYDFI	NFTDTTKIFHDSLFNSATAENSHFLTKIAPYLQVGFHPEARSTISLSGPGAYASAYYDFI	NFTDTTKIFHDSLFNSATAENSHFLTKIAPYLQVGFHPEARSTISLSGPGAYASAYYDFI	NFTDTTKIFHDSLFNSATAENSHFLTKIAPYLQVGFHPEARSTISLSGPGAYASAYYDFI	NFTDTTKIFHDSLFNSATAENSHFLTKIAPYLQVGFHPEARSTISLSGPGAYASAYYDFI	899	
Sbjct 422	NFTDTTKIFHDSLFNSATAENSHFLTKIAPYLQVGFHPEARSTISLSGPGAYASAYYDFI	NFTDTTKIFHDSLFNSATAENSHFLTKIAPYLQVGFHPEARSTISLSGPGAYASAYYDFI	NFTDTTKIFHDSLFNSATAENSHFLTKIAPYLQVGFHPEARSTISLSGPGAYASAYYDFI	NFTDTTKIFHDSLFNSATAENSHFLTKIAPYLQVGFHPEARSTISLSGPGAYASAYYDFI	NFTDTTKIFHDSLFNSATAENSHFLTKIAPYLQVGFHPEARSTISLSGPGAYASAYYDFI	481	
Query 900	NLQENTIETKLKASDLIEFKFPENILSQLTEQINSLSFDQASAKYQFEKYVRDVTGGG	NLQENTIETKLKASDLIEFKFPENILSQLTEQINSLSFDQASAKYQFEKYVRDVTGGG	NLQENTIETKLKASDLIEFKFPENILSQLTEQINSLSFDQASAKYQFEKYVRDVTGGG	NLQENTIETKLKASDLIEFKFPENILSQLTEQINSLSFDQASAKYQFEKYVRDVTGGG	NLQENTIETKLKASDLIEFKFPENILSQLTEQINSLSFDQASAKYQFEKYVRDVTGGG	959	
Sbjct 482	NLQENTIETKLKASDLIEFKFPENILSQLTEQINSLSFDQASAKYQFEKYVRDVTGGG	NLQENTIETKLKASDLIEFKFPENILSQLTEQINSLSFDQASAKYQFEKYVRDVTGGG	NLQENTIETKLKASDLIEFKFPENILSQLTEQINSLSFDQASAKYQFEKYVRDVTGGG	NLQENTIETKLKASDLIEFKFPENILSQLTEQINSLSFDQASAKYQFEKYVRDVTGGG	NLQENTIETKLKASDLIEFKFPENILSQLTEQINSLSFDQASAKYQFEKYVRDVTGGG	541	
Query 960	LSEDNVDFNKNTALDKINYLNNKIPSNVIEEAGSKNYVHYIQLQGDQISYEATCNLFS	LSEDNVDFNKNTALDKINYLNNKIPSNVIEEAGSKNYVHYIQLQGDQISYEATCNLFS	LSEDNVDFNKNTALDKINYLNNKIPSNVIEEAGSKNYVHYIQLQGDQISYEATCNLFS	LSEDNVDFNKNTALDKINYLNNKIPSNVIEEAGSKNYVHYIQLQGDQISYEATCNLFS	LSEDNVDFNKNTALDKINYLNNKIPSNVIEEAGSKNYVHYIQLQGDQISYEATCNLFS	1019	
Sbjct 542	LSEDNVDFNKNTALDKINYLNNKIPSNVIEEAGSKNYVHYIQLQGDQISYEATCNLFS	LSEDNVDFNKNTALDKINYLNNKIPSNVIEEAGSKNYVHYIQLQGDQISYEATCNLFS	LSEDNVDFNKNTALDKINYLNNKIPSNVIEEAGSKNYVHYIQLQGDQISYEATCNLFS	LSEDNVDFNKNTALDKINYLNNKIPSNVIEEAGSKNYVHYIQLQGDQISYEATCNLFS	LSEDNVDFNKNTALDKINYLNNKIPSNVIEEAGSKNYVHYIQLQGDQISYEATCNLFS	601	

En cuanto al documento D1 divulga una variante inmunogénica de las toxinas de *Clostridium difficile* (Pág. 9, párr. 2).

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 1 y el polipéptido aislado divulgado en el documento D2, consiste en que el polipéptido ha sido modificado

químicamente por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS).

El efecto que logra el incluir un polipéptido aislado modificado químicamente por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS), es disminuir la citotoxicidad de la toxina de *C. difficile*, caracterizada por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4.

Por lo tanto, el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: “Cómo proveer un polipéptido aislado modificado químicamente, útil en el tratamiento contra la recurrencia de la infección generada por *Clostridium difficile* (CDI)”.

Sin embargo, el documento D1 divulga variantes inmunogénicas de la toxina A de *C. difficile*, las cuales han sido sometidas a tratamiento químico por ejemplo con agentes que incluyen formaldehído, UDP-dialdehído, glutaraldehído, peróxido entre otros, los cuales también se ha demostrado que actúan como agentes químicos adecuados para inactivar completa o parcialmente las toxinas de *C. difficile*, reduciendo su toxicidad (Pág. 9, párr. 3).

En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia, incluiría los agentes de entrecruzamiento químico que disminuyen la citotoxicidad de las toxinas de *C. difficile*, divulgados en el documento D1, en el polipéptido aislado según la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3 que caracteriza un constructo de TcdA divulgada en el documento D2, para llegar así al objeto de la reivindicación 1 de la solicitud, por lo cual se considera obvia.

Las reivindicaciones 2 - 11, 55 – 58 no mencionan características inventivas adicionales para el polipéptido aislado de la reivindicación 1, por lo cual se considera que tampoco tienen nivel inventivo.

Análisis de patentabilidad para el grupo inventivo II.

La reivindicación 12 consiste en “Una composición inmunogénica que comprende un polipéptido aislado que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4, donde el residuo de metionina de la posición 1 opcionalmente no está presente, y un polipéptido aislado que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 6, donde el residuo de metionina de la posición 1 opcionalmente no está presente, y donde el polipéptidos tiene al menos una cadena lateral de aminoácidos modificada químicamente por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS)” (13 - 0252702 - 00000-0000).

Comparación de las características técnicas esenciales, con las del estado de la técnica:

Características esenciales	D1	D5
Composición inmunogénica	Composiciones (Pág. 3, Párr. 5).	Composición (Pág. 5, Rv. 1).
Comprende un polipéptido aislado que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4	Secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 que caracteriza la toxina A de <i>Clostridium difficile</i> (Pág. 36 – 37), presenta un 99% de identidad y 100% de cobertura con la SEQ ID	No registra

	NO 4.	
Comprende un polipéptido aislado que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 6	Secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2 que caracteriza la toxina A de <i>Clostridium difficile</i> (Pág. 36 – 37), presenta un 99% de identidad y 100% de cobertura con la SEQ ID NO 6.	No registra
Modificación química de la cadena lateral del polipéptido por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS).	Modificación por tratamiento químico (Pág. 9, párr. 3).	Entrecruzamiento químico por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N -hidroxisuccinimida (NHS) (Pág. 5, Rv. 3 y 4).

El documento D1 se considera el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 12 puesto que divulga composiciones de anticuerpo dirigidas contra las toxinas A y B de *Clostridium difficile* (Pág. 3, Párr. 5) y las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1 y 2 que caracterizan las toxinas A y B de *Clostridium difficile* (Pág. 36 – 37) respectivamente, las cuales presenta un 99% de identidad y 100% de cobertura (se muestra solo una parte del alineamiento) con las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO 4 y 6 reclamadas en la solicitud.

Query: SEQ ID NO: 4 de la solicitud
Sbjct: SEQ ID NO: 1 de D1

Range 1: 1 to 2710 Graphics			▼ Next Match ▲ Previous Match		
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
5433 bits (14093)	0.0	Compositional matrix adjust.	2701/2710 (99%)	2702/2710 (99%)	0/2710 (0%)
Query 1	MSLSKEELIKLAYSIRPRENEYKITLTNLDEYNKLTNNNNENKYLQKKLNESIDVFHN			60	
Sbjct 1	MSLSKEELIKLAYSIRPRENEYKITLTNLDEYNKLTNNNNENKYLQKKLNESIDVFHN			60	
Query 61	KYKTSRRNRALSNLKKDILKEVILIKNSNTSPVEKNLHFVWIGGEVSDIALEYIKQWADI			120	
Sbjct 61	KYKTSRRNRALSNLKKDILKEVILIKNSNTSPVEKNLHFVWIGGEVSDIALEYIKQWADI			120	
Query 121	NAEYNIKLVYDSEAFVNTLKKATVESSTTEALQLLEEIQNPQDNMKFYKKRMFIYD			180	
Sbjct 121	NAEYNIKLVYDSEAFVNTLKKATVESSTTEALQLLEEIQNPQDNMKFYKKRMFIYD			180	
Query 181	RQKRFINYYKSQINKPTVPTIDDIKSHLVSEYNRDETIVLESYRTNSLRKINSNHGIDIR			240	
Sbjct 181	RQKRFINYYKSQINKPTVPTIDDIKSHLVSEYNRDETIVLESYRTNSLRKINSNHGIDIR			240	
Query 241	ANSLFTEQELLNISYQELNLRGNLAAASDIVRLALKNFGGVYLAVAMLPGIHSLDFKTI			300	
Sbjct 241	ANSLFTEQELLNISYQELNLRGNLAAASDIVRLALKNFGGVYLAVMLPGIHSOLDFKTI			300	
Query 301	SRPSSIGLDRNEMIKLEAIMYKYYINNYTSENFDKLDQQLKDNFKLIEESKSEKSEIFS			360	
Sbjct 301	SRPSSIGLDRNEMIKLEAIMYKYYINNYTSENFDKLDQQLKDNFKLIEESKSEKSEIFS			360	
Query 361	KLENLWSDLEIKIAFALGSVINQALISKQGSYLTNLVIEQVKNRVQFLNQHLNPAIESD			420	
Sbjct 361	KLENLWSDLEIKIAFALGSVINQALISKQGSYLTNLVIEQVKNRVQFLNQHLNPAIESD			420	
Query 421	NNFTDTTKIFHDSLFSNATAENSMFLTKIAPYLQVGFMPPEARSTISLSGPGAYASAYYDF			480	
Sbjct 421	NNFTDTTKIFHDSLFSNATAENSMFLTKIAPYLQVGFMPPEARSTISLSGPGAYASAYYDF			480	
Query 481	INLQENTIEKTLKASDLIEFKFPENNLSQLTEQETNSLWSDQASAKYQFEKYVRDYTG			540	
Sbjct 481	INLQENTIEKTLKASDLIEFKFPENNLSQLTEQETNSLWSDQASAKYQFEKYVRDYTG			540	
Query 541	SLSEDNGVDFNKNTALDKNYLLNNKIPSNVVEEAGSKNYVHYIQLQDDISYEATCNLF			600	
Sbjct 541	SLSEDNGVDFNKNTALDKNYLLNNKIPSNVVEEAGSKNYVHYIQLQDDISYEATCNLF			600	
Query 601	SKNPKNSIIQRNMNESAKSYFLSDDGESILELNKYRIPERLKNKEKVKVTFIGHGKDEF			660	
Sbjct 601	SKNPKNSIIQRNMNESAKSYFLSDDGESILELNKYRIPERLKNKEKVKVTFIGHGKDEF			660	

Query: SEQ ID NO: 6 de la solicitud
Sbjct: SEQ ID NO: 2 de D1

Range 1: 1 to 2366		Graphs	Next Match		Previous Match	
Score	Expect	Method	Identities		Positives	
4751 bits(12323)	0.0	Compositional matrix adjust.	2363/2366(99%)		2363/2366(99%)	
					0/2366(0%)	
Query	1	MSLVNRKQLEKMANVRFRRTQDEYVAITLDALEEYHMSSENTVVEKYLKLDINSITDIYI			60	
Sbjct	1	MSLVNRKQLEKMANVRFRRTQDEYVAITLDALEEYHMSSENTVVEKYLKLDINSITDIYI			60	
Query	61	DTYKSGRNKALKKFKYLVTEVLELKNMNLTPVEKNLHFWIGQINDTAINYINQKQD			120	
Sbjct	61	DTYKSGRNKALKKFKYLVTEVLELKNMNLTPVEKNLHFWIGQINDTAINYINQKQD			120	
Query	121	VNSDYNWVFYDSNAFLINTLKKTVVESAINDTLESFRENLDPRFDYKFFRKRIEIIY			180	
Sbjct	121	VNSDYNWVFYDSNAFLINTLKKTVVESAINDTLESFRENLDPRFDYKFFRKRIEIIY			180	
Query	181	DKQKNFINYYKAQREENPELIIDDIVKTYLSNEYKSEIDELNTYIEESLNKITQNSGNDV			240	
Sbjct	181	DKQKNFINYYKAQREENPELIIDDIVKTYLSNEYKSEIDELNTYIEESLNKITQNSGNDV			240	
Query	241	RNFEFKNGESFNLYEQELVERWNLAAASDILRSALKKEIGGHYLAVALPGIOPDLFES			300	
Sbjct	241	RNFEFKNGESFNLYEQELVERWNLAAASDILRSALKKEIGGHYLAVALPGIOPDLFES			300	
Query	301	IEKPSVTVDFWENTKLEAIMKYKEIPEYTSEHFDMLDEEVQSSFESVLASKSDKSEIF			360	
Sbjct	301	IEKPSVTVDFWENTKLEAIMKYKEIPEYTSEHFDMLDEEVQSSFESVLASKSDKSEIF			360	
Query	361	SSLGDMEASPLEVKIAFNSKGIINQGLISVKDSCYNLIVKQIENRYKILNNSLNPAISE			420	
Sbjct	361	SSLGDMEASPLEVKIAFNSKGIINQGLISVKDSCYNLIVKQIENRYKILNNSLNPAISE			420	
Query	421	DNDFTTTNTTIDSIHAEANADNGRFHMLGKYLVRGFFPDVKTTINLSGPEAYAAAYQD			480	
Sbjct	421	DNDFTTTNTTIDSIHAEANADNGRFHMLGKYLVRGFFPDVKTTINLSGPEAYAAAYQD			480	
Query	481	LLHFKEGSMIHLIADLRNFEISKTNISQTEQEHASLWSDARAKAQFEYKRNYYE			540	
Sbjct	481	LLHFKEGSMIHLIADLRNFEISKTNISQTEQEHASLWSDARAKAQFEYKRNYYE			540	
Query	541	GSLGEDNLDQSNIVDKYLLKTISSSLARSSERYIHYIVQLQSDKISYEAACNLFAK			600	
Sbjct	541	GSLGEDNLDQSNIVDKYLLKTISSSLARSSERYIHYIVQLQSDKISYEAACNLFAK			600	
Query	601	TPYDSVLFQKNIEDSEIAYYNNPGDGEIQEIDKYKIPSIISDRPKIKLTFIGHGKDFNT			660	
Sbjct	601	TPYDSVLFQKNIEDSEIAYYNNPGDGEIQEIDKYKIPSIISDRPKIKLTFIGHGKDFNT			660	

Adicionalmente el documento D1 divulga variantes inmunogénicas de la toxina A de *C. difficile*, las cuales han sido sometidas a tratamiento químico por ejemplo con agentes que incluyen formaldehído, UDP-dialdehído, glutaraldehído, peróxido entre otros, los cuales también se ha demostrado que actúan como agentes químicos adecuados para inactivar completa o parcialmente las toxinas de *C. difficile*, reduciendo su toxicidad (Pág. 9, párr. 3), al igual que el 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) reclamados por la solicitante.

En cuanto al documento D5 divulga una composición que comprende una proteína la cual ha sido sometida a entrecruzamiento químico por agentes como el 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N -hidroxisuccinimida (NHS) (Pág. 1, párr.[0005]).

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 12 y la composición inmunogénica divulgada en el documento D1, consiste en que los polipéptidos que caracterizan las toxinas de *C. difficile*, han sido modificadas químicamente por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS).

El efecto que logra el incluir secuencias de aminoácidos que caracterizan las toxinas de *C. difficile* modificadas químicamente por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS), es disminuir la citotoxicidad de las toxinas de *C. difficile*.

Por lo tanto, el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: “Cómo proveer una composición que comprenda polipéptidos modificados químicamente, útil en el tratamiento contra la recurrencia de la infección generada por *Clostridium difficile* (CDI)”.

