

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-184705- -00008-0000

Fecha: 2015-06-12 16:58:55 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 412 REPOSRESRECU Folios: 20

Carlos R. Olarte
Juan G. Mou

Alexander Agudelo
Carlos A. Par
Juan F. Acos
Andrés Rincé
Mónica Gueva
Andrés Alvarad
María C. Calderé
Mauncio Áv
Gina Cácer
Isabella Herre
Zaava Rav
Alejandro Mour
Miguel F. Por
Catalina Ama
Laura M. Escob
Lorena Andrac
Sergio Arbolc
Catalina Jiménc
Daniela Gonzál
Maritza Sier
Gina A. Ari
Guillermo Par
Érika Jhiset Suárez

Medell

María C. Múne
Eddie Manot
Adrián Santamar
Camilo A. Bern

Barranquit

Gina de Echen
Jose J. Dangor

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____ D. _____

Re: Expediente N° 13-184.705

Solicitud de Patente de Invención titulada: "COMPOSICIONES
INMUNÓGENAS DE BORDETELLA BRONSCHISEPTICA"

Solicitante: ZOETIS LLC.

Nuestra Ref.: P2013/000140

RECURSO DE REPOSICIÓN

CARLOS R. OLARTE, mayor de edad y vecino de Bogotá, D.C., identificado como aparece al pie de mi firma, en mi condición de apoderado de la sociedad solicitante, y dentro del término legal previsto por el artículo 76 del Código de Procedimiento Administrativo y de lo Contencioso Administrativo, me permito interponer RECURSO DE REPOSICIÓN en contra de la Resolución No. 10175, notificada por edicto desfijado el 28 de abril de 2015.

20175

1. ANTECEDENTES

1.1. La solicitud de patente ventilada en este expediente fue presentada el 02 agosto de 2013, con Capítulo Reivindicatorio original de 20 reivindicaciones.

1.2. La Superintendencia de Industria y Comercio (SIC) emitió el primer y único examen de fondo notificado por fijación en la lista No. 041 del 14 de octubre de 2014, correspondiente al Oficio No. 12971, objetando la claridad, unidad de invención, novedad y el nivel inventivo de la presente invención.

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.

1.3. En respuesta al primer y único examen de fondo, el 07 de enero de 2015 presenté un Capítulo Reivindicatorio Modificado con 12 reivindicaciones y además proporcioné argumentos a favor de la patentabilidad de la invención.

1.4. La SIC por medio de la Resolución No. 20175, notificada por edicto desfijado el 28 de mayo de 2015, niega las Reivindicaciones 1 a 12 por supuesta falta de claridad, unidad de invención, novedad y nivel inventivo.

2. OBJETO DEL RECURSO

Mediante la presentación del presente recurso, mi representada pretende que se revoque en su totalidad la Resolución No. 20175 del 24 de abril de 2015, y en su lugar se conceda el privilegio de patente de invención para las reivindicaciones contenidas en el **Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto** al presente recurso de reposición, o en su defecto aquellas reivindicaciones que el Despacho considere cumplen con los requisitos de patentabilidad.

3. FUNDAMENTO DEL RECURSO

Con referencia a los argumentos presentados por la SIC para desvirtuar la claridad, unidad de invención, novedad y el nivel inventivo de la presente solicitud en la resolución aquí recurrida, respetuosamente difiero del análisis expuesto, y procedo a refutar cada uno de dichos argumentos, exponiendo las motivaciones técnicas que desvirtúan la posición de ese Despacho.

3.1. En primer lugar, con el ánimo de brindar mayor claridad a la presente solicitud, me permito adjuntar un **Capítulo Reivindicatorio Modificado**, que reemplaza en su totalidad al Capítulo Reivindicatorio Modificado presentado el 07 de enero de 2015, donde se realizan los siguientes cambios:

- se eliminaron las antiguas Reivindicaciones 5 y 9-12;
- se cambia la frase “composición inmunogénica” por “composición de vacuna”.

Valga anotar que las modificaciones efectuadas al Capítulo Reivindicatorio cumplen a cabalidad con lo estipulado en el Artículo 34 de la Decisión 486, ya que éstas de ninguna manera implican una ampliación de la protección correspondiente a la divulgación contenida en la solicitud inicial.

3.2 a- El Despacho insiste que el Capítulo Reivindicatorio de la invención carece de claridad y concisión, ya que las Reivindicaciones 1-12 no definen una composición a partir de sus

características técnicas esenciales, es decir no se define la proteína pertactina p68 recombinante a partir de su correspondiente SEQ ID NO, para así distinguir inequívocamente la invención del arte previo.

b- Respetuosamente difiero de la apreciación del Despacho, ya que la composición de la invención se encuentra completamente definida por medio de sus características estructurales, que corresponden a

- (i) *Bordetella bronchiseptica* y
- (ii) un antígeno de la proteína pertactina P68 recombinante

En cuanto al antígeno de la proteína pertactina p68 recombinante, me permito señalar que la persona medianamente versada en la materia entendería a lo que se refiere la proteína pertactina p68 recombinante, como se conoce en el estado de la técnica hace más de 20 años, tal y como se encuentra ejemplificado en el Journal of General Microbiology, 138: 1697-1707 (1992), adjunto al presente memorial (ANEXO 1), donde se muestra la secuencia de la proteína. Por lo tanto, no es necesario proporcionar la SEQ ID NO de dicha proteína.

De hecho me permito señalar que la guía de la SIC establece que “las reivindicaciones deben contener todas las características técnicas esenciales de la invención las cuales definen la invención”¹ (subrayado fuera del texto). Es decir, las características esenciales de la presente invención son (i) *Bordetella bronchiseptica* y (ii) un antígeno de la proteína pertactina p68 recombinante y la secuencia de dicha proteína no resulta esencial para que la persona medianamente versada en la materia pueda entender el alcance de la invención y reproducirla.

3.3 a- El Despacho señala que la presente invención carece de unidad de invención y comprende los siguientes grupos inventivos:

- Grupo I: Composición inmunogénica que comprende un antígeno de *Bordetella bronchiseptica* y un antígeno de pertactina aislado.
- Grupo II: Composición inmunogénica que comprende un antígeno de *Bordetella bronchiseptica*, un antígeno de pertactina aislado y un antígeno Bsp22.
- Grupo III: Composición inmunogénica que comprende un antígeno de *Bordetella bronchiseptica*, un antígeno de pertactina aislado un antígeno del virus de influenza

¹ Instructivo Examen de Solicitudes de Patentes de Invención y Modelo de utilidad. Superintendencia de Industria y Comercio. 2014. Sección 2.6.1.

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.

canina (CIV), un antígeno de coronavirus respiratorio canino (CRCoV), un virus de parainfluenza canino (CPIV), adenovirus canino tipo 2 (CAV – 2) y *Mycoplasma cynos*.

- Grupo IV: Composición inmunogénica que comprende un antígeno de *Bordetella bronchiseptica*, un antígeno de pertactina aislado un antígeno del virus de influenza canina (CIV), un antígeno de coronavirus respiratorio canino (CRCoV), un virus de parainfluenza canino (CPIV) y adenovirus canino tipo 2 (CAV – 2).

b- i) Considero superada la objeción del Despacho en tanto las Reivindicaciones 9-12 fueron eliminadas del Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto. Sin embargo, me permito señalar que la apreciación del Despacho no es correcta, en tanto la SIC toma las Reivindicaciones dependientes de la invención como reivindicaciones aisladas, sin tener en cuenta que comprenden las características esenciales de la presente invención que son (i) *Bordetella bronchiseptica* y (ii) un antígeno de la proteína pertactina p68 recombinante, tal y como se define en la Reivindicación 1. Las reivindicaciones dependientes, tal y como el Despacho lo debe saber y como lo señala la guía de la SIC, “están dadas porque todas las características esenciales de la reivindicación independientes están presentes en la reivindicación dependiente. En consecuencia, una reivindicación dependiente es la que contiene todas las características de la reivindicación de la cual depende y además: i) hace referencia a ésta; y ii) adiciona una o más características que limitan el objeto a proteger”² (énfasis fuera del texto).