Sin embargo, el documento D5 ya sugería emplear agentes de entrecruzamiento químico como el 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N -hidroxisuccinimida (NHS) en un polipéptido (Pág. 2, parr. [0014]), los cuales podrían actuar como agentes químicos

adecuados para inactivar completa o parcialmente las toxinas de *C. difficile*, reduciendo su toxicidad.

En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia, incluiría los agentes de entrecruzamiento químico EDC y NHS divulgados en el documento D5, y los agentes que incluyen formaldehído, UDP-dialdehído, glutaraldehído, peróxido entre otros, los cuales también se ha demostrado que actúan como agentes químicos adecuados para inactivar completa o parcialmente las toxinas de *C. difficile*, reduciendo su toxicidad (Pág. 9, párr. 3) divulgados en el documento D1, para llegar así al objeto de la reivindicación 12 de la solicitud, por lo cual se considera obvia.

En conclusión, la reivindicación 12 cumple el requisito de novedad (Art. 16), pero no cumple con el requisito de nivel inventivo (Art. 18).

Las reivindicaciones 13 – 20 no mencionan características inventivas adicionales para la composición inmunogénica de la reivindicación 12, por lo cual se considera que tampoco tienen nivel inventivo.

Análisis de patentabilidad para el grupo inventivo I.

La reivindicación 21 consiste en “Una composición inmunogénica que comprende una toxina A de *Clostridium difficile* mutante, que comprende un dominio de glucosiltransferasa que tiene al menos una mutación y un dominio de cisteína proteasa que tiene al menos una mutación, con respecto a la correspondiente toxina tipo A de *Clostridium difficile* de tipo salvaje” (Radicado N° 13 - 0252702 - 00000-0000).

Comparación de las características técnicas esenciales, con las del estado de la técnica:

Características esenciales	D1	D3
Composición inmunogénica	Composiciones (Pág. 3, Párr. 5).	No registra
Comprende una toxina A de <i>Clostridium difficile</i> mutante	Toxina A mutante de <i>Clostridium difficile</i> (Pág. 9, párr. 3).	Toxina de <i>Clostridium difficile</i> mutante (Pág. 3391, Col. 2).
Comprende un dominio de glucosiltransferasa que tiene al menos una mutación	Mutagénesis en el dominio N – terminal de la toxinas (es decir en el dominio de glucosiltransferasa) (Pág. 9, párr. 3).	No registra
Comprende un dominio de cisteína proteasa que tiene al menos una mutación	No registra	Dominio catalítico de cisteína comprende mutaciones D587N, H653A, C698A (Pág. 3391, Col. 2).

El documento D1 se considera el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 21 puesto que divulga composiciones de anticuerpo dirigidas contra las toxinas A y B de *Clostridium difficile* (Pág. 3, Párr. 5). Se presentan variantes inmunogénicas de las toxinas de *Clostridium difficile* (Pág. 9, párr. 2), las cuales han sido sometidas a diferentes tipos de modificaciones que incluyen métodos químicos, por ejemplo con agentes que incluyen formaldehído, UDP-dialdehído, glutaraldehído, peróxido entre otros, los cuales actúan como agentes de entrecruzamiento químico, adecuados para inactivar completa o parcialmente las toxinas de *C. difficile*, reduciendo su toxicidad (Pág. 9, párr. 3); métodos recombinantes o de mutagénesis en el dominio N – terminal de la toxinas (es decir en el

dominio de glucosiltransferasa), en donde los residuos de ácido aspártico y/u otros residuos pueden ser mutados por ejemplo con una alanina en orden para reducir los efectos tóxicos de la toxina A, en las posiciones 269, 285 y 287, y B de *C. difficile*; y en la toxina B en las posiciones 286, 270, 273, 288 y 384 (Pág. 9, párr. 3). Adicionalmente se divulgan las metodologías para la producción de células recombinantes que codifican las toxinas mutantes A y B de *Clostridium difficile*, a partir de técnicas de biología molecular ampliamente conocidas en el estado del arte (Pág. 22, Ejemplo 3). Adicionalmente el documento D1 divulga anticuerpos que se unen y/o neutralizan la actividad biológica de las toxinas A o B o un fragmento de estas de *C. difficile* (Pág. 3, párr. 1 – 5), y una composición de anticuerpo que comprende una combinación de dos anticuerpos que se unen y/o neutralizan las toxinas A y B de *C. difficile* (Pág. 4, párr. 3).

Cabe resaltar que el documento D1 divulga la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 que caracteriza una variante inmunogénica de la toxina A, la cual presenta un 99% de identidad y 100% de cobertura (se muestra solo una parte del alineamiento), respecto a la SEQ ID NO: 1 de la solicitud.

Query: SEQ ID NO: 1 de D1
Sbjct: SEQ ID NO: 1 de la solicitud

Range 1: 1 to 2710		Graphics		▼ Next Match ▲ Previous Match	
Score	Expect	Method	Identities		Positives
5441 bits(14114)	0.0	Compositional matrix adjust.	2704/2710(99%)		2705/2710(99%)
			Gaps		0/2710(0%)
Query 1	MSLSISKEELTKLAYSIRPRENEYKTLTNLDEYNKLTNNNNENKYLQKKLNESIDVFMN		60		
Sbjct 1	MSLSISKEELTKLAYSIRPRENEYKTLTNLDEYNKLTNNNNENKYLQKKLNESIDVFMN		60		
Query 61	KYKTSRRNRALSRLKDKILKEVILKNSNTSPVEKNLHFVWIGGEVSIDALEYIKQADT		120		
Sbjct 61	KYKTSRRNRALSRLKDKILKEVILKNSNTSPVEKNLHFVWIGGEVSIDALEYIKQADT		120		
Query 121	NAEYNIKLWYDSEAFVNTLKKAIVESSTTEALQLLEEEIQNPQFDMNKFYKKRMEFIYD		180		
Sbjct 121	NAEYNIKLWYDSEAFVNTLKKAIVESSTTEALQLLEEEIQNPQFDMNKFYKKRMEFIYD		180		
Query 181	RQKRFINVYKQINPVTPTIDDIKSHLVSEVNRDETLESYRTNLSLRKINSNHGIDIR		240		
Sbjct 181	RQKRFINVYKQINPVTPTIDDIKSHLVSEVNRDETLESYRTNLSLRKINSNHGIDIR		240		
Query 241	ANSLFTEQELNIZYSQELNLRGNLAAASDIVRLALKNFGGVYLDVMDLPGIHSDFLKIT		300		
Sbjct 241	ANSLFTEQELNIZYSQELNLRGNLAAASDIVRLALKNFGGVYLDVMDLPGIHSDFLKIT		300		
Query 301	SRPSSIGLDRMEIKLEAIIKYYKVINNYTSENFQDLQQLKDNFKLIIESKSEKSEIFS		360		
Sbjct 301	SRPSSIGLDRMEIKLEAIIKYYKVINNYTSENFQDLQQLKDNFKLIIESKSEKSEIFS		360		
Query 361	KLENLNVSDLEIKIAFALGSVINQALISKQGSYLTNLVIEQVKHRYQFLNQHLNPAIESD		420		
Sbjct 361	KLENLNVSDLEIKIAFALGSVINQALISKQGSYLTNLVIEQVKHRYQFLNQHLNPAIESD		420		
Query 421	NNFTDTTKIFHDSLFNSATAENSMFLTKIAPYLQVGFMPPEARSTISLSGPGAYASAYDF		480		
Sbjct 421	NNFTDTTKIFHDSLFNSATAENSMFLTKIAPYLQVGFMPPEARSTISLSGPGAYASAYDF		480		
Query 481	INLQNTIEKTLKASDLIEFKFPENNLSQLTEQINSLHSFDQASAKYQFEKYVRDYTG		540		
Sbjct 481	INLQNTIEKTLKASDLIEFKFPENNLSQLTEQINSLHSFDQASAKYQFEKYVRDYTG		540		
Query 541	SLSEDNGVDFNKNTALDKNYLLNNKIPSNVVEEAGSKNYVHYIIQLQDDISYEATCNLF		600		
Sbjct 541	SLSEDNGVDFNKNTALDKNYLLNNKIPSNVVEEAGSKNYVHYIIQLQDDISYEATCNLF		600		
Query 601	SKNPKNSTIIQRNINWESAKSYFLSDDGESILELNKYRIPERLKNKEKVKVTFIIGHGKDEF		660		
Sbjct 601	SKNPKNSTIIQRNINWESAKSYFLSDDGESILELNKYRIPERLKNKEKVKVTFIIGHGKDEF		660		
Query 661	NTSEFARLSVDSLSEISSFLDTIKLDISPKNVEVNLGCMHFSYDFNVEETYPGKLLLS		720		
Sbjct 661	NTSEFARLSVDSLSEISSFLDTIKLDISPKNVEVNLGCMHFSYDFNVEETYPGKLLLS		720		
Query 721	IMDKITSTLPDVNKNSTIGANQYEVRIINSEGRKELLAHSGKWINKKEEAHSDLSKEYI		780		
Sbjct 721	IMDKITSTLPDVNKNSTIGANQYEVRIINSEGRKELLAHSGKWINKKEEAHSDLSKEYI		780		

En cuanto al documento D3 divulga un estudio para establecer la localización de la actividad proteasa en la toxina B de *C. difficile*, en donde se expresó el fragmento 1 – 955 aa no escindido. Sin embargo cuando se adicionó inositol hexafosfato (IP6), el fragmento de la toxina B, se escindió en dos partes. Este proceso fue bloqueado a través de la mutación de sitios activos putativos del dominio cisteína proteasa a este fragmento (Pág. 3393, Col. 2).

La diferencia entre la composición definida en la reivindicación 21 y la composición inmunogénica que comprende una toxina A mutante de *C. difficile* divulgada en el

documento D1 consiste en la mutación en el dominio de cisteína proteasa de la toxina A de *C. difficile*.

El efecto que logra el incluir una composición inmunogénica que comprenda una toxina A de *C. difficile* con una mutación en el dominio de cisteína proteasa, es inhibir la actividad proteolítica autocatalítica de la toxina disminuyendo su citotoxicidad, generando inmunogenicidad contra la infección ocasionada por *Clostridium difficile* (CDI).

Por lo tanto, el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: “Cómo proveer una composición inmunogénica que comprende una toxina A de *C. difficile* mutante, útil en el tratamiento contra la recurrencia de la infección generada por *Clostridium difficile* (CDI)”.

Sin embargo, el documento D3 divulga que el dominio proteasa localizado en la cercanía del extremo N – terminal del dominio glucosiltransferasa es el responsable de la escisión y el procesamiento de las toxinas A y B de *Clostridium difficile* (Pág. 3389, Col. 2). Adicionalmente evidencia que la escisión autocatalítica es generada en la región 544 – 955 del dominio cisteína proteasa (Pág.3393, Col. 2 – Pág. 3394, Col. 1), región en la cual se realizan la mayoría de las mutaciones reclamadas por la solicitante.

En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia, incluiría la sugerencia de mutar el dominio cisteína proteasa, para inhibir la actividad proteolítica autocatalítica de las toxinas de *Clostridium difficile*, divulgadas en el documento D3, en las composiciones de anticuerpo dirigidas contra las toxinas A y B de *Clostridium difficile* (Pág. 3, Párr. 5) divulgada en el documento D1, para llegar así al objeto de la reivindicación 21 de la solicitud, por lo cual se considera obvia.

En conclusión, la reivindicación 21 cumple el requisito de novedad (Art. 16), pero no cumple con el requisito de nivel inventivo (Art. 18).

Las reivindicaciones dependientes 22 - 54, 59 - 123 no mencionan características inventivas adicionales para la composición inmunogénica de la reivindicación 21, por lo cual se considera que tampoco tienen nivel inventivo.

Análisis de patentabilidad para el grupo inventivo III.

La reivindicación 130 consiste en “*Un anticuerpo o fragmento de unión del anticuerpo de este que comprende las secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de complementariedad de la cadena pesada (CDR) expuesta en la SEQ ID NO: 41 (CDR H1), SEQ ID NO: 42 (CDR H2) y SEQ ID NO: 43 (CDR H3), y las secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena liviana se muestran en las SEQ ID NO: 38 (CDR L1), SEQ ID NO: 39 (CDR L2) y SEQ ID NO: 40 (CDR L3)*” (13 - 0252702 - 00000-0000)

Comparación de las características técnicas esenciales, con las del estado de la técnica:

Características esenciales	D4	D1
Anticuerpo o fragmento de unión del anticuerpo de este	Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (Pág. 58,	Composición de anticuerpo que se une al menos a una toxina de C.

	Rv. 26 - 34)	<i>difficile</i> (Pág. 41, Rv. 3)
CDRs de cadena pesada según las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 41 (CDR H1), SEQ ID NO: 42 (CDR H2) y SEQ ID NO: 43 (CDR H3).	Región variable de cadena pesada que comprende uno o más CDRs que al menos son 80% idénticos a las SEQ ID Nos: 7 - 15 (Pág. 58, Rv. 27)	No registra
CDRs de cadena ligera según las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 38 (CDR L1), SEQ ID NO: 39 (CDR L2) y SEQ ID NO: 40 (CDR L3)	Región variable de cadena ligera que comprende uno o más CDRs que al menos son 80% idénticos a las SEQ ID Nos: 16 – 24 (Pág. 58, Rv. 28)	No registra

El documento D4 se considera el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 130 puesto que divulga anticuerpos dirigidos contra las toxinas A y B de *C. difficile*, útiles en la prevención de una enfermedad primaria causada por la infección de *C. difficile* (Pág. 3, párr. 1).

En cuanto al documento D1 divulgan anticuerpos que se unen y/o neutralizan la actividad biológica de las toxinas A o B o un fragmento de estas de *C. difficile* (Pág. 3, párr. 1 – 5), y una composición de anticuerpo que comprende una combinación de dos anticuerpos que se unen y/o neutralizan las toxinas A y B de *C. difficile* (Pág. 4, párr. 3).

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 130 y el anticuerpo o fragmento de unión del anticuerpo de este divulgada en el documento D4 consiste en las secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de complementariedad CDRs que caracterizan las regiones hipervariables de la cadena ligera y de la cadena pesada del anticuerpo dirigido contra una toxina de *C. difficile*.

No hay evidencia de avances o ventajas asociadas al diseño de un anticuerpo dirigido contra una toxina de *C. difficile*, divulgado en la presente solicitud, debido a que el documento D5 divulga anticuerpos que neutralizan las toxinas de *C. difficile*, con los cuales se realizaron ensayos *in vitro* que miden la capacidad del anticuerpo para inhibir un efecto citopático (CPE) sobre cultivos celulares (Pág. 44, Ejemplo 3), y ensayos *in vivo* que demuestran la neutralización de la enterotoxigenicidad de las toxinas de *C. difficile* (Pág. 46, Ejemplo 6), por lo cual se considera que la solicitud se limita a proveer anticuerpos dirigidos contra una toxina de *C. difficile* alternativos, obvios a partir de las enseñanzas del documento D5.

Por lo tanto, el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: “Cómo proveer un anticuerpo dirigido contra una toxina de *C. difficile*, que neutralice la citotoxicidad de las toxinas de *C. difficile in vitro*, y/o neutralice la enterotoxigenicidad de las toxinas de *C. difficile in vivo* alternativo, útil en el tratamiento de la infección generada por *Clostridium difficile* (CDI)”.

Sin embargo, el documento D1 divulga anticuerpos que se unen y/o neutralizan la actividad biológica de las toxinas A o B o un fragmento de estas de *C. difficile* (Pág. 3, párr. 1 – 5), y variantes inmunogénicas de las toxinas de *C. difficile* (Pág. 9, párr. 2), las cuales han sido sometidas a diferentes tipos de modificaciones que incluyen métodos químicos, por ejemplo con agentes que incluyen formaldehído, UDP-dialdehído, glutaraldehído, peróxido entre otros, los cuales actúan como agentes de entrecruzamiento químico, adecuados para

inactivar completa o parcialmente las toxinas de *C. difficile*, reduciendo su toxicidad (Pág. 9, párr. 3).

En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia, incluiría las enseñanzas para desarrollar un anticuerpo que se une y/o neutraliza la actividad biológica de las toxinas A o B o un fragmento de estas de *C. difficile* (Pág. 3, párr. 1 – 5), divulgadas en el documento D1, en el procedimiento divulgado en el documento D4, para llegar así al objeto de la reivindicación 130 de la solicitud, por lo cual se considera obvia.