En este sentido, es claro cuál es el concepto inventivo de la invención y que las características estructurales adicionales reclamadas hacen referencia a características limitativas de la invención, sin dejar de lado el concepto inventivo común. Pese a lo anterior, el Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto fue limitado eliminando las Reivindicaciones 9-12.

ii) Teniendo en cuenta todo lo anterior, considero respetuosamente que el Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto cumple con los requisitos de claridad y concisión establecidos en la Decisión 486, y a la luz del Manual Andino de Patentes (MAP) y el Instructivo de la SIC, permitiéndole a la persona medianamente versada en la materia comprender inequívocamente el alcance de la materia reclamada

3.4 a- El Despacho insiste en que WO01/90143 (D1) afecta la novedad de la Reivindicación 1 de la presente invención.

² Instructivo Examen de Solicitudes de Patentes de Invención y Modelo de utilidad. Superintendencia de Industria y Comercio. 2014. Sección 2.6.4.2

En particular, la SIC presenta la siguiente tabla comparativa entre las características esenciales de la Reivindicación 1 de la invención y D1:

Características Esenciales	D1
Composición inmunogénica	Composiciones inmunogénicas que comprenden una mezcla de proteínas pertactinas de diferentes especies del genero <i>Bordetella</i> (Pág. 3, Párr. 3).
Antígeno de <i>Bordetella bronchiseptica</i>	Antígeno de <i>Bordetella bronchiseptica</i> (Pág. 3, Párr. 3).
Antígeno de pertactina ap68 recombinante	Antígeno de pertactina (Pág. 3, Párr. 3). Las proteínas y polipéptidos de la invención pueden estar purificados. Las pertactinas y fragmentos de estas son esencialmente libres de asociación con otras proteínas o polipéptidos, como un producto de purificación de cultivo de células huésped recombinantes (Pág. 17, Párr. 5). En la especie <i>Bordetella bronchiseptica</i> , la pertactina es el producto del gen <i>pm</i> y es representado como una proteína con un <i>M</i> _r de 68KDa que corresponde a la proteína p68 (Pág. 6, Párr. 7).

El Despacho argumenta que las características esenciales de la composición inmunogénica que comprende *Bordetella bronchiseptica* y un antígeno de pertactina aislado habían sido divulgadas previamente en D1, por lo que la materia reclamada no es nueva.

b- Respetuosamente difiero de la opinión de la SIC, ya que la Reivindicación 1 de la invención reclama una composición de vacuna que comprende (i) *Bordetella bronchiseptica* y (ii) un antígeno de la proteína pertactina p68 recombinante.

D1 por su parte divulga proteínas pertactinas y los polinucleótidos que las codifican, pero no proporciona datos que soporten que la pertactina sola resulta útil como una composición de vacuna en los caninos. Particularmente, D1 divulga mezclas de pertactinas de diferentes especies de *Bordetella*. Tampoco proporciona divulgaciones en las que la proteína pertactina sea combinada con *Bordetella bronchiseptica* en una composición de vacuna como se reclama en la reivindicaciones de la presente invención. Por lo tanto, D1 no describe todas las características esenciales de la invención.

Adicionalmente, el Despacho se equivoca cuando señala que la página 3 párrafo 3 de D1 divulga el antígeno de *Bordetella bronchiseptica*, ya que en realidad dicho párrafo señala que la composición inmunogénica de D1 comprende mezclas de pertactinas de las especies de *Bordetella*, específicamente mezclas de variantes de pertactinas de *Bordetella bronchiseptica*. Sin embargo, D1 no divulga o sugiere una composición de vacuna que comprenda *Bordetella bronchiseptica*. De hecho, D1 describe específicamente una composición que comprende (a) pertactina de *Bordetella parapertussis* y (b) pertactina de *Bordetela bronchiseptica*, tal y como se muestra en el párrafo 3 de la página 3 de D1:

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.

This invention aids in fulfilling these needs in the art. In one embodiment, this invention provides an immunogenic composition comprising a mixture of pertactins of *Bordetella* species, wherein said composition comprises: (a) pertactin of *Bordetella parapertussis*, and (b) pertactin of *Bordetella bronchiseptica*, in amounts sufficient to induce a humoral or cellular immune response against *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* in an animal to which the immunogenic composition is administered. The immunogenic composition can also comprise pertactin of *Bordetella pertussis* in an amount sufficient to induce a humoral or cellular immune response against *Bordetella pertussis* in an animal to which the immunogenic composition is administered.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención presenta las siguientes diferencias frente a D1:

- la presente invención reclama una composición de vacuna que necesariamente comprende *Bordetella bronchiseptica* como uno de las características esenciales de la invención, mientras que D1 no divulga composiciones que comprendan *Bordetella bronchiseptica*. Por el contrario, D1 divulga composiciones que solo comprenden mezclas de pertactinas;
- aunque D1 menciona la pertactina P68 recombinante, no divulga que ésta pueda estar en combinación con *Bordetella bronchiseptica*, y mucho menos para formar una composición de vacuna, como en la presente invención.

En ese orden de ideas, es evidente que la divulgación de D1 no es igual a lo reclamado por la nueva Reivindicación 1. Por lo anterior, es importante resaltar que para fundamentar una afectación válida contra la novedad de una invención, el arte previo debe divulgar explícitamente todas y cada una de las características de la invención³. Es más, el Tribunal Andino de Justicia (TAJ) ha determinado que para establecer una objeción válida contra la novedad, la divulgación del arte previo debe ser lo suficientemente detallada para que una persona versada en la materia pueda usar dicha información para reproducir y explotar la invención⁴. Así las cosas, no es posible fundamentar una objeción de novedad con base en D1, pues éste no divulga una composición inmunógena que comprende (i) *Bordetella bronchiseptica* y (ii) un antígeno de la proteína pertactina p68 recombinante, tal y como lo reclama la presente invención, por lo que ésta es novedosa sobre D1.

c- Tal y como se demostró anteriormente, la Reivindicación 1 es novedosa frente a D1, por lo tanto, en caso de que el Despacho considere que existen objeciones relacionadas con el nivel inventivo de la Reivindicación 1, teniendo en cuenta que no se han recibido este tipo de objeciones

³ Manual Andino de Patentes. (2004). Sección 9.4. (disponible en <http://www.comunidadandina.org/public/patentes.pdf>).

⁴ Proceso 06-IP-89 (<http://intranet.comunidadandina.org/Documentos/Procesos/209-IP-2005.doc>); y Proceso 36-IP-2004 (<http://www.notinet.com.co/serverfiles/servicios/archivos/30jul04/ca36-04.htm>)

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.

a lo largo del trámite de la presente invención, en aras de no violar el debido proceso y respetar los derechos del solicitante, respetuosamente solicito se emita un segundo examen de fondo.

3.5 a- La SIC señala que D1, WO2006/106424 (D2), US2007/0082012 (D3) y el artículo "Bordetella Bsp22 forms a filamentous type III secretion system tip complex and is immunoprotective *in vitro* and *in vivo*"⁵ afectan el nivel inventivo de la presente invención.

i) El Despacho argumenta que la Reivindicación 5 carece de nivel inventivo a la luz de D1 y D2. D1 es considerado el arte previo más cercano a la invención, porque divulga composiciones inmunogénicas de vacuna que comprenden diferentes variantes de las proteínas pertactinas aisladas de la bacteria *Bordetella bronchiseptica*, en cantidades suficientes para inducir una respuesta inmune celular o humoral contra *Bordetella bronchiseptica*. La diferencia entre D1 y la invención es la concentración del antígeno de la proteína pertactina presente en dicha composición, sin embargo, no hay un efecto técnico asociado a la selección de un rango de concentración específico de pertactina.

El problema técnico objetivo que pretende resolver la invención es "*cómo proveer composiciones inmunogénicas alternativas que comprendan Bordetella bronchiseptica y un antígeno de pertactina p68 que presenten un efecto sinérgico protector, para la prevención y el tratamiento contra enfermedades respiratorias caninas*"

Sin embargo, el Despacho señala que el desarrollo de composiciones inmunogénicas de vacuna en la que están presentes la proteína pertactina p68 de *Bordetella bronchiseptica* en una concentración entre 2 µg a 100µg o entre 4 µg a 45 µg ya se encuentran divulgadas en D2. Por lo tanto, la persona medianamente versada en la materia incluiría la sugerencia del rango de concentraciones de D2 en la composición de D1 para llegar a la presente invención.

ii) El Despacho sostiene que D3 y D4 afectan el nivel inventivo de la Reivindicación 9. La diferencia entre la invención de la Reivindicación 9 y D3 es que la composición inmunogénica aquí reclamada comprende un antígeno Bsp22 lipado aislado. Sin embargo, el uso de Bsp22 como un componente inmnogénico para el tratamiento de las infecciones ocasionadas por *Bodetella bronchiseptica in vitro* e *in vivo* ya se encontraba divulgada en D4, por lo tanto, la Reivindicación 9 no es inventiva.

⁵ Medhekar, B., et al. (2009). Bordetella Bsp22 forms a filamentous type III secretion system tip complex and is immunoprotective *in vitro* and *in vivo*. *Molecular Microbiology*, 71(2), 792-504. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06549.x.

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.

iii) El Despacho señala que D1 y D3 afectan el nivel inventivo de la Reivindicación 10 de la invención, ya que el desarrollo de composiciones inmunogénicas que comprenden antígenos de un patógeno respiratorio canino tales como el virus de la influenza canina (CIV), el virus de parainfluenza canina (CPIV), el adenovirus canino tipo 2 (CAV – 2), y el coronavirus canino respiratorio (CRCV) entre otros, ya estaba divulgada en D3, por lo tanto, la Reivindicación 10 es obvia.

b- Frente a nuestros argumentos presentados, el Despacho señala:

- D1 sí divulga composiciones inmunogénicas que comprenden proteínas pertactinas, entre ellas la variante de pertactina *Bordetella bronchiseptica* para inducir una respuesta inmune.

- D1 enseña que la especie *Bordetella bronchiseptica* de la pertactina es el producto del gen pm y se representa como una proteína con un M_r de 68KDa que corresponde a la proteína p68y proporciona polipéptidos inmunogénicos.

- D3 sugiere antígenos caninos y vacunas que pueden ser combinados en una modalidad con la proteína pertactina p68 de *Bordetella bronchiseptica*.

- D4 si evidencia que la proteína efectora Bsp22 aislada de la bacteria *Bordetella bronchiseptica*, es un agente inmunogénico efectivo según los resultados de los ensayos de inmunización (con dicha proteína purificada in vitro e in vivo) realizados en ratones, que reduce significativamente los niveles de colonización bacteriana después de la infección intranasal en ratones

c- Considero superadas las objeciones de nivel inventivo sobre las Reivindicaciones 5, 9 y 10, en tanto dichas reivindicaciones que se encontraban dirigidas a una composición inmunogénica que además comprende Bsp22 lipado aislado y otros patógenos respiratorios caninos fueron eliminadas del Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto.

3.4. En conclusión, de acuerdo con la Resolución aquí recurrida, la SIC evidentemente:

- se equivoca al negar la Reivindicación 1 por falta de novedad;
- se equivoca al no determinar las diferencias existentes entre el arte previo y la Reivindicación 1;
- se equivoca al decir que D1 divulga dentro de la composición *Bordetella bronchiseptica*;

Si la SIC hubiese realizado un análisis acertado de las enseñanzas del arte previo y de los argumentos presentados en mi respuesta al primer y único examen de fondo, habría concluido que la presente invención es novedosa frente al arte previo citado.

4. Para terminar, de conformidad con lo establecido en el artículo 80 del Código de Procedimiento Administrativo y de lo Contencioso Administrativo, solicito respetuosamente que todos y cada uno de los puntos planteados en el presente recurso sean resueltos de manera individual, completa y motivada, respecto de las razones de hecho, derecho y/o conveniencia que lleven a esa Superintendencia a adoptar la decisión que estime frente a la solicitud aquí formulada.

5. NOTIFICACIÓN

Recibiré notificaciones en mis oficinas ubicadas en la Carrera 5 No. 34-03, de Bogotá.

Atentamente,



CARLOS R. OLARTE

C.C. No. 79.782.747 de Bogotá

T.P. 74.295

Anexos:

- Capítulo Reivindicatorio Modificado.
- ANEXO 1: Bordetella Bsp22 forms a filamentous type III secretion system tip complex and is immunoprotective in vitro and in vivo
- Recibo de pago correspondiente a la tasa por modificación voluntaria.

CAPITULO REIVINDICATORIO MODIFICADO
(Recurso de Reposición)

1. Una composición de vacuna que comprende (i) *Bordetella bronchiseptica* y (ii) un antígeno de la proteína pertactina P68 recombinante.
2. La composición de vacuna de la Reivindicación 1, en la que dicho antígeno de pertactina es una proteína de *Bordetella bronchiseptica*.
3. La composición de vacuna de cualquiera de las Reivindicaciones 1 o 2, en donde la *Bordetella bronchiseptica* es una bacterina, un extracto celular de *B. bronchiseptica* o una bacteria viva y atenuada de *B. bronchiseptica*.
4. La composición de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha composición no tiene adyuvantes.
5. La composición de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición está sustancialmente libre de agregados de antígenos de pertactina.
6. La composición de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el antígeno de pertactina está lipidado.
7. La composición de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha composición comprende además un diluyente o excipiente.

Cloning, nucleotide sequence and heterologous expression of the protective outer-membrane protein P.68 pertactin from *Bordetella bronchiseptica*

JINGLI LI,[†] NEIL F. FAIRWEATHER, PAVEL NOVOTNY, GORDON DOUGAN[‡] and IAN G. CHARLES*

Wellcome Research Laboratories, Langley Park, Beckenham, Kent BR3 3BS, UK

(Received 11 February 1992; revised 21 April 1992; accepted 7 May 1992)

The *prn* gene encoding the 68 kDa protective outer-membrane protein of *Bordetella bronchiseptica* (P.68 pertactin) was cloned, sequenced and expressed in *Escherichia coli*. The gene was isolated by DNA:DNA hybridization experiments using a radioactively-labelled fragment of the homologous *prn* gene from *Bordetella parapertussis*. DNA sequence analysis reveals that the gene is capable of encoding a protein with a molecular mass of 93 996 Da (P.94); this precursor molecule is processed to form the P.68 antigen on the surface of *B. bronchiseptica*. Heterologous expression of the full-length gene encoding P.94 in *Escherichia coli* results in similar processing, with the P.68 antigen targeted to the bacterial outer membrane. Comparison of P.94 with the P.93 and P.95 precursors, encoding homologous proteins from *Bordetella pertussis* and *B. parapertussis*, shows a high degree (>90%) of homology. The major differences between all three proteins occur in the number of repeats of the two families (Gly-Gly-Xaa-Xaa-Pro)_n and (Pro-Gln-Pro)_n of reiterated sequence motifs.