En conclusión, la reivindicación 130 cumple el requisito de novedad (Art. 16), pero no cumple con el requisito de nivel inventivo (Art. 18).

Las reivindicaciones dependientes 131 – 138 no mencionan características inventivas adicionales para el anticuerpo de la reivindicación 130, por lo cual se considera que tampoco tienen nivel inventivo.

10. Conclusión

Los requisitos de Patentabilidad de la presente solicitud están afectados así:

	Documento	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D1	WO2010094970	1 – 123, 128 - 138	Novedad/ Nivel inventivo
D2	US 20110053244	1 – 11, 55 - 58	Nivel inventivo
D3	Egerer M. <i>et al.</i> , 2009. <i>The Journal of Biological Chemistry</i>	1 – 54, 59 - 123	Nivel inventivo
D4	WO 2006121422 A2	130 - 138	Nivel inventivo
D5	US 20050020506	12 - 20	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 sesenta (60) días contados a partir del día siguiente 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.

Se invita al solicitante se sirva indicar, si así lo considera, su renuncia al término faltante de sesenta (60) días para dar respuesta a este requerimiento y presentarla por escrito.

Finalmente, se le recuerda al solicitante que si como respuesta a este requerimiento llegara a modificar el capítulo reivindicatorio y éste contenga más de diez (10) reivindicaciones, no pagará la tasa de modificación voluntaria pero sí la correspondiente al pago por reivindicación adicional.

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 No. 10 de 2001.



JOSÉ LUIS SALAZAR LÓPEZ
Director de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha 2015-10-20

Elaboró: Mario Andres Forero

Revisó: Dayron Alexander Ramirez Reyes

INFORME DE BÚSQUEDA DE PATENTES PARA EL Radicado N° 13-0252702-00000-0000						
CRITERIOS PARA LA BÚSQUEDA (anexar pantallazo o reporte en PDF, junto con los boleanos utilizados)						
Palabras clave utilizadas		Composición <i>Clostridium difficile</i> , toxina A y toxina B, genes tcdA y tcdB, infecciones con <i>Clostridium difficile</i> (CDI), dominio de glucosiltransferasa, dominio de cisteína proteasa, EDC y NHS				
CLASIFICACIONES INTERNACIONALES UTILIZADAS PARA LA BÚSQUEDA		A61K38/47; C12N5/07; C12N9/26				
BASES DE DATOS CONSULTADAS.						
Patentscope		Google/patents				
NCBI		PatBase				
Espacenet		Epoquenet				
Lens		Sciencedirect				
INFORMES DE EXÁMENES REALIZADOS EN OTRAS OFICINAS (documentos patentes, literatura no patente etc...)						
Oficina	Fecha del examen o de reporte de búsqueda de documentos	Anterioridades encontradas para el examen o reportados en el examen de búsqueda(relacionarlos todos)	Reiv. afectadas	RELEVANCIA (requisito que afecta)	FUERON TENIDOS EN CUENTA PARA EL EXAMEN EN LA OFICINA COLOMBIANA	
					SI	NO
EUROPEAN SEARCH REPORT EPO	26/Julio/2012	WO2010/094970	128, 129. 133, 134 1 - 151	Novedad/ Nivel inventivo	X	
		US2011/053244	1 - 151	Nivel inventivo	X	
		WO2011/068953	Documento fuera de la fecha de prioridad	-		X
		Egerer M. et al., 2009. "Autocatalytic Processing of <i>Clostridium difficile</i> Toxin B Binding of Inositol Hexakisphosphate"	1 - 151	Nivel inventivo	X	
		Teichert el al., 2006. "Application of mutated <i>Clostridium difficile</i> Toxin A for Determination of Glucosyltransferase – Dependent Effects"	1 - 151	Nivel inventivo		X
		US2004/028705	1 - 151	Nivel inventivo		X
DOCUMENTOS ADICIONALES ENCONTRADOS POR EL EXAMINADOR DE ACUERDO A LOS CRITERIOS DE BÚSQUEDA						
US20030129198						
WO 2006121422						
WO8602362						
US2003054493						
US5773000						
US5919463						
US200413760						
US2008089904						
US6013635						
US 20050020506						
BÚSQUEDA DE SECUENCIAS						
Número de depósito / patente y N° de secuencia % de identidad						
SEQ ID NO	NCBI	The Lens	EMBL-EBI	DDJB	Genome Quest	

(de la solicitud)					
SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 1 de WO2010/094970 presenta un 99% de identidad y 100% de cobertura con la SEQ ID NO 1				
SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 3 de US 20110053244 presenta un 99% de identidad con la SEQ ID NO: 4				
	SEQ ID NO: 1 de WO2010/094970 presenta un 99% de identidad y 100% de cobertura con la SEQ ID NO 4.				
SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 2 de WO2010/094970 presenta un 99% de identidad y 100% de cobertura con la SEQ ID NO 4				
SEQ ID NO: 29	Secuencia gbIEQJ25746.1				

Búsqueda de Secuencias

SEQ ID NO: 4

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

[Alignments](#) [Download](#) [GenPept](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [Multiple alignment](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐ Sequence 4 from patent US 8481692	9107	9107	100%	0.0	100%	AGU08326.1
☐ Sequence 83 from patent US 8481692	9102	9102	99%	0.0	100%	AGU08387.1
☐ Sequence 3 from patent US 8481692	9102	9102	100%	0.0	99%	AGU08325.1
☐ Sequence 1 from patent US 8481692	9094	9094	100%	0.0	99%	AGU08323.1
☐ Sequence 151 from patent US 8481692	9089	9089	100%	0.0	99%	AGU08455.1
☐ Sequence 88 from patent US 8481692	9085	9085	100%	0.0	99%	AGU08392.1
☐ Sequence 7 from patent US 8481692	9085	9085	100%	0.0	99%	AGU08329.1
☐ Sequence 14 from patent US 8906635	9083	9083	100%	0.0	99%	AJN72079.1
☐ Sequence 98 from patent US 8481692	9083	9083	100%	0.0	99%	AGU08402.1
☐ Sequence 85 from patent US 8481692	9080	9080	99%	0.0	99%	AGU08389.1

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

[Alignments](#) [Download](#) [GenPept](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [Multiple alignment](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐ peptidase C80 [Peptoclostridium difficile]	9094	9094	100%	0.0	99%	WP_011860904.1
☐ toxin B [Peptoclostridium difficile]	9085	9085	100%	0.0	99%	WP_021377821.1
☐ toxin B [Peptoclostridium difficile]	9083	9083	100%	0.0	99%	WP_021404260.1
☐ toxin A [Peptoclostridium difficile]	9082	9082	100%	0.0	99%	AGG91571.1
☐ toxin B [Peptoclostridium difficile]	9075	9075	100%	0.0	99%	WP_021393724.1
☐ toxin A [Peptoclostridium difficile]	9075	9075	100%	0.0	99%	AGG91562.1
☐ peptidase C80 [Peptoclostridium difficile]	9072	9072	100%	0.0	99%	WP_009902072.1
☐ toxin B [Peptoclostridium difficile]	9069	9069	100%	0.0	99%	WP_021401850.1
☐ toxin A [Peptoclostridium difficile]	9069	9069	100%	0.0	99%	AGG91538.1
☐ toxin A [Peptoclostridium difficile]	9068	9068	100%	0.0	99%	AGG91507.1

SEQ ID NO: 7

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) [Selected 0](#)

Alignments							
Download GenPept Graphics Distance tree of results Multiple alignment							
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	peptidase C80 [Peptoclostridium difficile]	9072	9072	100%	0.0	99%	WP_011860904.1
☐	toxin B [Peptoclostridium difficile]	9063	9063	100%	0.0	99%	WP_021377821.1
☐	toxin B [Peptoclostridium difficile]	9060	9060	100%	0.0	99%	WP_021404260.1
☐	toxin A [Peptoclostridium difficile]	9059	9059	100%	0.0	99%	AGG91571.1
☐	toxin B [Peptoclostridium difficile]	9053	9053	100%	0.0	99%	WP_021393724.1
☐	toxin A [Peptoclostridium difficile]	9053	9053	100%	0.0	99%	AGG91562.1
☐	peptidase C80 [Peptoclostridium difficile]	9049	9049	100%	0.0	99%	WP_009902072.1
☐	toxin B [Peptoclostridium difficile]	9046	9046	100%	0.0	99%	WP_021401850.1
☐	toxin A [Peptoclostridium difficile]	9046	9046	100%	0.0	99%	AGG91538.1
☐	toxin A [Peptoclostridium difficile]	9046	9046	100%	0.0	99%	AGG91507.1

SEQ ID NO: 6

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments							
Download GenPept Graphics Distance tree of results Multiple alignment							
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Sequence 4 from patent US 8481692	5453	5453	100%	0.0	100%	AGU08326.1
☐	Sequence 3 from patent US 8481692	5452	5452	100%	0.0	99%	AGU08325.1
☐	Sequence 83 from patent US 8481692	5451	5451	100%	0.0	100%	AGU08387.1
☐	Sequence 7 from patent US 8420352	5444	5444	100%	0.0	99%	AGM57432.1
☐	Sequence 1 from patent US 8481692	5442	5442	100%	0.0	99%	AGU08323.1
☐	Sequence 85 from patent US 8481692	5439	5439	100%	0.0	99%	AGU08389.1
☐	Sequence 7 from patent US 8481692	5439	5439	100%	0.0	99%	AGU08329.1
☐	Sequence 88 from patent US 8481692	5439	5439	100%	0.0	99%	AGU08392.1
☐	Sequence 100 from patent US 8481692	5439	5439	100%	0.0	99%	AGU08404.1
☐	Sequence 98 from patent US 8481692	5437	5437	100%	0.0	99%	AGU08402.1
☐	Sequence 14 from patent US 8906635	5437	5437	100%	0.0	99%	AJN72079.1
☐	Sequence 150 from patent US 8481692	5437	5437	100%	0.0	99%	AGU08454.1
☐	Sequence 151 from patent US 8481692	5435	5435	100%	0.0	99%	AGU08455.1
☐	Sequence 107 from patent US 8481692	5435	5435	100%	0.0	99%	AGU08411.1
☐	Sequence 41 from patent US 7625559	5435	5435	100%	0.0	99%	ADA49476.1
☐	Sequence 92 from patent US 8481692	5434	5434	100%	0.0	99%	AGU08396.1
☐	Sequence 136 from patent US 8481692	5430	5430	100%	0.0	99%	AGU08440.1

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments							
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	peptidase C80 [Peptoclostridium difficile]	5442	5442	100%	0.0	99%	WP_011860904.1
☐	toxin A [Peptoclostridium difficile]	5440	5440	100%	0.0	99%	AGG91571.1
☐	toxin B [Peptoclostridium difficile]	5439	5439	100%	0.0	99%	WP_021377821.1
☐	toxin A [Peptoclostridium difficile]	5439	5439	100%	0.0	99%	AGG91562.1
☐	toxin B [Peptoclostridium difficile]	5437	5437	100%	0.0	99%	WP_021404260.1
☐	peptidase C80 [Peptoclostridium difficile]	5435	5435	100%	0.0	99%	WP_009902072.1
☐	toxin B [Peptoclostridium difficile]	5434	5434	100%	0.0	99%	WP_021401850.1
☐	toxin A [Peptoclostridium difficile]	5434	5434	100%	0.0	99%	AGG91507.1
☐	toxin B [Peptoclostridium difficile]	5432	5432	100%	0.0	99%	WP_021393724.1
☐	toxin B [Peptoclostridium difficile]	5430	5430	100%	0.0	99%	WP_021394767.1
☐	RecName: Full=Toxin A	5430	5430	100%	0.0	99%	P18154.2
☐	toxin A [Peptoclostridium difficile]	5429	5429	100%	0.0	99%	AGG91538.1
☐	toxin B [Peptoclostridium difficile]	5423	5423	100%	0.0	99%	WP_021398198.1
☐	toxin B [Peptoclostridium difficile]	5420	5420	100%	0.0	99%	WP_021381384.1
☐	toxin B [Peptoclostridium difficile]	5370	5370	100%	0.0	99%	WP_021422924.1
☐	toxin B [Peptoclostridium difficile]	5370	5370	100%	0.0	99%	WP_021377621.1
☐	TcdA [Clostridium] difficile]	5365	5365	100%	0.0	98%	AFN52237.1
☐	peptidase C80 [Peptoclostridium difficile]	5352	5352	100%	0.0	98%	WP_045146032.1

SEQ ID NO: 84

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenPept Graphics Distance tree of results Multiple alignment						
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident Accession
☐	toxin B [Peptoclostridium difficile]	4749	4749	100%	0.0	99% WP_009902069.1
☐	toxin B [Peptoclostridium difficile]	4748	4748	100%	0.0	99% WP_009895693.1
☐	toxin B [Peptoclostridium difficile]	4746	4746	100%	0.0	99% WP_021363304.1
☐	Toxin B [Peptoclostridium difficile]	4746	4746	100%	0.0	99% WP_022620617.1
☐	toxin B [Peptoclostridium difficile]	4746	4746	100%	0.0	99% WP_021377046.1
☐	toxin B [Peptoclostridium difficile]	4746	4746	100%	0.0	99% WP_021380256.1
☐	peptidase C80 [Peptoclostridium difficile]	4745	4745	100%	0.0	99% WP_003434531.1
☐	toxin B [Peptoclostridium difficile]	4745	4745	100%	0.0	99% WP_021405616.1
☐	toxin B [Peptoclostridium difficile]	4745	4745	100%	0.0	99% WP_021402343.1
☐	toxin B [Peptoclostridium difficile]	4744	4744	100%	0.0	99% WP_021403734.1
☐	toxin B [Peptoclostridium difficile]	4744	4744	100%	0.0	99% WP_021370125.1
☐	toxin B [Peptoclostridium difficile]	4744	4744	100%	0.0	99% AGG91599.1
☐	toxin B [Peptoclostridium difficile]	4743	4743	100%	0.0	99% WP_021378956.1
☐	toxin B [Peptoclostridium difficile]	4743	4743	100%	0.0	99% WP_021371861.1
☐	toxin B [Peptoclostridium difficile]	4741	4741	100%	0.0	99% WP_021418106.1
☐	toxin B [Peptoclostridium difficile]	4736	4736	100%	0.0	99% WP_021424365.1
☐	toxin B [Peptoclostridium difficile]	4734	4734	100%	0.0	99% WP_021417070.1
☐	toxin B [Peptoclostridium difficile]	4734	4734	100%	0.0	99% WP_021418418.1

SEQ ID NO: 86

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenPept Graphics Distance tree of results Multiple alignment						
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident Accession
☐	Sequence 86 from patent US 8481692	4760	4760	100%	0.0	100% AGU08390.1
☐	Sequence 8 from patent US 8481692	4760	4760	100%	0.0	100% AGU08330.1
☐	Sequence 5 from patent US 8420352	4756	4756	100%	0.0	99% AGM57430.1
☐	Sequence 6 from patent US 8481692	4752	4752	100%	0.0	99% AGU08328.1
☐	Sequence 84 from patent US 8481692	4749	4749	100%	0.0	99% AGU08388.1
☐	Sequence 5 from patent US 8481692	4748	4748	100%	0.0	99% AGU08327.1
☐	Sequence 15 from patent US 8431361	4745	4745	100%	0.0	99% AGN86390.1
☐	Sequence 1 from patent US 8420352	4744	4744	100%	0.0	99% AGM57426.1
☐	Sequence 10 from patent US 5736139	4741	4741	100%	0.0	99% AAC84217.1
☐	Sequence 111 from patent US 8481692	4740	4740	100%	0.0	99% AGU08415.1
☐	Sequence 160 from patent US 8481692	4737	4737	100%	0.0	99% AGU08464.1
☐	Sequence 131 from patent US 8481692	4737	4737	100%	0.0	99% AGU08435.1
☐	Sequence 115 from patent US 8481692	4737	4737	100%	0.0	99% AGU08419.1
☐	Sequence 142 from patent US 8481692	4736	4736	100%	0.0	99% AGU08446.1
☐	Sequence 14 from patent US 8431361	4736	4736	100%	0.0	99% AGN86389.1
☐	Sequence 143 from patent US 8481692	4735	4735	100%	0.0	99% AGU08447.1
☐	Sequence 114 from patent US 8481692	4735	4735	100%	0.0	99% AGU08418.1
☐	Sequence 120 from patent US 8481692	4735	4735	100%	0.0	99% AGU08424.1
☐	Sequence 146 from patent US 8481692	4732	4732	100%	0.0	99% AGU08450.1

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenPept Graphics Distance tree of results Multiple alignment						
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident Accession
☐	toxin B [Peptoclostridium difficile]	4741	4741	100%	0.0	99% WP_009902069.1
☐	toxin B [Peptoclostridium difficile]	4740	4740	100%	0.0	99% WP_009895693.1
☐	toxin B [Peptoclostridium difficile]	4738	4738	100%	0.0	99% WP_021377046.1
☐	toxin B [Peptoclostridium difficile]	4738	4738	100%	0.0	99% WP_021380256.1
☐	peptidase C80 [Peptoclostridium difficile]	4737	4737	100%	0.0	99% WP_003434531.1
☐	toxin B [Peptoclostridium difficile]	4737	4737	100%	0.0	99% WP_021405616.1
☐	toxin B [Peptoclostridium difficile]	4737	4737	100%	0.0	99% WP_021363304.1
☐	toxin B [Peptoclostridium difficile]	4736	4736	100%	0.0	99% WP_021403734.1
☐	Toxin B [Peptoclostridium difficile]	4735	4735	100%	0.0	99% WP_022620617.1
☐	toxin B [Peptoclostridium difficile]	4735	4735	100%	0.0	99% WP_021378956.1
☐	toxin B [Peptoclostridium difficile]	4735	4735	100%	0.0	99% WP_021402343.1
☐	toxin B [Peptoclostridium difficile]	4735	4735	100%	0.0	99% AGG91599.1
☐	toxin B [Peptoclostridium difficile]	4735	4735	100%	0.0	99% WP_021370125.1
☐	toxin B [Peptoclostridium difficile]	4734	4734	100%	0.0	99% WP_021371861.1
☐	toxin B [Peptoclostridium difficile]	4732	4732	100%	0.0	99% WP_021418106.1
☐	toxin B [Peptoclostridium difficile]	4728	4728	100%	0.0	99% WP_021424365.1
☐	toxin B [Peptoclostridium difficile]	4726	4726	100%	0.0	99% WP_021417070.1
☐	toxin B [Peptoclostridium difficile]	4726	4726	100%	0.0	99% WP_021380236.1
☐	toxin B [Peptoclostridium difficile]	4724	4724	100%	0.0	99% WP_021418418.1

SEQ ID NO: 29

tcdA/TcdB pore forming domain protein [Clostridium difficile P15]

Sequence ID: [gb|EJQJ25746.1|](#) Length: 1156 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 542			GenPept	Graphics			▼ Next Match	▲ Previous Match
Score	Expect	Method	Identities		Positives		Gaps	
1096 bits(2835)	0.0	Compositional matrix adjust.	542/542(100%)		542/542(100%)		0/542(0%)	
Query	1	MSLSKEELIKLAYSIRPRENEYKTLTNLDEYNKLTNNNENKYLQKKLNESIDVFMN						60
Sbjct	1	MSLSKEELIKLAYSIRPRENEYKTLTNLDEYNKLTNNNENKYLQKKLNESIDVFMN						60
Query	61	KYKTSRRNRLSNLKKDILKEVILIKNSNTSPVEKNLHFVWIGGEVSDIALEYIKQWADI						120
Sbjct	61	KYKTSRRNRLSNLKKDILKEVILIKNSNTSPVEKNLHFVWIGGEVSDIALEYIKQWADI						120
Query	121	NAEYNIKLWYDEAFVLNTLKKAIVESSTTEALQLLEEIQNPQFDNMKFYKKRMEFIYD						180
Sbjct	121	NAEYNIKLWYDEAFVLNTLKKAIVESSTTEALQLLEEIQNPQFDNMKFYKKRMEFIYD						180
Query	181	RQKRFINYYKSQINKPTVPTIDDIKSHLVSEYNRDETVLSEYRTNSLRKINSNHHGIDIR						240
Sbjct	181	RQKRFINYYKSQINKPTVPTIDDIKSHLVSEYNRDETVLSEYRTNSLRKINSNHHGIDIR						240
Query	241	ANSLFTEQELLNIYSQELLNRGNLAAASDIVRLALKNFQGVYLDVDMPLGIHSDLFKTI						300
Sbjct	241	ANSLFTEQELLNIYSQELLNRGNLAAASDIVRLALKNFQGVYLDVDMPLGIHSDLFKTI						300
Query	301	SRPSSIGLDRWEMIKLEAIMKYKYYINNYTSENFDKLDQQLKDNFKLIIESKSEKSEIFS						360
Sbjct	301	SRPSSIGLDRWEMIKLEAIMKYKYYINNYTSENFDKLDQQLKDNFKLIIESKSEKSEIFS						360
Query	361	KLENLNVSDLEIKIAFALGSVINQALISKQGSYLTNLVIEQVKNRYQFLNQHLNPAIESD						420
Sbjct	361	KLENLNVSDLEIKIAFALGSVINQALISKQGSYLTNLVIEQVKNRYQFLNQHLNPAIESD						420
Query	421	NNFTDTTKIFHDSLFSNSATAENSMPFLTKIAPYLQVGFMPPEARSTISLSPGGAYASAYDF						480
Sbjct	421	NNFTDTTKIFHDSLFSNSATAENSMPFLTKIAPYLQVGFMPPEARSTISLSPGGAYASAYDF						480
Query	481	INLQENTIETKLKASDLIEFKFPENNLSQLTQEINSLWSFPQASAKYQFEKYVRDYTG						540
Sbjct	481	INLQENTIETKLKASDLIEFKFPENNLSQLTQEINSLWSFPQASAKYQFEKYVRDYTG						540
Query	541	SL 542						
Sbjct	541	SL 542						

Búsqueda en PatBase

2) Family number: 1879665 (WO8602362A1)

Similar • Translate • Full-text • Status • Citations

Title: [EN] MONOCLONAL ANTIBODIES AND THEIR USE

Abstract: Source: WO8602362A1 [EN] Monoclonal antibodies to the genus **Clostridium**, the labelled antibodies **compositions** and kits containing them, and their use in diagnosis of antigen and treatment.

[FR] Anticorps monoclonaux pour le genre **Clostridium**, anticorps marqués **compositions** et kits les contenant, et leur utilisation pour le diagnostic et le traitement d'antigènes.

Classifications: [Classification Explorer](#)

International **pc+nc**: A61K38/00 C07K1/22 C07K14/005 C07K14/195 C07K14/41 C07K16/00 C07K16/12 C07K19/00 C12N15/00 C12N15/02 C12N5/10 C12P21/00 C12P21/08 C12Q1/00 G01N33/569 G01N33/577 [\(Advanced Invention\)](#);

A61K38/00 C12R1/145 C12R1/191 [\(Advanced Non-invention\)](#);

A61K39/00 C07K14/005 C07K14/005 C07K14/195 C07K14/41 C07K16/00 C07K16/12 C07K19/00 C12N15/00 C12N15/02 C12N5/00 C12P21/00 C12P21/08 C12Q1/00 G01N33/569 G01N33/577 [\(Core Non-invention\)](#);

A61K38/00 [\(Core Non-invention\)](#);

International **pc+nc**: A61K39/395 A61K39/40 C07K15/00 C07K15/04 C12N15/00 C12P21/00 C12Q1/00 C12R1/145 C12R1/191 G01N33/569 G01N33/577

CPC: C07K16/1282 A61K38/00 C07K16/12 C07K16/02 C07K16/06 C07K16/12 C07K16/18 C07K17/00 C07K19/00 C12N15/00 C12N15/02 C12N15/04 C12N15/06 C12P21/00 C12P21/08 C12Q1/00 C12R1/145 C12R1/191 G01N33/569 G01N33/577

European: C07K14/245 C07K14/33 C07K16/02 C07K16/06 C07K16/12 C07K16/18 C07K17/00 C07K19/00 C12N15/00 C12N15/02 C12N15/04 C12N15/06 C12P21/00 C12P21/08 C12Q1/00 C12R1/145 C12R1/191 G01N33/569 G01N33/577

Family: [Family Explorer](#)

Publication number	Publication date	Application number	Application date	Links
EP0198666 A1	19851029	EP1985095087	19851016	📄 🔗
GB8426464 A0	19841128	JP19840026464	19841019	📄 🔗
JP62500586 T2	19870312	JP19850504568T	19851016	📄 🔗
WO8602362 A1	19860424	WO19850800473	19851016	📄 🔗

Priority: [Priority Map](#)

GB19840026464 19841019

Probable Assignee: TECHNOLOGY LICENCE CO LTD

Assignee(s): [info](#): TECHNOLOGY LICENCE CO LTD

Assignee(s): TECHNOLOGY LICENCE COMPANY LIMITED

Inventor(s): [info](#): COX PETER JOHN; NOYES ALICE MARGARET; WIDDOWS DANNY; WRIGHT BRUCE WILLIAM; COX PETER JOHN CHURCH COTTAGE

Designated states: AT BE CH DE FR GB IT JP LU NL SE US 🇺🇸

5) Family number: 30005250 (US2003054493A)

Similar • Translate • Full-text • Status • Citations

Title: [EN] IDENTIFICATION OF NEUTRALIZING EPITOPES OF **TOXIN A** AND **TOXIN B** FOR THE TREATMENT OF C. **DIFFICILE** DISEASE

Abstract: Source: US2003054493A [EN] The present invention includes methods for generating neutralizing antitoxin directed against clostridial **toxins**. In particular, the antitoxin directed against these **toxins** is produced in avian species using soluble recombinant clostridial **toxin** proteins. This avian antitoxin is designed so as to be orally administrable in therapeutic amounts and may be in any form (i. e., as a solid or in aqueous solution). These antitoxins are useful in the treatment of humans and other animals inoculated with at least one bacterial **toxin**.

Classifications: [Classification Explorer](#)

International **pc+nc**: A61K38/00 A61K39/08 A61K39/16 A61K39/38 A61K39/395 A61K39/40 A61K39/42 A61K47/10 A61K47/12 A61K47/16 A61K47/17 A61K47/18 A61K47/19 A61K47/20 A61K47/21 A61K47/22 A61K47/23 A61K47/24 A61K47/25 A61K47/26 A61K47/27 A61K47/28 A61K47/29 A61K47/30 A61K47/31 A61K47/32 A61K47/33 A61K47/34 A61K47/35 A61K47/36 A61K47/37 A61K47/38 A61K47/39 A61K47/40 A61K47/41 A61K47/42 A61K47/43 A61K47/44 A61K47/45 A61K47/46 A61K47/47 A61K47/48 A61K47/49 A61K47/50 A61K47/51 A61K47/52 A61K47/53 A61K47/54 A61K47/55 A61K47/56 A61K47/57 A61K47/58 A61K47/59 A61K47/60 A61K47/61 A61K47/62 A61K47/63 A61K47/64 A61K47/65 A61K47/66 A61K47/67 A61K47/68 A61K47/69 A61K47/70 A61K47/71 A61K47/72 A61K47/73 A61K47/74 A61K47/75 A61K47/76 A61K47/77 A61K47/78 A61K47/79 A61K47/80 A61K47/81 A61K47/82 A61K47/83 A61K47/84 A61K47/85 A61K47/86 A61K47/87 A61K47/88 A61K47/89 A61K47/90 A61K47/91 A61K47/92 A61K47/93 A61K47/94 A61K47/95 A61K47/96 A61K47/97 A61K47/98 A61K47/99 A61K47/100 A61K47/101 A61K47/102 A61K47/103 A61K47/104 A61K47/105 A61K47/106 A61K47/107 A61K47/108 A61K47/109 A61K47/110 A61K47/111 A61K47/112 A61K47/113 A61K47/114 A61K47/115 A61K47/116 A61K47/117 A61K47/118 A61K47/119 A61K47/120 A61K47/121 A61K47/122 A61K47/123 A61K47/124 A61K47/125 A61K47/126 A61K47/127 A61K47/128 A61K47/129 A61K47/130 A61K47/131 A61K47/132 A61K47/133 A61K47/134 A61K47/135 A61K47/136 A61K47/137 A61K47/138 A61K47/139 A61K47/140 A61K47/141 A61K47/142 A61K47/143 A61K47/144 A61K47/145 A61K47/146 A61K47/147 A61K47/148 A61K47/149 A61K47/150 A61K47/151 A61K47/152 A61K47/153 A61K47/154 A61K47/155 A61K47/156 A61K47/157 A61K47/158 A61K47/159 A61K47/160 A61K47/161 A61K47/162 A61K47/163 A61K47/164 A61K47/165 A61K47/166 A61K47/167 A61K47/168 A61K47/169 A61K47/170 A61K47/171 A61K47/172 A61K47/173 A61K47/174 A61K47/175 A61K47/176 A61K47/177 A61K47/178 A61K47/179 A61K47/180 A61K47/181 A61K47/182 A61K47/183 A61K47/184 A61K47/185 A61K47/186 A61K47/187 A61K47/188 A61K47/189 A61K47/190 A61K47/191 A61K47/192 A61K47/193 A61K47/194 A61K47/195 A61K47/196 A61K47/197 A61K47/198 A61K47/199 A61K47/200 A61K47/201 A61K47/202 A61K47/203 A61K47/204 A61K47/205 A61K47/206 A61K47/207 A61K47/208 A61K47/209 A61K47/210 A61K47/211 A61K47/212 A61K47/213 A61K47/214 A61K47/215 A61K47/216 A61K47/217 A61K47/218 A61K47/219 A61K47/220 A61K47/221 A61K47/222 A61K47/223 A61K47/224 A61K47/225 A61K47/226 A61K47/227 A61K47/228 A61K47/229 A61K47/230 A61K47/231 A61K47/232 A61K47/233 A61K47/234 A61K47/235 A61K47/236 A61K47/237 A61K47/238 A61K47/239 A61K47/240 A61K47/241 A61K47/242 A61K47/243 A61K47/244 A61K47/245 A61K47/246 A61K47/247 A61K47/248 A61K47/249 A61K47/250 A61K47/251 A61K47/252 A61K47/253 A61K47/254 A61K47/255 A61K47/256 A61K47/257 A61K47/258 A61K47/259 A61K47/260 A61K47/261 A61K47/262 A61K47/263 A61K47/264 A61K47/265 A61K47/266 A61K47/267 A61K47/268 A61K47/269 A61K47/270 A61K47/271 A61K47/272 A61K47/273 A61K47/274 A61K47/275 A61K47/276 A61K47/277 A61K47/278 A61K47/279 A61K47/280 A61K47/281 A61K47/282 A61K47/283 A61K47/284 A61K47/285 A61K47/286 A61K47/287 A61K47/288 A61K47/289 A61K47/290 A61K47/291 A61K47/292 A61K47/293 A61K47/294 A61K47/295 A61K47/296 A61K47/297 A61K47/298 A61K47/299 A61K47/300 A61K47/301 A61K47/302 A61K47/303 A61K47/304 A61K47/305 A61K47/306 A61K47/307 A61K47/308 A61K47/309 A61K47/310 A61K47/311 A61K47/312 A61K47/313 A61K47/314 A61K47/315 A61K47/316 A61K47/317 A61K47/318 A61K47/319 A61K47/320 A61K47/321 A61K47/322 A61K47/323 A61K47/324 A61K47/325 A61K47/326 A61K47/327 A61K47/328 A61K47/329 A61K47/330 A61K47/331 A61K47/332 A61K47/333 A61K47/334 A61K47/335 A61K47/336 A61K47/337 A61K47/338 A61K47/339 A61K47/340 A61K47/341 A61K47/342 A61K47/343 A61K47/344 A61K47/345 A61K47/346 A61K47/347 A61K47/348 A61K47/349 A61K47/350 A61K47/351 A61K47/352 A61K47/353 A61K47/354 A61K47/355 A61K47/356 A61K47/357 A61K47/358 A61K47/359 A61K47/360 A61K47/361 A61K47/362 A61K47/363 A61K47/364 A61K47/365 A61K47/366 A61K47/367 A61K47/368 A61K47/369 A61K47/370 A61K47/371 A61K47/372 A61K47/373 A61K47/374 A61K47/375 A61K47/376 A61K47/377 A61K47/378 A61K47/379 A61K47/380 A61K47/381 A61K47/382 A61K47/383 A61K47/384 A61K47/385 A61K47/386 A61K47/387 A61K47/388 A61K47/389 A61K47/390 A61K47/391 A61K47/392 A61K47/393 A61K47/394 A61K47/395 A61K47/396 A61K47/397 A61K47/398 A61K47/399 A61K47/400 A61K47/401 A61K47/402 A61K47/403 A61K47/404 A61K47/405 A61K47/406 A61K47/407 A61K47/408 A61K47/409 A61K47/410 A61K47/411 A61K47/412 A61K47/413 A61K47/414 A61K47/415 A61K47/416 A61K47/417 A61K47/418 A61K47/419 A61K47/420 A61K47/421 A61K47/422 A61K47/423 A61K47/424 A61K47/425 A61K47/426 A61K47/427 A61K47/428 A61K47/429 A61K47/430 A61K47/431 A61K47/432 A61K47/433 A61K47/434 A61K47/435 A61K47/436 A61K47/437 A61K47/438 A61K47/439 A61K47/440 A61K47/441 A61K47/442 A61K47/443 A61K47/444 A61K47/445 A61K47/446 A61K47/447 A61K47/448 A61K47/449 A61K47/450 A61K47/451 A61K47/452 A61K47/453 A61K47/454 A61K47/455 A61K47/456 A61K47/457 A61K47/458 A61K47/459 A61K47/460 A61K47/461 A61K47/462 A61K47/463 A61K47/464 A61K47/465 A61K47/466 A61K47/467 A61K47/468 A61K47/469 A61K47/470 A61K47/471 A61K47/472 A61K47/473 A61K47/474 A61K47/475 A61K47/476 A61K47/477 A61K47/478 A61K47/479 A61K47/480 A61K47/481 A61K47/482 A61K47/483 A61K47/484 A61K47/485 A61K47/486 A61K47/487 A61K47/488 A61K47/489 A61K47/490 A61K47/491 A61K47/492 A61K47/493 A61K47/494 A61K47/495 A61K47/496 A61K47/497 A61K47/498 A61K47/499 A61K47/500 A61K47/501 A61K47/502 A61K47/503 A61K47/504 A61K47/505 A61K47/506 A61K47/507 A61K47/508 A61K47/509 A61K47/510 A61K47/511 A61K47/512 A61K47/513 A61K47/514 A61K47/515 A61K47/516 A61K47/517 A61K47/518 A61K47/519 A61K47/520 A61K47/521 A61K47/522 A61K47/523 A61K47/524 A61K47/525 A61K47/526 A61K47/527 A61K47/528 A61K47/529 A61K47/530 A61K47/531 A61K47/532 A61K47/533 A61K47/534 A61K47/535 A61K47/536 A61K47/537 A61K47/538 A61K47/539 A61K47/540 A61K47/541 A61K47/542 A61K47/543 A61K47/544 A61K47/545 A61K47/546 A61K47/547 A61K47/548 A61K47/549 A61K47/550 A61K47/551 A61K47/552 A61K47/553 A61K47/554 A61K47/555 A61K47/556 A61K47/557 A61K47/558 A61K47/559 A61K47/560 A61K47/561 A61K47/562 A61K47/563 A61K47/564 A61K47/565 A61K47/566 A61K47/567 A61K47/568 A61K47/569 A61K47/570 A61K47/571 A61K47/572 A61K47/573 A61K47/574 A61K47/575 A61K47/576 A61K47/577 A61K47/578 A61K47/579 A61K47/580 A61K47/581 A61K47/582 A61K47/583 A61K47/584 A61K47/585 A61K47/586 A61K47/587 A61K47/588 A61K47/589 A61K47/590 A61K47/591 A61K47/592 A61K47/593 A61K47/594 A61K47/595 A61K47/596 A61K47/597 A61K47/598 A61K47/599 A61K47/600 A61K47/601 A61K47/602 A61K47/603 A61K47/604 A61K47/605 A61K47/606 A61K47/607 A61K47/608 A61K47/609 A61K47/610 A61K47/611 A61K47/612 A61K47/613 A61K47/614 A61K47/615 A61K47/616 A61K47/617 A61K47/618 A61K47/619 A61K47/620 A61K47/621 A61K47/622 A61K47/623 A61K47/624 A61K47/625 A61K47/626 A61K47/627 A61K47/628 A61K47/629 A61K47/630 A61K47/631 A61K47/632 A61K47/633 A61K47/634 A61K47/635 A61K47/636 A61K47/637 A61K47/638 A61K47/639 A61K47/640 A61K47/641 A61K47/642 A61K47/643 A61K47/644 A61K47/645 A61K47/646 A61K47/647 A61K47/648 A61K47/649 A61K47/650 A61K47/651 A61K47/652 A61K47/653 A61K47/654 A61K47/655 A61K47/656 A61K47/657 A61K47/658 A61K47/659 A61K47/660 A61K47/661 A61K47/662 A61K47/663 A61K47/664 A61K47/665 A61K47/666 A61K47/667 A61K47/668 A61K47/669 A61K47/670 A61K47/671 A61K47/672 A61K47/673 A61K47/674 A61K47/675 A61K47/676 A61K47/677 A61K47/678 A61K47/679 A61K47/680 A61K47/681 A61K47/682 A61K47/683 A61K47/684 A61K47/685 A61K47/686 A61K47/687 A61K47/688 A61K47/689 A61K47/690 A61K47/691 A61K47/692 A61K47/693 A61K47/694 A61K47/695 A61K47/696 A61K47/697 A61K47/698 A61K47/699 A61K47/700 A61K47/701 A61K47/702 A61K47/703 A61K47/704 A61K47/705 A61K47/706 A61K47/707 A61K47/708 A61K47/709 A61K47/710 A61K47/711 A61K47/712 A61K47/713 A61K47/714 A61K47/715 A61K47/716 A61K47/717 A61K47/718 A61K47/719 A61K47/720 A61K47/721 A61K47/722 A61K47/723 A61K47/724 A61K47/725 A61K47/726 A61K47/727 A61K47/728 A61K47/729 A61K47/730 A61K47/731 A61K47/732 A61K47/733 A61K47/734 A61K47/735 A61K47/736 A61K47/737 A61K47/738 A61K47/739 A61K47/740 A61K47/741 A61K47/742 A61K47/743 A61K47/744 A61K47/745 A61K47/746 A61K47/747 A61K47/748 A61K47/749 A61K47/750 A61K47/751 A61K47/752 A61K47/753 A61K47/754 A61K47/755 A61K47/756 A61K47/757 A61K47/758 A61K47/759 A61K47/760 A61K47/761 A61K47/762 A61K47/763 A61K47/764 A61K47/765 A61K47/766 A61K47/767 A61K47/768 A61K47/769 A61K47/770 A61K