Introduction

Bordetella bronchiseptica (Pittman, 1984) is a bacterial pathogen associated with respiratory diseases in animals, particularly atrophic rhinitis in pigs (Harris & Switzer, 1968; Goodnow, 1980). The disease state is recognised by severe changes in the nasal architecture of developing piglets, pneumonia and growth retardation (Harris & Switzer, 1968). We have demonstrated that protection against *B. bronchiseptica*-mediated atrophic rhinitis correlates with the presence of an outer-membrane protein with a molecular mass of 68 kDa as determined

by SDS-PAGE (Novotny *et al.*, 1985b). Antibodies to this 68 kDa protein can be detected in high titre in protected piglets, while the titre is low or absent from non-protected animals (Novotny *et al.*, 1985b). Furthermore, a naturally occurring mutant of *B. bronchiseptica* lacking the 68 kDa protein is unable to protect piglets when used as a vaccine and is unable to induce pathological changes in infected piglets (Novotny *et al.*, 1985b). Administration of a vaccine consisting of a purified preparation of the 68 kDa protein to pregnant sows results in significant protection of the resulting piglets when challenged with virulent *B. bronchiseptica* (Kobisch & Novotny, 1990). In addition, passively administered monoclonal antibody BB05 (Novotny *et al.*, 1985a, specific for the 68 kDa protein) was able to prevent death from pneumonia and development of atrophic rhinitis in mice that had been aerosol-infected with a virulent strain of *B. bronchiseptica*.

The 68 kDa protein is a member of an immunologically cross-reactive family of *Bordetella* spp. outer-membrane proteins that are represented in *Bordetella parapertussis* as a 70 kDa moiety (P.70) and in *Bordetella pertussis* as a 69 kDa (P.69) species. The P.69 antigen has been demonstrated to be a protective antigen against *B. pertussis* infections in a mouse aerosol model (Shahin *et al.*, 1990) and in the mouse intracerebral challenge model (Novotny *et al.*, 1985a) and is currently under evaluation as a component of future acellular vaccines against

* Author for correspondence Tel. (081) 658 9966, ext. 6506; fax. (081) 650 0725

[†] Present address: Vaccine Research Unit, Medeva Group Research, Imperial College of Science, Medicine and Technology, London SW7 2AL, UK.

[‡] Present address: Department of Biochemistry, Imperial College of Science, Medicine and Technology, London SW7 2AL, UK.

Abbreviations: The designations P.68/P.94, P.69/P.93, P.70/P.95 refer to the pertactin family of outer-membrane proteins expressed in *B. bronchiseptica*, *B. pertussis* and *B. parapertussis* respectively with molecular masses of 68, 69 and 70 kDa. The initial number (e.g. P.68) refers to the apparent molecular mass (kDa) of the processed form of the antigen that appears on the bacterial surface, while the second number (e.g. P.94) refers to the molecular mass of the unprocessed precursor as inferred from the DNA sequence.

The nucleotide sequence reported in this paper has been submitted to the EMBL Database and has been assigned the accession number X54815.

whooping cough (Novotny *et al.*, 1991; Romanos *et al.*, 1991). P.69 has also been shown to be an agglutinin (Brennan *et al.*, 1988) that can promote attachment to certain eukaryotic cells via an Arg-Gly-Asp (RGD) tripeptide sequence (Leininger *et al.*, 1991). Such sequences have been characterized for a number of eukaryotic cell-cell (Ruoslahti *et al.*, 1988) and virus-cell (Fox *et al.*, 1989) attachment processes. Because of the cell attachment behaviour of the P.69 antigen it has been renamed pertactin, the product of the *prn* gene. Nothing is known about the immunological properties of the P.70 antigen from *B. parapertussis*, although it shares high homology with the P.69 protein (Li *et al.*, 1991; Charles *et al.*, 1989) including a putative RGD binding site.

In this paper we report the cloning and characterization of the gene encoding the 68 kDa antigen from *B. bronchiseptica* (P.68 pertactin) and show it to be highly homologous to its counterparts from *B. pertussis* and *B. parapertussis*. Expression of the full-length gene, capable of encoding a protein with a calculated molecular mass of 93996 Da, in *Escherichia coli* results in the appearance of a 68 kDa form of the protein on the bacterial outer membrane. Native P.68 antigen can only be purified at low levels from cultures of *B. bronchiseptica*, but by utilizing a recombinant approach we hope to be able to produce larger samples of P.68 antigen that are completely uncontaminated by other *B. bronchiseptica* components. This will facilitate the understanding of both the molecular biological and immunological properties of this molecule.

Methods

Bacterial strains, plasmids and phage. *B. bronchiseptica* strain CN7531 was from the Wellcome culture collection (Wellcome Biotech, UK). *E. coli* K12 strains TG1 and HB101 were as previously described (Carter *et al.*, 1985; Boyer & Roulland-Dussoix, 1969). Cosmid pHC79 (Hohn & Collins, 1980) was from Amersham International. Plasmid pKK233-2 (Amann & Brosius, 1985) and M13mp18 and M13mp19 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) were supplied by Pharmacia. The P.69 and P.70 expression plasmids pAYL1 and pBD845 have been described previously (Li *et al.*, 1991). Plasmid pBSSKII⁺ (Bluescript) was from Stratagene. *E. coli* strains were grown in Luria broth (LB) or LB solidified with 1.6% (w/v) agar (Miller, 1972). *B. bronchiseptica* was grown in Stainer-Scholte (Stainer & Scholte, 1962) broth or medium as previously described (Novotny *et al.*, 1985a).

DNA isolation and manipulations. *B. bronchiseptica* CN7531 chromosomal DNA was prepared as described previously (Hull *et al.*, 1981). Plasmid and bacteriophage DNA were isolated and purified by standard methods (Maniatis *et al.*, 1982). All DNA-modifying enzymes were from Gibco BRL.

Construction of a *B. bronchiseptica* genomic library. Cosmid pHC79 DNA was digested with *Bam*HI and ligated with *Sau*3A-digested *B. bronchiseptica* DNA in the 40–50 kb size range as described previously (Charles *et al.*, 1990). The gene bank was plated out and 480 randomly selected colonies transferred to microtitre plates as described previously (Charles *et al.*, 1990). Colonies were transferred to Gene Screen

Plus hybridization membranes (Du Pont) and hybridized with an α^{32} P-labelled *Cla*I fragment of the *prn* gene encoding the P.70 protein from *B. parapertussis* (Li *et al.*, 1991) as described previously.

Subcloning and DNA sequencing. Recombinant phage DNA was sequenced after ligation of specific restriction endonuclease fragments of cosmid into the vectors M13mp18 and M13mp19. Sequencing was carried out using universal primer, [α^{32} S]dATP and both gradient and wedge gels (Biggin *et al.*, 1983; Sanger *et al.*, 1977). Some clones were sequenced with modified T7 DNA polymerase (Tabor & Richardson, 1987) and 7-deaza-2-dGTP (Mizusawa *et al.*, 1986) using a kit supplied by Pharmacia. Gaps in the sequence were filled in using synthetic oligonucleotides made on a MilliGen 7500 DNA synthesizer (Millipore, UK) as specific primers (Charles *et al.*, 1986).