7) Family number: 10995359 (US5773000A)

Similar • Translate • Full-text • Status • Citations

Title: [EN] THERAPEUTIC TREATMENT OF **CLOSTRIDIUM DIFFICILE** ASSOCIATED DISEASES

Abstract: Source: US5773000A [EN] The effective treatment of **Clostridium difficile** associated diseases, such as **Clostridium difficile** colitis, pseudomembranous colitis and antibiotic associated diarrhea, by administering an antibody having specific activity against **Clostridium difficile** colitis and **toxins** thereof alone or in combination with vancomycin, bacitracin or metronidazole is herein described as well as pharmaceutical **compositions** therefor.

Classifications: Classification Explorer

International (pc-8): A61K31/415 A61K31/70 A61K38/00 A61K38/08 A61K38/12 A61K39/35 A61K39/40 A61K9/02 A61K9/20 A61K9/48 A61P1/00 A61P31/04 A61P43/00 C07K16/12 (Advanced/Invention); A61K31/415 A61K31/70 A61K38/00 A61K39/35 A61K9/02 A61K9/20 A61K9/48 A61P1/00 A61P43/00 (Advanced/Non-invention); A61K31/415 A61K31/70 A61K38/00 A61K38/08 A61K38/12 A61K39/35 A61K39/40 A61K9/02 A61K9/20 A61K9/48 A61P1/00 A61P31/00 A61P43/00 C07K16/12 (Core/Invention); A61K38/00 (Core/Non-invention)

International (pc-1-7): A61K31/415 A61K31/70 A61K38/00 A61K38/08 A61K38/12 A61K39/35 A61K39/40 A61K45/06 A61K9/02 A61K9/20 A61K9/48 C07K16/12

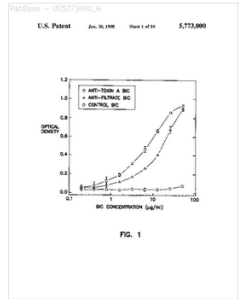
CPC: C07K16/1282 A61K38/08 A61K38/12 A61K39/40

European: A61K38/08 A61K38/12 A61K39/40 C07K16/12B16 K61K38/00

US: 424/130.1 424/150.1 424/164.1 424/167.1 530/387.1 530/388.4 530/389.5

Family: Family Explorer

Publication number	Publication date	Application number	Application date	Links
AU199533258 A1	19960327	AU19950033258	19950814	 
AU702405 B2	19990218	AU19950033258	19950814	 
CA2197714 AA	19970214	CA19952197714	19950814	 
EP0779819 A1	19970625	EP19950925929	19950814	 
JP10505358 T2	19980526	JP19960509507T	19950814	 
MX9701683 A1	19970628	MX19970001683	19970305	 
NZ291659 A	20010427	NZ19950291659	19950814	 
US5773000 A	19980630	US19960730437	19961015	 
WO9607430 A1	19960314	WO1995US10335	19950814	 



10) Family number: 8761874 (US5919463A)

Similar • Translate • Full-text • Status • Citations

Title: [EN] **CLOSTRIDIUM DIFFICILE** **TOXINS** AS MUCOSAL ADJUVANTS

Abstract: Source: US5919463A [EN] The invention features methods and **compositions** for inducing protective and/or therapeutic immune responses to an antigen in a mammal. In these methods, an antigen is administered to the mammal with a **toxin** (e.g., C. **difficile**), or a fragment or derivative thereof having adjuvant activity.

Classifications: Classification Explorer

International (pc-8): A61K35/74 A61K39/00 A61K39/08 A61K39/10 A61K39/106 A61K39/385 A61K39/39 A61P31/04 A61P37/04 C07K14/33 (Advanced/Invention); A61K35/65 A61K39/00 A61K39/10 A61K39/106 A61K39/39 A61P31/00 A61P37/00 C07K14/195 (Core/Invention)

International (pc-1-7): A01N37/18 A61K A61K35/74 A61K38/00 A61K38/46 A61K39/00 A61K39/02 A61K39/08 A61K39/106 A61K39/385 A61K39/39 C07K C07K2/00 C12N

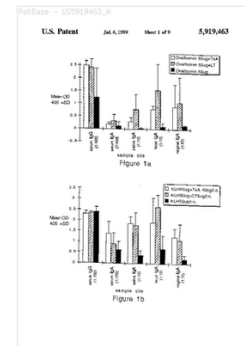
CPC: Y105530/825 A61K39/39 A61K2039/541 A61K2039/55544 C07K14/33

European: A61K39/39 C07K14/33 K61K39/544 K61K39/55563

US: 424/184.1 424/192.1 424/234.1 424/236.1 424/239.1 424/247.1 424/278.1 424/94.6 424/946.514/2 514/2 530/300 530/350 530/825

Family: Family Explorer

Publication number	Publication date	Application number	Application date	Links
AT195878 E	20000915	AT19960923569T	19960701	 
AU199664047 A1	19970210	AU19960064047	19960701	 
AU720567 B2	20000608	AU19960064047	19960701	 
CA2226339 AA	19980106	CA19962226339	19960701	 
CN1195297 A	19981007	CN19961096777	19960701	 
DE69610106 D1	20001005	DE19966010106	19960701	 
EP0837692 A1	19980429	EP19960923569	19960701	 
EP0837692 A4	19980429	EP19960923569	19960701	 
EP0837692 B1	20000830	EP19960923569	19960701	 
JP11509200 T2	19990817	JP19970505861T	19960701	 
NZ312502 A	19990329	NZ19960312502	19960701	 
US5919463 A	19990706	US19950543708	19951016	 
WO9702836 A1	19970130	WO1996US11142	19960701	 
ZA9605731 A	19980126	ZA19960005731	19960705	 



19) Family number: 49614218 (US2004137601A)

Similar • Translate • Full-text • Status • Citations

Title: [EN] AMINO ACID SEQUENCES FOR THERAPEUTIC AND PROPHYLACTIC USE AGAINST DISEASES DUE TO **CLOSTRIDIUM DIFFICILE** **TOXINS**

Abstract: Source: US2004137601A [EN] The invention relates to monoclonal antibodies capable of recognizing and neutralizing epitopes from the ligand domain, the translocation domain or the catalytic domain of the enterotoxin **toxin A** and cytotoxin **toxin B** from **Clostridium difficile**, as well as their production and therapeutic and prophylactic applications to diseases caused by said **toxins**.

Classifications: Classification Explorer

International (pc-8): A61K39/395 A61K39/40 A61P31/04 A61P43/00 C07K1/00 C07K14/00 C07K14/33 C07K16/00 C07K16/12 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N15/02 C12N15/13 C12N5/10 C12P21/00 C12P21/08 (Advanced/Invention); A61K39/00 A61K39/395 A61K39/40 A61P43/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N15/02 C12N15/13 C12N5/10 C12P21/00 C12P21/08 (Advanced/Non-invention)

International (pc-1-7): A61K39/395 A61K39/40 A61K39/42 A61P31/04 A61P43/00 C07K1/00 C07K14/33 C07K16/00 C07K16/12 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/20 C12N1/21 C12N15/02 C12N15/13 C12N15/16 C12N5/10 C12P21/00 C12P21/08

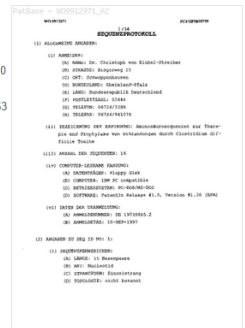
CPC: A61K39/00 C07K14/33 C07K16/1282 C07K2317/13 C07K2317/24

European: C07K14/33 C07K16/12B16 K61K39/00 M07K207/00 M07K317/130 M07K317/240

US: 424/130.1 424/141.1 424/150.1 424/164.1 424/167.1 435/252.3 435/252.300P 530/350 530/387.1 530/388.1 530/388.2 530/388.4 530/389.5 530/530

Family: Family Explorer

Publication number	Publication date	Application number	Application date	Links
AT254139 E	20031115	AT19980951374T	19980910	 
AU199897426 A1	19990329	AU19980097426	19980910	 
BRP19815367 A	20011106	BR1998P15367	19980910	 
CA2303202 AA	20000309	CA19982303202	19980910	 
CA2303202 C	20100427	CA19982303202	19980910	 
CN1273588 A	20001115	CN19988008996	19980910	 
DE19739685 A1	19990311	DE19971039685	19970910	 
DE59810172 D1	20031218	DE19985010172	19980910	 
EP0994904 A2	20000426	EP19980951374	19980910	 
EP0994904 B1	20031112	EP19980951374	19980910	 
ES2210832 T3	20040701	ES19980951374T	19980910	 
JP2001515920 T2	20010925	JP20000510776T	19980910	 
JP4318398 B2	20090819	JP20000510776T	19980910	 
US2004137601 AA	20040715	US20030745102	20031223	 
US6667035 BA	20031223	US20000508413	20000327	 



Abstract: Source: US2008089904A [EN] The present invention relates to the field of bacterial toxic proteins, in particular **toxins** from **Clostridium** or other pathogenic organisms using, for example, promoter nucleic acids to control expression of polypeptides such as bacterial **toxins**.

bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/000000>; this version posted April 15, 2016. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

Publication number	Publication date	Application number	Application date	Links
A0015454 AA	20010502	AR1998P104684	19980918	 
AU199891702 A1	19990412	AU19980091702	19980917	 
AU20020301780 AA	20030306	AU20020301780	20021101	 
AU20020301780 BB	20070208	AU20020301780	20021101	 
AU20070201975 AA	20070524	AU20070201975	20070503	 
AU20070201975 BB	20090903	AU20070201975	20070503	 
AU750847 B2	20020801	AU19980091702	19980917	 
DK10155729 T3	20140721	DK1998094401T7	19980917	 
EP1015579 A2	20000705	EP19980944017	19980917	 
EP1015579 B1	20140416	EP19980944017	19980917	 
FR2768747 A1	19990326	FR19970011710	19970919	 
FR2768747 B1	20041201	FR19970011710	19970919	 
NZ503537 A	20021220	NZ19980503537	19980917	 
NZ533498 A	20060428	NZ1998053498	19980917	 
NZ54713 A	20080430	NZ1998054713	19980917	 

Isomethadone Dose (μM)	Percent Rate of Activity Remaining
0	100
1.0	~45
2.0	~35
4.0	~30
8.0	~15

FIG. 1A

C. effect of dose of isomethadone with isomethadone 2PACDase

Isomethadone Dose (mg)	Percent Rate of Activity Remaining
0	100
10	~45
20	~35
40	~15

FIG. 1B

Publication number	Publication date	Application number	Application date	Links
AU387205 E	20080315	EP19990924602T	19990527	
AU199941253 A1	19991213	AU19990041253	19990527	 
AU200112616 A5	20010514	AU20011012616S	20001103	 
CA2321927 AA	20000823	CA19992321927	19990527	 
CA2388187 AA	20040243	CA20002388187	20001103	 
CN1983066 A	20011306	CN19998005510	19990527	 
DE108740 T1	20062613	DE19990924602T	19990527	 
DE59938241 D1	20080410	DE1999038241	19990527	 
DE59938241 T2	20080529	DE1999038241T	19990527	 
EP108740 A1	20010411	EP19990924602	19990527	 
EP108740 B1	20080227	EP19990924602	19990527	 
EP108740 B8	20080528	EP19990924602	19990527	 
EP1250153 A2	20021023	EP20000974214	20001103	 
EP1740645 A2	20060927	EP20060009088	19990527	 
EP1740645 A3	20061026	EP20060009088	19990527	 
JP2002516284 T2	20020604	JP20000550491T	19990527	 

Figure 1 is a schematic representation of the experimental design. It shows two groups, Team A and Team B, each with a timeline of 100 days. Team A has a 10-day period of 'No training' followed by 'Training' for the remainder of the 100 days. Team B has a 10-day period of 'No training' followed by 'Training' for the remainder of the 100 days. A legend indicates that the hatched area represents 'Training period' and the white area represents 'No training period'.