Amino acid sequencing and immunological characterization. P.68 pertactin was purified as described previously (Novotny *et al.*, 1985b) and protein sequence determined by using an Applied Biosystems 470-A gas-phase microsequencer. *E. coli* lysates harbouring recombinant P.68, P.69 and P.70 protein were prepared by harvesting 5 ml overnight cultures of *E. coli* TG1 grown in L-broth harbouring either pBD881 (P.68), pAYL1 (P.69) or pBD845 (P.70). Cell pellets were washed once in L-broth and 0.1 OD₆₅₀ units were subjected to SDS-PAGE (Maniatis *et al.*, 1982). Proteins were transferred to nitrocellulose by the method of Towbin *et al.* (1979). The monoclonal antibody BB05 (Montaraz *et al.*, 1985; Novotny *et al.*, 1985a) was used to detect P.68 protein using horse-radish-peroxidase-conjugated goat antimouse second antibody and 4-chloro-1-naphthol as substrate (Fairweather *et al.*, 1986). To test for surface expression of recombinant P.68, slide agglutination assays were carried out as described previously (Li *et al.*, 1991).

Results

Isolation of the gene encoding the P.68 antigen

The *B. bronchiseptica* genomic library was screened by hybridization with a radioactively-labelled 1.8 kb *Cla*I fragment of the *prn* gene encoding the P.70 antigen from *B. parapertussis* (Li *et al.*, 1991). Of the two cosmids returning a positive signal, one, designated pBD844, was selected for further analysis. Restriction mapping and Southern blotting experiments carried out on pBD844 demonstrated that the *Cla*I and *Sal*I hybridization pattern of the *prn* gene from *B. bronchiseptica* was identical to that described for both *B. pertussis* (Charles *et al.*, 1989) and *B. parapertussis* (Li *et al.*, 1991). These *Cla*I and *Sal*I fragments were therefore assumed to contain the entire *prn* gene encoding the P.68 pertactin and were cloned into Bluescript pBSSKII⁺ to generate pBD875 (*Cla*I) and pBD856 (*Sal*I); they were also cloned into M13mp18 and M13mp19 for DNA sequencing.

Nucleotide sequence of the *prn* gene encoding P.68: comparison with the equivalent genes from *B. pertussis* and *B. parapertussis*.

The DNA sequence was obtained initially from the *Cla*I and *Sal*I fragments cloned into M13 and using universal

Fig. 1. DNA sequence of the *prn* gene encoding the P.68 pertactin from *B. bronchiseptica*. Downward arrows indicate the sites of two possible protein cleavage regions that result in the production of the mature polypeptide. Arrows over protein sequence denotes two protein repeat motifs: (i) (GGXXP)₃ encoded by nucleotides 939–983 and (ii) (PQP)₃ encoded by nucleotides 1852–1947. An RGD tripeptide sequence encoded by nucleotides 922–930 that occurs in the surface-exposed processed P.68 form of the protein is shown overlined. An additional RGD tripeptide motif occurs between residues 2245–2253 within the C-terminal fragment of P.94 that is clipped off during the processing of P.68. An inverted repeat followed by a run of T-residues, resembling a rho-independent transcription terminator, is shown between residues 2898–2909.

P.68	MNMSLSRIVLAAPLRRTTLAMALGALGAAPAYADWNNQSIKAGERQHGIHIKQSDGAGVRTATCTTIK	70aa.
P.70	K.....Y.....I.A.....KQ..GA.....T.....	70aa.
P.69	X.....H.....V.T.....QG..PG.....S.....	70aa.
P.68	VSGRQAQGVLENPAELRFQNGSVTSSGQLFDEGVRRFLGTVTVKAGKLVADHATLANVSDTRDDGIA	140aa.
P.70	V.....R.Q.....F.E.V.....S..R.....	140aa.
P.69	I.....Q.R.....S.D.I.....G..W.....	140aa.
P.68	LYVAGEQAQASIADSTLQAGGVRVERGANVTQVSTIVDGGHIGTLQPLQPEDLPPSRVVLGDTSVTA	210aa.
P.70	RV.....T.....T..P.....G..S.....	210aa.
P.69	QI.....A.....A..S.....R..N.....	210aa.
P.68	VPASGAPAAVSVFGANELTVDCGHITCGRAAGVAAMDGAIVHLQRATIRRGDAPAGGAVPGGAVPGG***	277aa.
P.70	F.F..N..V.....D..I.....AVP	280aa.
P.69	S.L..S..L.....Q..V.....AVP	280aa.
P.68	*****FCPLLDGWYGVDSSTVDLAQSIVEAPQLGAAIRAGRGARVTVSCGSLSAPHGNVIETGGGA	340aa.
P.70	*****GC...L.....D.T.D.....Q.....A.....G.....	345aa.
P.69	GGFGPGG...V.....G.S.E.....E.....V.....*	349aa.
P.68	RRFPPPPASPLSITLQAGARAQGRALLYRVLPEPVKLTLAGCAQGGDIVATELPPPGASSGPLDVALAS	410aa.
P.70	...P.P.S.....R..R.....A...QG.....P...A.S.....	415aa.
P.69	...A.Q.A.....H..K.....T...DA.....S...T.I.....	419aa.
P.68	QARWIGATRAVDSLSIDNATWMTDWSNVGALRLASDGSVDFQPAEACRFKCLMVDTLAGSGLFRMNVF	480aa.
P.70	V.M.D.....	485aa.
P.69	V.T.N.....	489aa.
P.68	ADLGLSDKLVVMDASGQKRLVLRNSGSEPAAGNTMLLVQTPRGSAATFTLANKDGKVDIGTYRYRLAAN	550aa.
P.70	R.....W.....G..M.....R.....	555aa.
P.69	Q.....W.....A..L.....L.....	559aa.
P.68	GNGQWSLVGAKAPPAPKAPQPGPQPG*****PQPPQPPQPPQPPQPEAPAPQPPAGRELSAANA	614aa.
P.70	GPQPPQPPQPPQPPQ.....R.....	625aa.
P.69	*****.....*	613aa.
P.68	VNTGCVGLASTLWYAESNALSKRLGELRLNPDAGGANGRCFAQRQQLDNRAGRFRDQKVAGFELGADHAV	684aa.
P.70		695aa.
P.69		683aa.
P.68	AVAGGRMHGLGLAGYTRGDRGFTGDDGGHTDSVHVGGYATYIANSGFYLDATLRASRLNDFKVASDGY	754aa.
P.70	N.....	765aa.
P.69	D.....	753aa.
P.68	AVKGYRTHGVGASLEAGRRFAHADGMFLPQAEALAVFRVGGGSVRAANGLRVRDEGSSVLGRLGLEVG	824aa.
P.70	V.....A.....V..A.....	835aa.
P.69	A.....T.....A..A.....	823aa.
P.68	KRIELAGGRQVQPYIKASVLQEPDGAQTVRTNCIAMPTLRCRAELGLGMAAALGRGHSLYASVEYSKC	894aa.
P.70	R.....	905aa.
P.69	H.....	893aa.
P.68	PKLAMPWTFHAGYRYSW	911aa.
P.70		922aa.
P.69		910aa.

Fig. 2. Protein sequence alignment of the P.68, P.70 and P.69 pertactins from *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis* and *B. pertussis*, respectively. Downward arrows represent the position of likely protein cleavage sites. *, Missing residue within the alignment. The P.69 sequence has two corrections from the version published in Charles *et al.*, 1989; these are (i) at amino acid 264, where proline replaces leucine, and (ii) at amino acid 322 where serine replaces proline. These corrections have been reported to the sequence data bases.

primer; the overlapping sequence was compiled using a set of synthetic oligonucleotides as specific sequence primers. Computer analysis of the DNA sequence (Fig. 1) demonstrates that the ORF for the *prn* gene of P.68 pertactin is capable of encoding a protein with a molecular mass of 93996 Da (P.94). The molecular mass

of the mature protein found on the surface of *B. bronchiseptica* is, however, 68000 Da as judged by SDS-PAGE, suggesting that this molecule is a processed form of the larger precursor. By comparison with the P.69 antigen, this processing is likely to involve the removal of both N-terminal and C-terminal sequences. N-terminal

protein sequencing of purified preparations of P.68 from *B. bronchiseptica* gave the sequence Asp-Trp/Gln-Asn-Asn-Gln-Gln/Ser-Ile-Xaa-Lys-Ala. This sequence, despite having three regions of ambiguity, aligns with amino acid residues 35–44 in Fig. 2 and confirms that in common with the P.70 and P.69 sequences, a signal peptide is cleaved in the maturation process of P.68 pertactin. Cleavage of this signal peptide, of between 32 or 34 amino acid residues depending on which ATG initiation codon is used, occurs after the sequence Ala-Tyr-Ala, which is in agreement with the Ala-Xaa-Ala motif reported to be recognized by *E. coli* signal peptidases (Perlman & Halvorson, 1983). Towards the C-terminus of the P.68 protein at residues 602–603 (numbering the Asp produced after signal peptide cleavage as residue 1) is a dibasic pair of amino acids, Lys-Arg, that occur in the same position, and are flanked by identical residues, as are found in the P.69 pertactin from *B. pertussis*. This Lys-Arg sequence in *B. pertussis* was originally identified as a putative cleavage site involved in the production of the mature form of the protein (Makoff *et al.*, 1990). More recently, Capiou *et al.* (1990) have reported that purified preparations of P.69 have a C-terminal Asn residue. This Asn residue at amino acid residue position 597 is closely positioned to the Lys-Arg motif in the sequence Asn-Ala-Leu-Ser-Lys-Arg (Fig. 2). The precise processing events responsible for the generation of this C-terminal sequence are still unknown.

A comparison of the deduced protein sequences for the P.68, P.69 and P.70 proteins (Fig. 2) demonstrates the high degree of homology between the proteins. A comparison between the P.68 and P.70 proteins shows only 17 amino acid differences, while a similar comparison between P.68 and P.69 shows 80 differences and between P.69 and P.70 there are 79 differences. The majority of amino acid differences between the three deduced protein sequences occur in the number of repeat units in the two families of repeat sequences present in all three proteins. Thus, P.68 has three copies of the Gly-Gly-Xaa-Xaa-Pro repeat while P.70 has four and P.69 five. Similarly, P.68 has seven Pro-Gln-Pro repeats, P.70 has nine and P.69 has five. These findings suggest that the P.68 sequence from *B. bronchiseptica* and the P.70 sequence from *B. parapertussis* are more closely related to each other than either are to the P.69 sequence from *B. pertussis*. The finding of close sequence homology between *B. bronchiseptica* and *B. parapertussis* is in agreement with the evolutionary trees produced by Altschul (1989), based on a re-analysis of the sequence of the pertussis toxin operons from all three Bordetella species (Arico *et al.*, 1987).

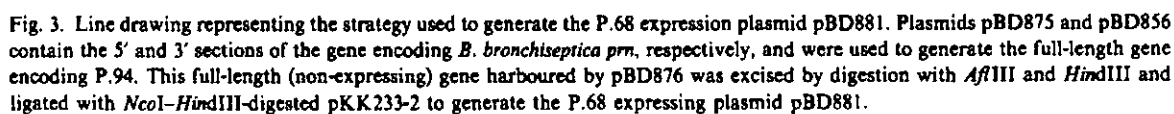
Examination of the first 140 bp of the DNA sequence in Fig. 1 shows that there are no good fits with either the

consensus ribosome binding site (Shine & Dalgarno, 1975) or consensus promoter elements identified for *E. coli* genes (Rosenberg & Court, 1979). In common with the genes encoding both P.68 and P.69, there is an inverted repeat after the stop codon, and then a run of T-residues. This sequence resembles the rho-independent-like terminator that is also found at the end of the *B. pertussis* *ptx* operon (Charles *et al.*, 1989).

Heterologous expression of P.68 pertactin in E. coli

Cosmid pBD844 harbouring the *B. bronchiseptica* *prn* gene was unable to direct the expression of P.68 pertactin in *E. coli*. To express the gene in *E. coli*, the entire structural gene was cloned into the expression plasmid pKK233-2. Fig. 3 outlines the expression strategy; an *EcoRI*–*EcoRV* fragment comprising the 5' end of P.68 *prn* from plasmid pBD875 was ligated into *EcoRV*–*EcoRI* digested pBD856 (containing the 3' end of P.68 *prn*) to generate pBD876 containing the entire structural gene. Plasmid pBD876 was digested with *AflIII*–*HindIII* and ligated with *NcoI*–*HindIII*-digested pKK233-2. This ligation mixture was used to transform *E. coli* TG1 and transformants expressing P.68 pertactin identified by their ability to cross-react with the mAb BB05 in protein dot-blots.

Colonies returning a positive signal were isolated and plasmid minipreps carried out to verify that a full-length insert had been cloned. One such plasmid, pBD881, was selected for further study. Fig. 4 shows the result of a Western blot of an SDS-PAGE gel of *E. coli* TG1 harbouring (1) pBD845 (P.70/P.95); *B. parapertussis*, (2) pAYL1 (P.69/P.93); *B. pertussis*, (3) pBD881 (P.68/P.94); *B. bronchiseptica* and (4) pKK233-2. The arrows represent the position of bands corresponding to proteins with molecular masses of 70 kDa (*B. parapertussis*), 69 kDa (*B. pertussis*) and 68 kDa (*B. bronchiseptica*). For both the plasmids expressing the P.70/P.95 and P.69/P.93 proteins, larger bands corresponding to the full-length 95 kDa and 93 kDa species are present in addition to a large number of lower molecular mass bands. Surprisingly, the P.68 expression construct does not produce a detectable 94 kDa higher molecular mass band, but instead produces a pair of stronger bands at around 69 kDa and 68 kDa. The pattern of bands produced for P.69 and P.70 pertactin expression differs from that reported in our earlier work (Li *et al.*, 1991). This discrepancy may be due to the different growth conditions used in preparing the lysates for Western blotting. The constructs pBD881, pBD845 and pAYL1 direct the expression of P.68, P.69 and P.70, respectively, under the control of the *tac* promoter and IPTG induction. In preliminary experiments, the use of IPTG



To test whether or not the P.68 protein was expressed on the surface of *E. coli*, slide agglutination assays were carried out using both monoclonal antibody BB05 and polyclonal anti-P.69 antibody (Li *et al.*, 1991). Agglutination occurred just as rapidly with *E. coli* harbouring pDB881 as with *vir*⁺ *B. bronchiseptica*, suggesting that the