Publication number	Publication date	Application number	Application date	Links
AU200043372 A5	20001114	AU20000043372	20000410	  
AU200049732 A5	20001144	AU20000049732	20000410	  
AU718027 B2	20050428	AU20000043372	20000410	  
AU718175 B2	20050512	AU20000049732	20000410	  
CA2365914 A4	201010927	CA200023365914	20000410	  
CA2365915 AA	201010927	CA20002365915	20000410	  
EP1165796 A2	202010102	EP20000923206	20000410	  
EP116456 A1	202010109	EP20000931926	20000410	  
EP116456 A1	21020711	EP20000931926	20000410	  
EP2502998 A2	20210926	EP20120155470	20000410	  
EP2502998 A3	202103227	EP20120155470	20000410	  
JP2002541808 T2	20212120	JP20000611684T	20000410	  
JP2002542169 T2	20212120	JP20000611685T	20000410	  
JP2010083898 A2	20100415	JP20090298925	20091228	  
JP566684 B2	20140806	JP20090298925	20091228	  

Búsqueda en EPOQUENET

Database	SS	Status	Results	Query
EPODOC	1		0	COMPOSITION W CLOSTRIDIUM
	2		0	CLOSTRIDIUM DIFFICILE
	3		0	C. DIFFICILE
⊕ ⊖ TXTUS	1		6172	CLOSTRIDIUM W DIFFICILE
⊕ ⊖	2		0	COMPOSITION+ TOXIN A
⊕ ⊖	3		14	COMPOSITION+ P CLOSTRIDIUM
⊕ ⊖	4		0	CLOSTRIDIUM P TOXIN A
⊕ ⊖	5		0	CLOSTRIDIUM TOXIN A
⊕ ⊖	6		0	COMPOSITION CLOSTRIDIUM DIFFICILE
⊕ ⊖	7		0	COMPOSITION+ C. DIFFICILE
⊕ ⊖	8		1	1 AND 3

Autocatalytic Processing of *Clostridium difficile* Toxin B BINDING OF INOSITOL HEXAKISPHOSPHATE^{*[§]}

Received for publication, August 5, 2008, and in revised form, November 25, 2008. Published, JBC Papers in Press, December 1, 2008, DOI 10.1074/jbc.M806002200

Martina Egerer^{‡§}, Torsten Gieseemann[‡], Christian Herrmann[¶], and Klaus Aktories^{‡1}

From the [‡]Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, D-79104 Freiburg, Germany, the [§]Fakultät für Biologie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, D-79104 Freiburg, Germany, and the [¶]Physikalische Chemie 1, Fakultät für Chemie und Biochemie, Ruhr-Universität Bochum, 44780 Bochum, Germany

Clostridium difficile toxins A and B are major virulence factors responsible for induction of pseudomembranous colitis and antibiotic-associated diarrhea in men. The toxins possess a multidomain structure and only the N-terminal glucosyltransferase domain, which inactivates Rho GTPases by glucosylation, is translocated into the cytosol of target cells. Processing of the toxin occurs by autocatalytic cleavage and is activated by inositol hexakisphosphate (InsP₆). Here we studied the inherent protease activity in fragments of toxin B and determined the site of toxin B that interacts with InsP₆. We report that a fragment of toxin B, comprised of residues 1–955, is cleaved in the presence of InsP₆. In contrast, mutants of the catalytic triad of the putative cysteine protease domain did not cleave this fragment. [³H]InsP₆ bound to holotoxin B and to the fragment 1–955, but not to a fragment comprising residues 900–2366 or the glucosyltransferase domain (residues 1–544). Binding to the putative cysteine protease domain (residues 544–955) was also observed. InsP₆-binding was specific and saturable. Isothermal titration calorimetry revealed a *K_d* value of 2.4 μM for binding of InsP₆ to toxin fragment 544–955 with a stoichiometry factor of 0.86. Lysine 600 of toxin B was identified as essential amino acid for InsP₆ binding and for InsP₆-dependent activation of the protease activity.

Clostridium difficile toxins A and B are the causative agents of pseudomembranous colitis. In even more cases, the toxins are responsible for antibiotic-associated diarrhea, which is a frequent complication occurring during or after therapy with antibiotics (1–3). Both toxins belong to the family of clostridial glucosylating toxins, which inactivate eukaryotic GTPases of the Rho family by attachment of glucose (4, 5). The *C. difficile* toxins A and B are multifunctional proteins with molecular masses of 269 and 308 kDa (5–7). After binding of the C terminus to the cell surface receptors of target cells (8, 9), the toxins are endocytosed and traffic to early endosomes (10, 11). The

acidic compartment causes conformational changes of the toxin molecule and allows insertion of an internally located hydrophobic region (residues 956–1128) into vesicle membranes (12–14), which is accompanied by pore formation and subsequent translocation into the cytosol (15, 16). Only the N-terminal glucosyltransferase domain (17), consisting of ~540 amino acid residues, is released into the cytosol of target cells (18, 19), where it then modifies Rho GTPases (4). Cleavage of the toxins occurs by an autocatalytic process, which is largely enhanced by inositol hexakisphosphate (InsP₆)² and dithiothreitol (12, 14).

It has been proposed previously that an aspartate protease activity, which is characterized by the DSG motif located at position 1665, is involved in autocatalytic cleavage (12). However, we and others (13, 14) have proposed that a cysteine protease domain located near the N-terminal glucosyltransferase domain is responsible for the cleavage and processing of the toxins.

To clarify the localization of the protease activity in more detail, we constructed and characterized a series of toxin deletion mutants. Here we report that the toxin fragment 1–955 is sufficient for processing and release of the glucosyltransferase domain. Moreover, we show that InsP₆ binds to a region, consisting of amino acids 544–955 and identified lysine at position 600 as essential for interaction with InsP₆.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Bacterial Strains and Reagents—*Escherichia coli* BL21(DE3) (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) and TG1 bacteria (Stratagene, La Jolla, CA) were cultivated in LB-broth (Luria/Miller; Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) at 37 °C if not otherwise mentioned.

Oligonucleotides were purchased from Apar Bioscience GmbH (Freiburg, Germany). Toxin B specific primers for site-directed mutagenesis to generate the following amino acid substitutions: K600E, K689E, R751E/R752E, and H653A/C698A, were designed according to the cDNA sequence of toxin B from *C. difficile* strain VPI 10463 (GenBankTM Accession no. X53138).

Inositol hexakisphosphate, myo-inositol 1,4,5-trisphosphate, myo-inositol hexasulfate, proteinase K, and thrombin were purchased from Sigma-Aldrich, benzamidin-Sepharose

^{*} This work was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft Projects Gl684 and AK6/16 and by the research group Klinische Infektiologie Freiburg, TP 1a. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[§] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs. S1 and S2.

¹ To whom correspondence should be addressed: Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Otto-Krayer-Haus, Albertstrasse 25, D-79104 Freiburg, Germany. Tel.: 49-761-2035301; Fax: 49-761-2035311; E-mail: klaus.aktories@pharmakol.uni-freiburg.de.

² The abbreviations used are: InsP₆, inositol hexakisphosphate; GST, glutathione S-transferase; GTPγS, guanosine 5'-3-O-(thio)triphosphate; RTX, repeats-in-toxin toxin.

6B and glutathione-Sepharose 4B from GE Healthcare/Amersham (Munich, Germany), isopropyl β -D-thiogalactoside from PeqLab Biotechnology GmbH (Erlangen, Germany), and guanosine-5'-O-(3-thiotriphosphate) from Roche Applied Science GmbH (Mannheim, Germany).

Cloning of Toxin B Fragments—For toxin B fragments 1–955, 544–955, and 579–777 primers were designed to amplify fragments of *C. difficile* toxin B with flanking BamHI and NotI restriction sites from genomic DNA of *C. difficile* VPI 10463 (toxinB-1-BamHI-sense (cccggatccatgagtttagtataagaaaacag), toxinB-544-BamHI-sense (cggtacccggtgaagatgataatcttg) and toxinB-955-NotI-antisense (cgcggccgcttcgtgtgtatctctaaattac); toxinB-579-BamHI-sense (cggtacccatctattgttcagttacaagg) and toxinB-777-NotI-antisense-stop (cgcggccgctcattctttgatgaatatcatttataactttc). PCR was performed by using *Pfu* Turbo polymerase (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Germany), and the PCR products were cloned into pCR-BluntII-TOPO vector (Invitrogen, Karlsruhe, Germany), then subcloned into pET-28a(+) (Novagen, EMD Biosciences) as BamHI-NotI fragments.

Primers for amplification of toxin B fragment 544–2366 and toxin B fragment 900–2366 were toxinB-544-BamHI-sense (cggtacccggtgaagatgataatcttg) and toxinB-2366-EcoRI-antisense (gaattcctattcactaatcactaattg), and toxinB-900-BamHI-sense (cggtacccctttataataaagaactggagaatc) and toxinB-2366-XhoI-antisense (cctcgagctattcactaatcactaattg), respectively. The generated PCR products were cloned into pGEX4T-1 vector (toxin B-(544–2366)) and pGEX2T vector (toxin B-(900–2366)) (Amersham Biosciences). Toxin B fragment 1–544 was cloned as already described (14, 18, 20).

Generation of Point Mutations within the Recombinant Toxin B-(1–955) and Toxin B-(544–955)—Point mutations within pET-28a toxin B-(1–955) and pET-28a toxin B-(544–955) were produced using QuikChange mutagenesis method (Stratagene) according to the manufacturer's instructions. Plasmid DNA was prepared using standard procedures and sequenced with ABI PRISMTM dye terminator cycle sequencing ready reaction kit and an ABI 310 cycle sequencer (PerkinElmer Life Sciences, Rodgau-Jügesheim, Germany) to confirm gene sequence.

Expression and Purification of Native and Recombinant Proteins—For purification of the native toxins A and B, *C. difficile* VPI 10463 was grown under anaerobic conditions, and the proteins were separated by ammonium sulfate precipitation from the culture supernatant. Toxin A and toxin B were separated by anion exchange chromatography (21). Toxin A was additionally purified by thyroglobulin affinity chromatography, based on the high affinity of the toxin to Gal α 1–3Gal β 1–4GlcNAc (22). All recombinant proteins were expressed in *E. coli* BL21(DE3). Toxin B-(1–955), toxin B-(544–955) and toxin B-(579–777) transformed *E. coli* cells were induced at $A_{600} = 1$ with 1 mM isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside and the His fusion proteins were expressed for 3 h at 29 °C. Purification was performed by affinity chromatography with Protino[®]-Ni-IDA (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany), according to the manufacturer's instructions. The glutathione *S*-transferase fusion proteins toxin B-(1–543), toxin B-(544–2366), and toxin B-(900–2366) were expressed overnight at 29 °C after induction at $A_{600} = 0.6$ –0.8 with 200

μM isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside. The recombinant GST fusion proteins were purified using glutathione-Sepharose 4B according to the manufacturer's instructions. N-terminal His and GST tags were removed by thrombin cleavage, followed by inactivation of thrombin utilizing benzamidine beads. Note *E. coli*-expressed toxin B-(544–955) had an N-terminal and a C-terminal His tag; only the N-terminal His-tag was cleaved (toxin B-(544–955)-His).

Toxin B-(1–955) and toxin B-(544–955)-His wild-type protein and mutants were additionally purified by anion exchange chromatography (ResourceTM Q, Amersham Biosciences) and gel filtration (SuperdexTM 200, Amersham Biosciences), respectively. Proteins were analyzed by SDS-PAGE and MALDI-TOF. Concentrations of different protein preparations were estimated by the Bradford reagent (supplemental Fig. S1).

In Vitro Cleavage Assay and Western Blotting—Cleavage assays were performed in 100 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, at a final volume of 20 μl with 1 μg of toxin B. Reactions were initiated by addition of InsP_6 or InsS_6 at indicated final concentrations and were incubated for 30 min at 23 °C. The reaction was stopped by heating the samples at 95 °C in Laemmli buffer, and probes were separated by SDS-PAGE (3–12% gradient gel). Proteins were transferred to polyvinylidene difluoride membrane with a semi-dry blotter (Bio-Rad). Monoclonal anti-toxin B-(1–546) antibody at a dilution of 1:100,000 followed by the anti-mouse IgG horseradish peroxidase secondary antibody (1:5000; Biotrend, Cologne, Germany) was used for detection of the catalytic domain of toxin B. Corresponding bands were detected using enhanced chemiluminescence (ECL).

In Vitro Transcription/Translation of Toxin B Fragments—The *in vitro* transcription/translation was performed with EasyXpressTM Protein Synthesis Kit (Qiagen, Hilden, Germany) using radioactive labeled L-[¹⁴C]leucine (PerkinElmer Life Sciences) according to the manufacturer's instructions. Following a 60-min incubation at 37 °C, 10 μl of the lysate were incubated with or without 10 mM InsP_6 for 30 min at 23 °C. Samples were separated by SDS-PAGE and labeled proteins visualized by autoradiography (Phosphorimager, GE Healthcare).

Filter Binding Assay with Radioactive Labeled [³H] InsP_6 —Binding of [³H] InsP_6 (PerkinElmer Life Sciences) was assayed in 100 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, with a mixture of 100 nM [³H] InsP_6 and 29.9 μM unlabeled InsP_6 and 0.5 μM protein. Additionally, 50 μg of bovine serum albumin was added to all samples with toxins and toxin fragments. After incubation for 10 min at 4 °C, reactions were terminated by rapid vacuum filtration through pre-wetted 0.45 μm nitrocellulose membranes (Whatman GmbH, Dassel, Germany) followed by washing with 3 ml of 100 mM Tris-HCl buffer to separate free and bound [³H] InsP_6 . Membrane-bound radioactivity was determined by liquid scintillation counting. For saturation assays, toxin B fragment (544–955)-His (0.5 μM) was incubated with increasing concentrations of InsP_6 for 10 min at 4 °C. Bound [³H] InsP_6 was measured as described above. For competition assays 0.5 μM toxin B fragment 1–955 H653A/C698A was incubated with 100 nM [³H] InsP_6 for 10 min at 4 °C. Specific binding of [³H] InsP_6 to toxin B fragments was challenged with different concentrations of unlabeled InsP_6 , inositol hexakisulfate

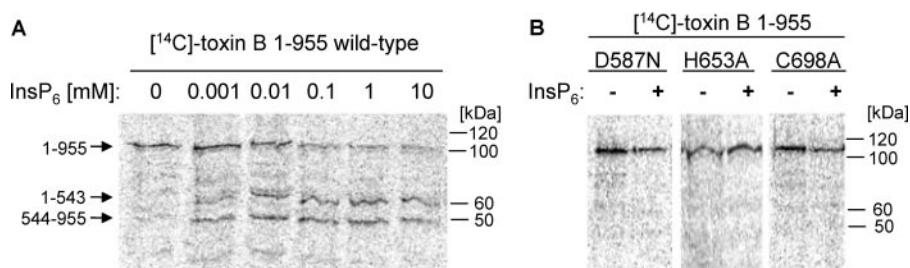


FIGURE 1. InsP_6 -dependent autocatalytic processing of toxin B. Toxin B fragments encompassing amino acids 1–955 (wild-type and catalytic triad mutants, as indicated) were produced by coupled *in vitro* transcription/translation as L-[^{14}C]leucine-labeled proteins. *A*, InsP_6 was added at increasing concentrations (0–10 mM) to the wild-type toxin-containing lysate and autocatalytic processing was monitored by SDS-PAGE followed by autoradiography. The expected fragments (full-length: amino acid 1–955 (110 kDa), split products: amino acid 1–543 (63 kDa) and amino acid 544–955 (47 kDa)) are indicated by arrows. *B*, inhibition of autocatalytic cleavage by mutation of essential residues of the catalytic triad even in the presence of high concentration of InsP_6 (10 mM).