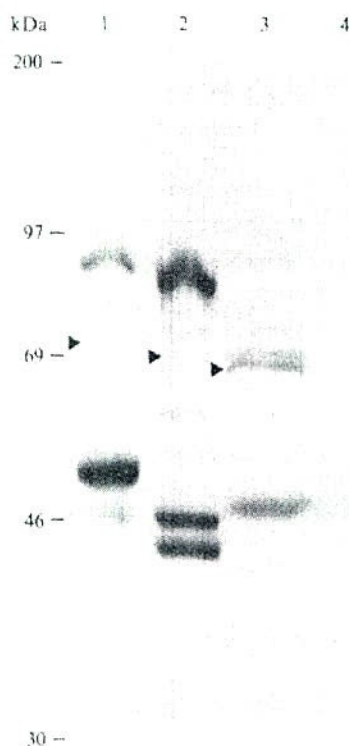


Fig. 4. Western blot showing the expression of the pertactin family of proteins in *E. coli* TG1. Samples were prepared as described in Methods and reacted with the monoclonal antibody BB05. Lanes: 1, P.70/P.95 pertactin; 2, P.69/P.93 pertactin; 3, P.68/P.94 pertactin; 4, (negative control), pKK233-2. Arrows indicate positions of protein bands corresponding to the 70 kDa, 69 kDa and 68 kDa species. There is no signal from the negative control (track 4). In lanes 1 and 2, heavy bands can be seen just below the 97 kDa molecular mass marker. These bands probably correspond to the full-length protein precursors for P.70 and P.69. By contrast, there is no apparent band for the full-length P.68 precursor. For all three proteins, lower molecular mass bands cross-reacting with BB05 monoclonal antibody indicate that the proteins are substantially degraded in *E. coli*.

heterologous protein is surface-located. Both the positive control strains of *E. coli* expressing P.69 (pAYL1) and P.70 (pBD845) on their surface were able to demonstrate agglutination (Li *et al.*, 1991).

Discussion

Protection against *B. bronchiseptica*-mediated atrophic rhinitis in animals correlates with the presence of a 68 kDa protein (Novotny *et al.*, 1985b). In this paper we report the cloning, sequencing and expression of this protective antigen in *E. coli*. The *B. bronchiseptica* P.68

antigen belongs to a family of outer membrane immunologically cross-reactive proteins. In *B. pertussis*, a homologous protein has been characterized with a molecular mass of 69 kDa, as judged by PAGE, and has been the subject of much recent study as a potential candidate for inclusion in new generations of acellular whooping cough vaccines (Charles *et al.*, 1989, 1991; Shahin *et al.*, 1990; Novotny *et al.*, 1991; Romanos *et al.*, 1991; Roberts *et al.*, 1992). So far there has been little study of the equivalent P.70 protein from *B. paraptussis*, although we have recently isolated and sequenced the gene encoding the protein (Li *et al.*, 1991). A comparison between the deduced sequences for the P.68, P.69 and P.70 pertactins reveals a high degree of homology, with the *B. paraptussis* and *B. bronchiseptica* proteins being more similar to each other than to the P.69 protein from *B. pertussis*. The main regions of sequence divergence between the three proteins occur in the number of repeats within the repeated regions. The region spanning the Pro-Gln-Pro family of repeats has been demonstrated to be the immunodominant part of the P.69 molecule (Charles *et al.*, 1991). Differences in this region may have significance in determining the degree of immunological cross-reactivity between the different molecules, and may account for the observation that sera from piglets that cross-reacted in ELISA with preparations of P.68 failed to react with P.69 (Kobisch & Novotny, 1990) despite the high degree of homology between the proteins.

It has been demonstrated that the P.69 protein has the ability to bind to CHO cells in culture. This binding is mediated, at least in part, by an Arg-Gly-Asp (RGD) tripeptide sequence; a mechanism that has been characterized for a variety of adhesive proteins (Ruoslahti, 1988) including *B. pertussis* filamentous hemagglutinin (Relman *et al.*, 1990) and may suggest that P.69 has a role in bacterial adhesion. The finding of a similar RGD sequence in the P.68 pertactin also suggests that this protein may have a role in bacterial adhesion, and thus play a role in virulence. The expression of the P.68 protein on the surface of *E. coli* should enable us to produce recombinant protein that is uncontaminated by other *B. bronchiseptica* components for both immunological and cell-adhesion evaluation.

We thank Hugh Spence for making the oligonucleotides used in the sequencing strategy, Martin Merrett for N-terminal protein sequencing and Tina Silva for typing the manuscript.

References

- ALTSCHUL, S. F. (1989). Evolutionary trees for the genus *Bordetella*. *Journal of Bacteriology* **171**, 1211-1213.
- AMMAN, E. & BROSIUS, J. (1985). 'ATG' vectors for regulated high-level expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *Gene* **40**, 183-190.

- ARICO, B., GROSS, R., SMIDA, J. & RAPPUOLI, R. C. (1987). Evolutionary relationships in the genus *Bordetella*. *Molecular Microbiology* **1**, 301-308.
- BIGGIN, M. D., GIBSON, T. J. & HONG, G. F. (1983). Buffer gradient gels and $\alpha^{32}\text{P}$ -S label as an aid to rapid DNA sequence determination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**, 3963-3965.
- BOYER, H. W. & ROULLAND-DUSOIX, D. (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* **41**, 459-465.
- BRENNAN, M. J., ZHONG, M. L., COWELL, J. L., BISHER, M. E., STEVEN, A. C., NOVOTNY, P. & MANCLARK, C. R. (1988). Identification of a 69-kilodalton non-fimbrial protein as an agglutinin of *Bordetella pertussis*. *Infection and Immunity* **56**, 3189-3195.
- CAPAU, C., CARR, S. A., HEMLING, M. E., PLAINCHAMP, D., CONRATH, K., HAUSER, P., SIMOEN, E., COMBERBACH, M., ROELANTS, P., DESMONS, P., PERMANNE, P. & PETRE, J. O. (1990). Purification, characterisation and immunological evaluation of the 69-kDa outer membrane protein of *Bordetella pertussis*. In *Proceedings of the Sixth International Symposium on Pertussis* [DHHS Publication no. (FDA) 90-1164], pp. 75-86. Edited by C. R. Manclark. Bethesda, Maryland: Department of Health and Human Services, United States Public Health Service.
- CARTER, P., BEDOUELL, H. & WINTER, G. (1985). Improved oligonucleotide site directed mutagenesis using M13 vectors. *Nucleic Acids Research* **13**, 443-444.
- CHARLES, I. G., KEYTE, J., BRAMMAR, W. J., SMITH, M. & HAWKINS, A. R. (1986). The isolation and nucleotide sequence of the complex AROM locus of *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Research* **14**, 2201-2213.
- CHARLES, I. G., DOUGAN, G., PICKARD, D., CHATFIELD, S., SMITH, M., NOVOTNY, P., MORRISSEY, P. & FAIRWEATHER, N. F. (1989). Molecular cloning and characterization of protective outer membrane protein P.69 from *Bordetella pertussis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 3554-3558.
- CHARLES, I. G., LAMB, H. K., PICKARD, D., DOUGAN, G. & HAWKINS, A. R. (1990). Isolation, characterization and nucleotide sequences of the *aroC* genes encoding chorismate synthase from *Salmonella typhi* and *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology* **136**, 353-358.
- CHARLES, I. G., LI, J., ROBERTS, M., BEESLEY, K., ROMANOS, M., PICKARD, D. J., FRANCIS, M., CAMPBELL, D., DOUGAN, G., BRENNAN, M. J., MANCLARK, C. R., AU JENSEN, M., HERON, I., CHUBB, A., NOVOTNY, P. & FAIRWEATHER, N. F. (1991). Identification and characterisation of a protective immunodominant B-cell epitope of pertactin from *Bordetella pertussis*. *European Journal of Immunology* **21**, 1147-1153.
- FAIRWEATHER, N. F., LYNNESS, V. A., PICKARD, D., ALLEN, G. & THOMSON, R. O. (1986). Cloning, nucleotide sequencing and expression of tetanus toxin fragment C in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **165**, 21-27.
- FOX, F., PARRY, N. R., BARNETT, P. V., MCGINN, B., ROWLANDS, D. J. & BROWN, F. (1989). The cell attachment site on Foot-and-Mouth disease virus includes the amino acid sequence RGD (Arginine-Glycine-Aspartic Acid). *Journal of General Virology* **70**, 625-637.
- GOODNOW, R. A. (1980). Biology of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiological Reviews* **44**, 722-738.
- HARRIS, D. L. & SWITZER, W. P. (1968). Turbinate atrophy in young pigs exposed to *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* and combined inoculum. *American Journal of Veterinary Research* **29**, 777-785.
- HOHN, B. & COLLINS, J. (1980). A small cosmid for efficient cloning of large DNA fragments. *Gene* **11**, 291-298.
- HULL, R. A., GILL, R. E., HSU, P., MINSHAW, B. H. & FALKOW, S. (1981). Construction and expression of recombinant plasmids encoding type 1 or D-mannose resistant pili from a urinary tract infection *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* **33**, 933-938.
- KOBISCH, M. & NOVOTNY, P. (1990). Identification of a 68-kilodalton outer membrane protein as the major protective antigen of *Bordetella bronchiseptica* by using specific-pathogen-free piglets. *Infection and Immunity* **58**, 352-357.
- LEININGER, E., ROBERTS, M., KENIMER, J. G., CHARLES, I., FAIRWEATHER, N., NOVOTNY, P. & BRENNAN, M. J. (1991). Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 345-349.
- LI, J. L., DOUGAN, G., NOVOTNY, P. & CHARLES, I. G. (1991). P.70 pertactin an outer membrane protein from *Bordetella pertussis*: cloning, nucleotide sequence and surface expression in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **5**, 409-417.
- MAKOFF, A. J., OXER, M. D., BALLANTINE, S. P., FAIRWEATHER, N. F. & CHARLES, I. G. (1990). Protective surface antigen P.69 of *Bordetella pertussis*: its characterization and very high level expression in *Escherichia coli*. *Bio/Technology* **8**, 1030-1033.
- MANIATIS, T., FRITSCH, E. E. & SAMBROOK, J. (1982). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- MILLER, J. M. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- MONTARAZ, J. A., NOVOTNY, P. & IVANYI, J. (1985). Identification of a 68-kilodalton protective antigen from *Bordetella bronchiseptica*. *Infection and Immunity* **47**, 744-751.
- MIZUSAWA, S., NISHIMURA, S. & SEELA, F. (1986). Improvements of the dideoxy chain termination method of DNA sequencing by use of deoxy-7-deazaguanosine triphosphate in place of dGTP. *Nucleic Acids Research* **14**, 1319-1324.
- NOVOTNY, P., CHUBB, A. P., COWNLEY, K., MONTARAZ, J. A. & BEESLEY, J. E. (1985a). *Bordetella* adenylate cyclase: a genus-specific protective antigen and virulence factor. In *Proceedings of the Fourth International Symposium on Pertussis. Development of Biological Standards* **61**, 27-41.
- NOVOTNY, P., KOBISCH, M., COWNLEY, K., CHUBB, A. P. & MONTARAZ, J. A. (1985b). Evaluation of *Bordetella bronchiseptica* vaccines in specific-pathogen-free piglets with bacterial cell surface antigens in enzyme-linked immunosorbent assay. *Infection and Immunity* **50**, 190-198.
- NOVOTNY, P., CHUBB, A. P., COWNLEY, K. & CHARLES, I. G. (1991). Biological and protective properties of the 69-kDa outer membrane protein of *Bordetella pertussis*: a novel formulation for an acellular pertussis vaccine. *Journal of Infectious Diseases* **164**, 114-122.
- PERLMAN, D. & HALVORSON, H. O. (1983). A putative signal peptidase recognition site and sequence in eukaryotic and prokaryotic peptides. *Journal of Molecular Biology* **167**, 391-409.
- PITTMAN, M. (1984). Genus *Bordetella*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. I, pp. 388-393. Edited by N. R. Krieg, J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
- RELMAN, D., TOUMANEN, E., FALKOW, S., GOLENBOCK, D. T., SAKKONEN, K. & WRIGHT, S. D. (1990). Recognition of a bacterial adhesin by an integrin: macrophage CR3 (MB₂, CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Cell* **61**, 1371-1382.
- ROBERTS, M., TITE, J. P., FAIRWEATHER, N. F., DOUGAN, G. & CHARLES, I. G. (1992). Recombinant P.69/Pertactin: immunogenicity and protection of mice against *Bordetella pertussis*. *Vaccine* **10**, 43-48.
- ROMANOS, M. A., CLARE, J. J., BEESLEY, K. M., RAYMENT, F. B., BALLANTINE, S. P., MAKOFF, A. J., DOUGAN, G., FAIRWEATHER, N. F. & CHARLES, I. G. (1991). Recombinant *Bordetella pertussis* pertactin (P.69) from the yeast *Pichia pastoris*: high-level production and immunological properties. *Vaccine* **9**, 901-906.
- ROSENBERG, M. & COURT, D. (1979). Regulation sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. *Annual Review of Genetics* **13**, 319-353.
- RUOSLAHTI, E. (1988). Fibronectin and its receptors. *Annual Review of Biochemistry* **57**, 375-413.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **71**, 5463-5467.
- SHAHIN, R. D., BRENNAN, M. J., LI, Z. M., MEADE, B. D. & MANCLARK, C. R. (1990). Characterization of the protective capacity and immunogenicity of the 69 kD outer membrane protein of *Bordetella pertussis*. *Journal of Experimental Medicine* **171**, 63-73.

- SHINE, J. & DALGARNO, L. (1975). Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes. *Nature, London* **254**, 34-38.
- STAINER, D. W. & SCHOLTE, M. J. (1962). A simple chemically defined medium for the production of phase I *Bordetella pertussis*. *Journal of General Microbiology* **63**, 211-220.
- TABOR, S. & RICHARDSON, C. C. (1987). DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences in the United States of America* **84**, 4767-4771.
- TOWBIN, J., STAHELIN, R. & GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 4350-4354.
- YANISCH-PERRON, C., VIEIRA, J. & MESSING, J. (1985). Improved M13 phage vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 15 - 0066457

Bogotá D.C., Junio 11 de 2015 - 10:41:17

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS

NI 830.122.870

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	705549390	10/06/2015	8.240.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-03 CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICACIONES EN CREACION CORRECCION A SOLICITUD EN TRAMITE / MODIFICA		132.000.00	132.000.00
				\$132.000.00

SON: **CIENTO TREINTA Y DOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-184705-00008-0000

Fecha: 2015-06-12 16:58:55 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra 11 PATENTEIYII Eve 378 FASENACIONALI
Act 412 REPOSPRESRECU Folios 20

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Junio 11 de 2015 - 10:41:22