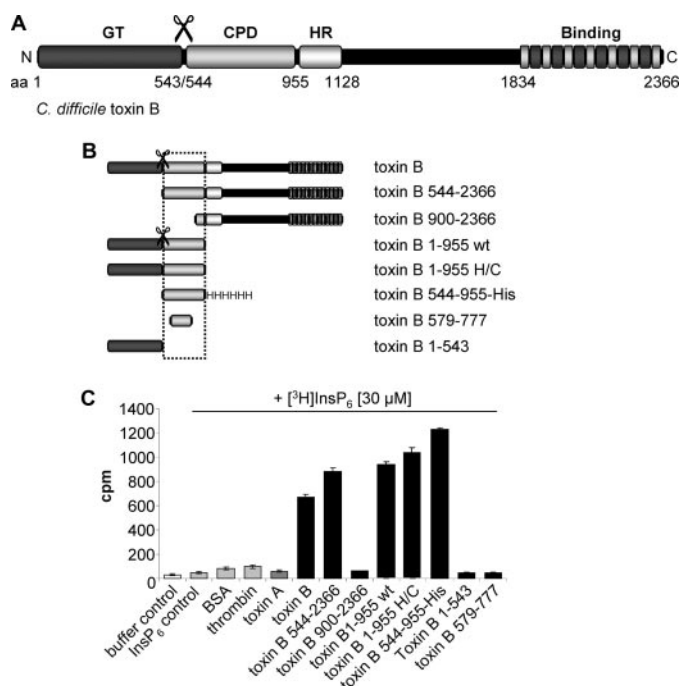


FIGURE 2. Binding of [^3H] InsP_6 to recombinant fragments of toxin B and native holotoxins A and B. *A*, overview of the multidomain primary structure of *C. difficile* toxin B (holotoxin) with glucosyltransferase domain (GT), cysteine protease domain (CPD), hydrophobic region (HR), and C-terminal receptor-binding region indicated. *B*, corresponding recombinant toxin B fragments utilized in filter binding assays. *C*, 0.5 μM of the indicated proteins were incubated for 10 min with [^3H] InsP_6 (30 μM) at 4 $^\circ\text{C}$ in a total volume of 50 μL . Thereafter, the mixture was rapidly filtered through nitrocellulose membranes as described under “Experimental Procedures.” Bound radioactivity was monitored by liquid scintillation counting. Data (cpm) are given as means $\pm$ S.E. from at least five independent experiments. Toxin A, *C. difficile* holotoxin A; toxin B, *C. difficile* holotoxin B; toxin B (544–2366; 900–2366; 1–955 wild-type (wt); 1–955 catalytic amino acid mutant (H/C); 544–955-His; 579–777; 1–543), recombinant *C. difficile* toxin B fragments, consisting of the indicated amino acid residues of toxin B; buffer control (white bar), control with buffer; InsP_6 control (gray bar), control without toxin or toxin fragments; BSA, control with 50 μg bovine serum albumin; thrombin, control with thrombin.

(InsS_6), inositol trisphosphate (InsP_3) and GTP γS by further incubation for 30 min at 4 $^\circ\text{C}$. Bound [^3H] InsP_6 was measured as described above.

Isothermal Titration Calorimetry—The interaction between InsP_6 and toxin B fragment (544–955)-His was characterized by isothermal titration calorimetry (ITC200, MicroCal, Milton

Keynes, UK) using LEW-buffer pH 8.0 (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl) at 20 $^\circ\text{C}$. The cell was filled with 36 μM protein and from the syringe 2- μL aliquots of 300 μM InsP_6 were injected. As a control, the same InsP_6 solution was injected into the cell filled with buffer only. For data evaluation, the manufacturer’s software was used.

Proteinase K Digestion Assay—Toxin B fragment 544–955 and the mutant toxin B-(544–955)-K600E were expressed with TNT $^{\text{®}}$ -coupled Reticulocyte Lysate Systems from Promega (Madison, WI) by using

radioactive labeled L-[^{14}C]leucine (PerkinElmer Life Sciences). Following 90 min of incubation at 30 $^\circ\text{C}$, 3 μL of the lysate were incubated with or without 10 mM InsP_6 for 30 min at 23 $^\circ\text{C}$. Digestion was performed with proteinase K (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) at 4 $^\circ\text{C}$ for 10 min and was inhibited with phenylmethanesulfonyl fluoride for 2 min at 4 $^\circ\text{C}$. Samples were separated by SDS-PAGE, and gels were stained with Coomassie Brilliant Blue. Signals were visualized by autoradiography.

RESULTS

We expressed the *C. difficile* toxin B fragment 1–955 by *in vitro* transcription/translation. When InsP_6 was added to this toxin fragment, cleavage was induced (Fig. 1A). As expected, mutations (D587N, H653A, C698A) of the putative catalytic cysteine protease triad inhibited cleavage of mutants (Fig. 1B). The concentration of InsP_6 to stimulate autocleavage was in the same range as observed previously for autocatalytic cleavage of the holotoxin (12) starting at $\sim 1 \mu\text{M}$. These data indicated that InsP_6 acts in a region encompassed by amino acids 1–955.

Because of the evident potency of InsP_6 to cleave toxin B, we were prompted to study direct binding of InsP_6 to the protein toxin. For this purpose several toxin fragments, as well as the holotoxin B (see Fig. 2, A and B; supplemental Fig. S1) were incubated for 10 min with 30 μM [^3H] InsP_6 , followed by a membrane filter assay. Binding of [^3H] InsP_6 was observed for the wild-type toxin fragment 1–955 (Fig. 2C) as well as for the holotoxin B albeit to a lower extent than with fragment 1–955. We were not able to detect binding to holotoxin A. This is probably because of the fact that the affinity for InsP_6 is lower. Accordingly, it has been reported that much higher concentration of InsP_6 (1–10 mM) is necessary for induction of autocleavage of toxin A than for that of toxin B (12, 14). No binding was detected with the toxin B fragment 900–2366, which starts after the proposed cysteine protease domain (Fig. 2C). This finding is in line with the hypothesis that InsP_6 interacts with the N-terminal residues 1–955 of the toxin (14). Previously reported data did not exclude the possibility that InsP_6 also interacts with the glucosyltransferase domain of the toxin. Therefore, we separately tested binding of [^3H] InsP_6 to the glucosyltransferase domain (fragment 1–543) or to the protease domain (toxin fragment (544–955)-His). The glucosyltransferase domain did not exhibit any binding of [^3H] InsP_6 . By

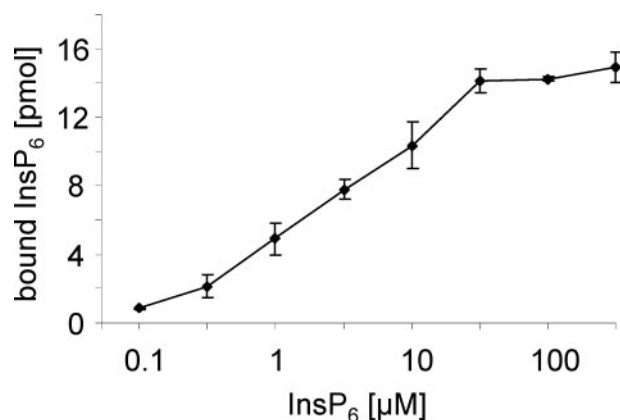


FIGURE 3. Binding saturation experiment. For binding of [³H]InsP₆ (0.1–300 μM) to recombinant toxin B fragment (544–955)-His (25 pmol) incubation was performed for 10 min at 4 °C in a total volume of 50 μl. Thereafter, the mixture was rapidly filtered through nitrocellulose membranes and washed extensively. Bound radioactivity was determined by liquid scintillation counting. Data (pmol) are given as means ± S.E. from three independent experiments.

contrast, the protease domain was able to bind radioactive labeled InsP₆. To further narrow down the region of InsP₆ binding, we studied the fragment 579–777 of toxin B. However, this fragment was not able to bind [³H]InsP₆ in the filter assay. Finally, we tested binding properties of the fragment 1–955 with mutations at the proposed catalytic residues histidine 653 and cysteine 698 (toxin B H/C), which have been shown to block autoproteolytic activity (14). This double mutant was able to bind [³H]InsP₆ in the same manner as the wild-type fragment 1–955. This finding suggests that the protease activity plays no major role in InsP₆ binding under the conditions studied.

We studied binding in more detail with the minimal toxin B fragment (544–955)-His. A binding saturation experiment was performed with the concentration range of 0.1–300 μM [³H]InsP₆ in the presence of 25 pmol of toxin fragment. Saturation was achieved at 30 μM and a half-maximal effect was observed at ~3 μM (Fig. 3).

To obtain precise information about the affinity as well as the stoichiometry of the complex we employed isothermal titration calorimetry (Fig. 4). The titration was carried out twice and yielded *K_d* values of 2.1 μM and 2.7 μM, respectively, confirming the result obtained with [³H]InsP₆. The number obtained for the stoichiometry of the complex (stoichiometry factor of 0.86) indicated that InsP₆ binds at a ratio of 1:1 to the toxin.

As binding of the wild-type and mutant fragments were similar, we decided to test the specificity of InsP₆-binding with the mutant fragment of toxin B (toxin B H/C), because this fragment was not cleaved. Fragment 1–955 (toxin B H/C) was incubated with 100 nM [³H]InsP₆ for 10 min, then increasing amounts of unlabeled InsP₆, InsP₃, inositol hexakisulfate, and GTPγS were added. As shown in Fig. 5A, displacement occurred with the highest potency by InsP₆. The rank order of competition of binding of [³H]InsP₆ was InsS₆ > InsP₃ > GTPγS with InsS₆ being at least 300-fold less potent than InsP₆. This is in line with the previously reported specificity of inositol phosphates to induce toxin cleavage (12). We also observed that InsS₆ not only competed with [³H]InsP₆ binding

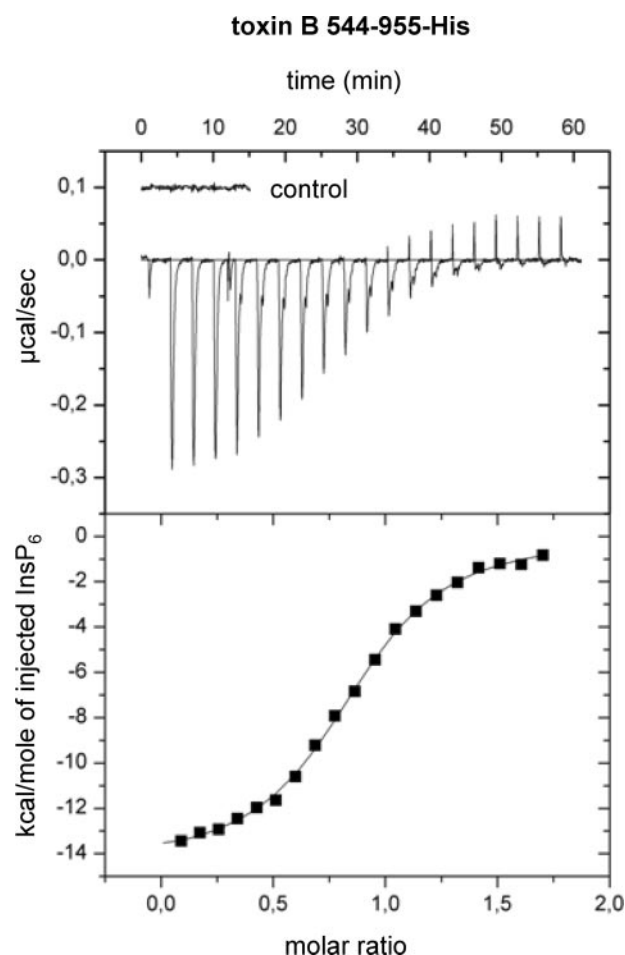


FIGURE 4. Isothermal titration calorimetry of InsP₆ and toxin B fragment (544–955)-His. A, 300 μM InsP₆ was injected stepwise to a solution of 36 μM toxin B fragment (544–955)-His, and the resulting changes in heating power were recorded. The control represents injection of the same InsP₆ solution into buffer (shifted upwards by 0.1 μcal/s for clarity). B, heat increments obtained from panel A by integration are plotted versus the molar ratio of injected InsP₆ and toxin B. A fit to the data yields a stoichiometry factor of 0.86, a molar enthalpy of association of 14.4 kcal/mol, and an association constant of 480,000 M⁻¹.

but also induced autocatalytic processing of holotoxin B at high concentrations (Fig. 5B).

The highly charged InsP₆ is likely to interact with positively charged amino acids of the toxin. We compared the sequences of the putative cysteine protease domains from the various clostridial glucosylating toxins to identify conserved lysine and arginine residues. Accordingly, two lysines (lysine 600 and lysine 689) in the protease domain of toxin B, which were identically positioned in other clostridial toxins and even conserved in the related RTX toxin, were changed to glutamate in the toxin fragment 1–955. We also made a double mutant of two arginine residues (Arg-751/Arg-752), which were either arginine or lysine in the other clostridial toxins or in RTX (supplemental Fig. S2). The mutant toxin fragments (residues 1–955) were expressed as ¹⁴C-labeled proteins by *in vitro* transcription/translation. The cleavage of the labeled proteins was studied in the absence and presence of InsP₆ (10 mM). As shown in Fig. 6A, the mutant K600E of fragment 1–955 was not longer cleaved, whereas K689E exhibited no change in cleavage as compared with the wild-type fragment. Also the double mutants R751E/R752E were not cleaved after addition of InsP₆. To test the

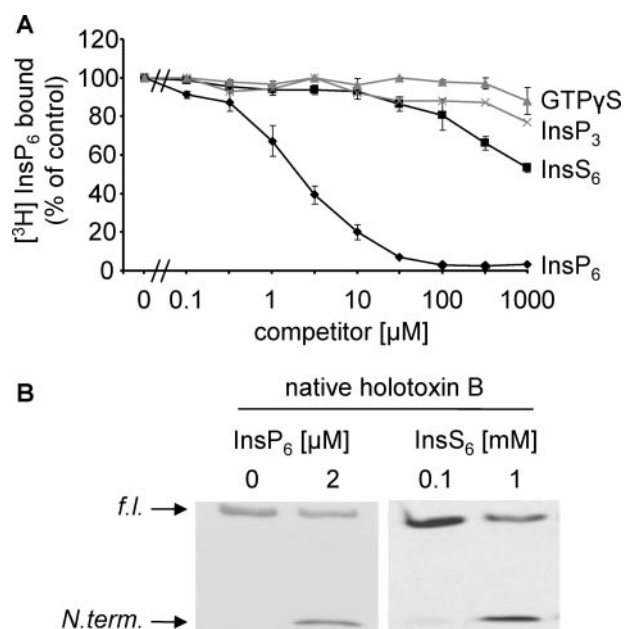


FIGURE 5. Binding competition experiments and InsP_6 -dependent cleavage. A, binding of (H653A/C698A, H/C) to $[\text{H}]\text{InsP}_6$ (100 nM) was performed for 10 min at 4 °C. Unlabeled InsP_6 , InsS_6 , GTP γ S, or InsP_3 were added at increasing concentrations (0–1000 μM), and incubation was continued for further 30 min. Thereafter, the mixture was rapidly filtered through nitrocellulose membranes and washed. Bound radioactivity was monitored by liquid scintillation counting. Radioactivity (cpm) bound to toxin B fragment in the absence of unlabeled competitors was set to 100% (control). Data (cpm) for $[\text{H}]\text{InsP}_6$ binding in the presence of InsP_6 , InsS_6 , GTP γ S, and InsP_3 are given as percent of control $\pm$ S.E. of three independent experiments. Toxin B fragment used in these experiments was purified without the last anion chromatography. B, Western blot analyses of InsS_6 - or InsP_6 -induced autoproteolysis of native holotoxin B. Full-length toxin B (1 μg) was incubated for 30 min with 10 mM InsP_6 or InsS_6 at 23 °C in 100 mM Tris-HCl, 7.4. Thereafter, proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western-blotting, using a monoclonal antibody specific for the glucosyltransferase domain of toxin B, which detects full-length toxin (f.l.) and N-terminal part of the toxin (N.term.).

binding of $[\text{H}]\text{InsP}_6$, the mutants were expressed in *E. coli* and purified. In line with the autocleavage results, binding of $[\text{H}]\text{InsP}_6$ was observed with wild-type and K689E mutant of fragment 1–955 (Fig. 6B). In contrast, the K600E mutant, which was not autocatalytically cleaved (Fig. 6A), was also not able to bind $[\text{H}]\text{InsP}_6$. This result was confirmed by the identical mutation in fragment (544–955)-His of toxin B (Fig. 6B). To detect possible structural consequences of InsP_6 binding to the toxin fragment, we performed a proteinase K digestion assay with *in vitro* transcribed and translated ^{14}C -labeled toxin B fragment 544–955. Proteinase K was able to completely cleave the toxin B fragment. However, when InsP_6 was added, a ~ 30 -kDa fragment remained (Fig. 7). In line with the InsP_6 binding data, the K600E mutant of fragment 544–955, which was not able to bind InsP_6 , was not protected against degradation by proteinase K.

DISCUSSION

Clostridial glucosylating toxins are processed by autocatalytic cleavage. Recent studies suggested a aspartate activity around residue 1665 (12). However, in analogy with the cysteine protease activity of RTX toxin from *Vibrio cholerae*, we and others proposed a cysteine protease activity in the region covering residues 544–955 (13, 14). To resolve this discrepancy, we undertook studies to determine the localization of the

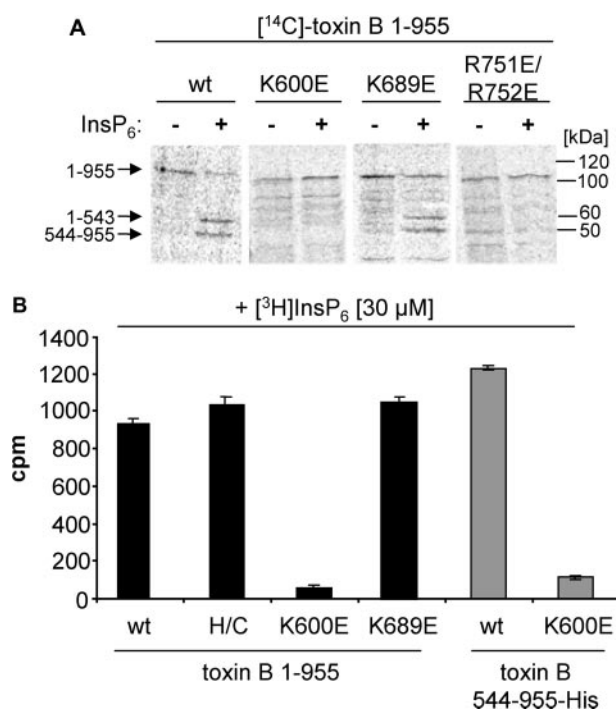


FIGURE 6. Dependence of InsP_6 -induced autoproteolysis and InsP_6 binding on basic residues within the cysteine protease domain of toxin B. Mutants (K600E, K689E, and R751E/R752E) of toxin B fragment 1–955 or toxin B fragment 544–955-His were produced by *in vitro* transcription/translation (in A) or as recombinant proteins (in B). A, indicated ^{14}C -labeled proteins were incubated with InsP_6 (10 mM), and autocatalytic processing was monitored by SDS-PAGE followed by autoradiography. Expected fragments (full-length: amino acid 1–955 (110 kDa), split products: amino acid 1–543 (63 kDa) and amino acid 544–955 (47 kDa)) are indicated by arrows. B, binding of InsP_6 to wild-type, mutant (K600E, K689E) toxin fragments 1–955, and mutant (K600E) toxin fragments (544–955)-His. 0.5 μM of the indicated proteins were incubated for 10 min with $[\text{H}]\text{InsP}_6$ (30 μM) at 4 °C in a total volume of 50 μl . Thereafter, the mixture was rapidly filtered through nitrocellulose membranes and washed. Bound $[\text{H}]\text{InsP}_6$ was monitored by liquid scintillation counting. Data (cpm) are given as means $\pm$ S.E. from at least three independent experiments.

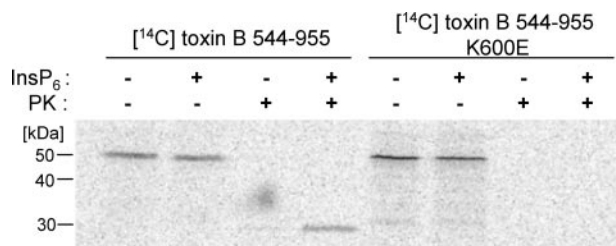


FIGURE 7. Effects of InsP_6 binding on the structure of the cysteine protease domain (CPD) of toxin B. Reticulocyte lysates, containing *in vitro* translated ^{14}C -labeled toxin B fragment 544–955 or point mutant K600E toxin B fragment 544–955 (50 kDa) were preincubated with InsP_6 (10 mM) for 30 min, followed by incubation with or without proteinase K (PK) for 10 min at 4 °C. Proteolysis was monitored by SDS-PAGE followed by autoradiography. Addition of InsP_6 to the proteins protects a ~ 30 -kDa fragment from wild-type toxin B fragment 544–955 against degradation by proteinase K, but not the point mutant K600E toxin B fragment 544–955.

protease activity in toxin B. By using a transcription/translation method different from that applied previously (14), we were able to express uncleaved toxin B fragment 1–955. When InsP_6 was added to this fragment, cleavage of the toxin B fragment into two parts was detected. Moreover, this processing was blocked with mutants of the putative active site of the cysteine protease. The data corroborate our previous hypothesis that

autocatalytic cleavage is caused by a putative cysteine protease located in the region 544–955.

Although the precise function of InsP₆ is not clear, this highly charged molecule might activate cleavage by inducing structural changes in the protease domain and perhaps also in the glucosyltransferase domain. To gain further insights into the role of InsP₆, we performed binding studies with radioactive labeled InsP₆. We detected binding of InsP₆ in the protease domain but not in the catalytic domain. Moreover, a toxin B fragment, consisting of the glucosyltransferase domain and the protease domain, exhibited similar binding properties as the protease activity domain alone, indicating that the N-terminal glucosyltransferase has no effect on InsP₆ binding. Binding was also observed with mutants (H653A and C698A) of the protease active site, indicating that the enzyme activity of the protease is not essential for binding.

The binding saturation experiment performed with [³H]InsP₆ as well as data obtained by isothermal titration calorimetry suggested that binding is stoichiometric (1:1). Furthermore, competition experiments showed high affinity binding of InsP₆ with a half-maximal displacement of the prebound [³H]InsP₆ with unlabeled InsP₆ at about 1–3 μM. Again these data were confirmed by isothermal titration calorimetry. Although enhancement of cleavage was achieved at high concentrations (1 mM) of InsS₆, this compound and also InsP₃ were several orders of magnitude less potent to compete with InsP₆. Similarly, while it has been shown that guanine nucleotides facilitated cleavage of the related RTX toxin (13), GTPγS was a poor competitor of InsP₆ in the binding assay with the toxin B fragment.

We identified lysine 600 as an essential residue for binding of InsP₆. This residue is conserved in all clostridial glucosylating toxins and also in the RTX toxin. In line with the InsP₆-binding data, we observed that the Lys-600 mutants of fragment 1–955 were not cleaved in the presence of InsP₆. Additionally, we observed that change of Arg-751/Arg-752 to glutamate blocked cleavage of the toxin fragment in the presence of InsP₆. We propose that these residues are also involved in interaction with InsP₆ (see below). Altogether, the data indicate that inhibition of InsP₆ binding also blocks autocatalytic cleavage of the toxin fragment.

So far the molecular mechanism of the action of InsP₆ on the cysteine protease activity of toxin B is not clear. It has been shown that InsP₆ can cause major changes in the structure of proteins after binding (23). More recently, the crystal structure of cysteine protease domain of the *V. cholerae* RTX toxin in complex with InsP₆ has been solved (24). Deduced from this study it has been suggested that InsP₆ causes an allosteric switch, which activates the cysteine protease domain of RTX. Major changes in the structure of the cysteine protease domain also appear to occur after binding of InsP₆ to toxin B as evidenced from the effect of InsP₆ on the protein stability in the presence of proteinase K. Addition of InsP₆ prevented complete degradation of the protease domain (residues 544–955) of toxin B by proteinase K. The effect was specific for InsP₆ and was not observed with the mutant fragment of toxin B, which is not able to bind InsP₆, excluding the possible action of the highly charged compound on proteinase K activity or on chelation of

cations. Mass spectrometric data suggest that the ~30-kDa fragment covers at least amino acid residues 544–798 (data not shown).

Prochazkova and Satchell (25) reported recently on the binding of InsP₆ to the cysteine protease domain of RTX toxin. Similar as reported here, the authors found that the equivalent residue in RTX to that of Lys-600 of toxin B is also important for interaction with InsP₆. However, our findings with toxin B differ in several important aspects from that reported for RTX toxin. Prochazkova and Satchell (25) suggested that InsP₆ interacts in a catalytic manner with RTX protease and is released after cleavage. Therefore, the RTX protease domain by itself is not able to bind InsP₆ after cleavage and also inactive RTX protease cannot bind InsP₆. In contrast, we observed binding with the protease domain in the absence of the glucosyltransferase domain. Furthermore, mutants of the active site of the cysteine protease of toxin B were still able to bind InsP₆.

The recently obtained crystal structure of the cysteine protease domain of RTX toxin (24) confirms the role of conserved lysine (e.g. Lys-600 in toxin B and Lys-3482 in RTX) and arginine (e.g. Arg-751 in toxin B and Arg-3610 in RTX) residues in binding of InsP₆. The structural data may also explain why no InsP₆-binding was obtained with a fragment of toxin B, consisting of amino acids 579–777, which includes the proposed catalytic residues of the protease and the region that is highly similar to the autocatalytic protease domain of the RTX toxin. However, this fragment lacks additional N-terminal and C-terminal residues, which appear to be involved in InsP₆ binding in the related RTX toxin (e.g. residues Arg-575 and Lys-788 of toxin B might be equivalent to the essential residues Arg-3457 and Lys-3628 in RTX) (supplemental Fig. S2). Although surprising similarities exist between toxin B and the distantly related protease domain of RTX, even among the family of clostridial glucosylating toxins major differences in the interaction of InsP₆ with the protease domain are evident. For example, InsP₆ exhibits ~1,000-fold lower potency in activation of the autocatalytic processing of toxin A, as compared with toxin B (12, 14). Therefore, it is likely that the various clostridial toxins differ in their mode of activation of their autocatalytic protease domain.

Acknowledgments—We thank Dr. Brenda Wilson for critical reading of the manuscript and Otilia Wunderlich for excellent technical assistance.

REFERENCES

1. Rifkin, G. D., Fekety, F. R., Silva, J., and Sack, R. B. (1977) *Lancet* **II**, 1103–1106
2. Bartlett, J. G., Onderdonk, A. B., Cisneros, R. L., and Kasper, D. L. (1977) *J. Infect. Dis.* **136**, 701–705
3. Voth, D. E., and Ballard, J. D. (2005) *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 247–263
4. Just, I., Selzer, J., Wilm, M., Von Eichel-Streiber, C., Mann, M., and Aktories, K. (1995) *Nature* **375**, 500–503
5. Just, I., and Gerhard, R. (2004) *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **152**, 23–47
6. Von Eichel-Streiber, C., Boquet, P., Sauerborn, M., and Thelestam, M. (1996) *Trends Microbiol.* **4**, 375–382
7. Jank, T., and Aktories, K. (2008) *Trends Microbiol.* **16**, 222–229
8. Von Eichel-Streiber, C., and Sauerborn, M. (1990) *Gene* **96**, 107–113
9. Dove, C. H., Wang, S. Z., Price, S. B., Phelps, C. J., Lyster, D. M., Wilkins,

- T. D., and Johnson, J. L. (1990) *Infect. Immun.* **58**, 480–488
10. Henriques, B., Florin, I., and Thelestam, M. (1987) *Microb. Pathogen.* **2**, 455–463
11. Florin, I., and Thelestam, M. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* **763**, 383–392
12. Reineke, J., Tenzer, S., Rupnik, M., Koschinski, A., Hasselmayer, O., Schratzenholz, A., Schild, H., and Von Eichel-Streiber, C. (2007) *Nature* **446**, 415–419
13. Sheahan, K.-L., Cordero, C. L., and Fullner Satchell, K. J. (2007) *EMBO J.* **26**, 2552–2561
14. Egerer, M., Giesemann, T., Jank, T., Satchell, K. J., and Aktories, K. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 25314–25321
15. Barth, H., Pfeifer, G., Hofmann, F., Maier, E., Benz, R., and Aktories, K. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 10670–10676
16. Giesemann, T., Jank, T., Gerhard, R., Maier, E., Just, I., Benz, R., and Aktories, K. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 10808–10815
17. Hofmann, F., Busch, C., Prepens, U., Just, I., and Aktories, K. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 11074–11078
18. Pfeifer, G., Schirmer, J., Leemhuis, J., Busch, C., Meyer, D. K., Aktories, K., and Barth, H. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 44535–44541
19. Rupnik, M., Pabst, S., Rupnik, M., Von Eichel-Streiber, C., Urlaub, H., and Soling, H. D. (2005) *Microbiology* **151**, 199–208
20. Jank, T., Reinert, D. J., Giesemann, T., Schulz, G. E., and Aktories, K. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 37833–37838
21. Just, I., Selzer, J., Hofmann, F., and Aktories, K. (1997) in *Bacterial Toxins—Tools in Cell Biology and Pharmacology* (Aktories, K., ed) Chapman & Hall, Weinheim
22. Krivan, H. C., and Wilkins, T. D. (1987) *Infect. Immun.* **55**, 1873–1877
23. Datta, S. A., Zhao, Z., Clark, P. K., Tarasov, S., Alexandratos, J. N., Campbell, S. J., Kvaratskhelia, M., Lebowitz, J., and Rein, A. (2007) *J. Mol. Biol.* **365**, 799–811
24. Lupardus, P. J., Shen, A., Bogoy, M., and Garcia, K. C. (2008) *Science* **322**, 265–268
25. Prochazkova, K., and Satchell, K. J. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 23656–23664

Enzyme Catalysis and Regulation:
Autocatalytic Processing of *Clostridium*
***difficile* Toxin B: BINDING OF**
INOSITOL HEXAKISPHOSPHATE

Martina Egerer, Torsten Gieseemann, Christian
Herrmann and Klaus Aktories

J. Biol. Chem. 2009, 284:3389-3395.

doi: 10.1074/jbc.M806002200 originally published online December 1, 2008

Access the most updated version of this article at doi: [10.1074/jbc.M806002200](https://doi.org/10.1074/jbc.M806002200)

Find articles, minireviews, Reflections and Classics on similar topics on the [JBC Affinity Sites](#).

Alerts:

- [When this article is cited](#)
- [When a correction for this article is posted](#)

[Click here](#) to choose from all of JBC's e-mail alerts

Supplemental material:

<http://www.jbc.org/content/suppl/2008/12/09/M806002200.DC1.html>

This article cites 23 references, 13 of which can be accessed free at
<http://www.jbc.org/content/284/6/3389.full.html#ref-list-1>