

No. 12-041846-00000-0000

Fecha: 2012-03-09 16:34:24

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 379 FASENACIONALII

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 113

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 112

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO Anticuerpos Monoclonales
Para proteína PBP_{2a} y secuencias
Homologas para el tratamiento de
infecciones e inmunodiagnostico en bacterias

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE Fundação Oswaldo

DOMICILIO Brasil

74. APODERADO Juan Carlos Uribe

22. BOGOTÁ, D.C., Marzo 9/12

PETI		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO																
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		 No. 12-041846- -00000-0000 Fecha: 2012-03-09 16:34:24 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII Act. 411 PRESENTACION Folios: 113 Act. 411 PRESENTACION Folios: 112																
FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTES PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL																		
1 SOLICITUD DE: ☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo I ☒ Capítulo II																		
2 SOLICITANTE		IDENTIFICACION																
Nombre: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ Dirección: AVENIDA BRASIL 4365, MANGUINHOS 21045-900, RIO DE JANEIRO Nacionalidad o Domicilio: RIO DE JANEIRO, BRASIL Lugar de Constitución: BRASIL Teléfono: Fax: E-mail:		☐ C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro Cúal Número																
3 REPRESENTANTE O APODERADO		IDENTIFICACION																
Nombre: JUAN CARLOS URIBE RESTREPO Dirección: CALLE 93B No. 12-48, Piso 4o. BOGOTÁ, D.C., COLOMBIA Teléfono: 6019660 Fax: 6114209 E-mail: tum@tumnet.com		☒ C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro Cúal Número 79.159.313 TP 54.493																
En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de radicación (del poder).																		
4 INVENTOR (ES) (72)		Nombre: VER HOJA ANEXA Dirección: VER HOJA ANEXA Nacionalidad o Domicilio: VER HOJA ANEXA																
5 PCT (86) Solicitud Internacional No. <u>PCT/BR2010/000263</u> Fecha <u>10-08-2010</u> Publicación internacional No. <u>WO 2011/017791</u> Fecha <u>17-02-2011</u>																		
6 Título (54) <u>ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA PROTEÍNA PBP2-a Y SECUENCIAS HOMÓLOGAS PARA EL</u> <u>TRATAMIENTO DE INFECCIONES E INMUNODIAGNÓSTICO EN BACTERIAS DEL FILUM FIRMICUTES</u>																		
7 Clasificación Internacional (51) <u>C07K 16/12, A61K 39/40, C07K 16/40</u>																		
8 Prioridad ☒ SI ☐ NO		<table border="1"><thead><tr><th>(33)País de Origen</th><th>(32) Fecha</th><th>(31) Número de Solicitud</th></tr></thead><tbody><tr><td>BRASIL</td><td>10-08-2009</td><td>PI0914508-7</td></tr><tr><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td></td><td></td><td></td></tr></tbody></table>		(33)País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud	BRASIL	10-08-2009	PI0914508-7									
(33)País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud																
BRASIL	10-08-2009	PI0914508-7																
9 Comprobante de pago No. <u></u> Fecha <u></u>																		
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página																		

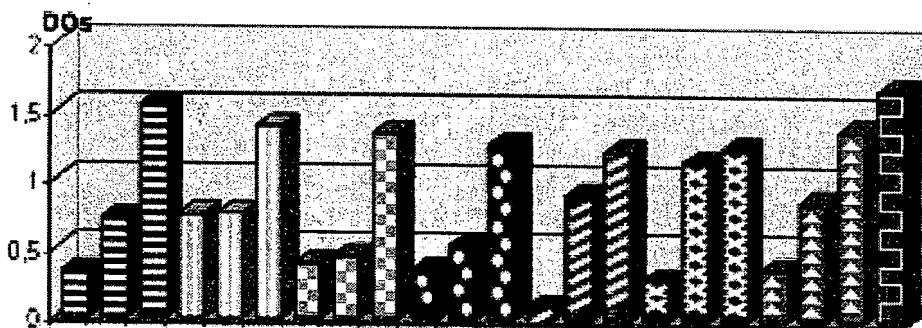
2

10 Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal de la persona jurídica peticionaria, en cuanto no estén inscritas en alguna Cámara de Comercio Colombiana.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción de examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☒ Arte final 12x12. 2 EJEMPLARES
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros OPINION ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL PCT/ISA/237

11 FIGURA CARACTERISTICA:

FIG. 1



12 Solicito la concesión de la patente

NOMBRE JUAN CARLOS URIBE RESTREPO

FIRMA

C.C/ 79.159.313

TP 54.493

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

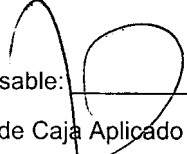
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 0024329
		Bogotá D.C., Marzo 08 de 2012 - 15:32:17

RECIBIDO DE : TRIANA URIBE & MICHELSEN LTDA NI 830.001.432

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	450056784	08/03/2012	2.525.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	590.000.00	590.000.00
			<u>\$590.000.00</u>
=====			

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: 
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-041846- -00000-0000

Fecha: 2012-03-09 16:34:24 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 113
Act. 411 PRESENTACION Folios: 112

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0024332

Bogotá D.C., Marzo 08 de 2012 - 15:32:17

RECIBIDO DE : TRIANA URIBE & MICHELSEN LTDA NI 830.001.432

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	450056784	08/03/2012	2.525.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
9 50005-01-01	SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	270.000.00
				\$270.000.00

SON: **DOSCIENTOS SETENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-041846- -00000-0000

Fecha: 2012-03-09 16:34:24 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 113
Act. 411 PRESENTACION Folios: 112

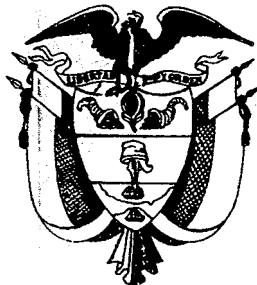
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

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

Marzo 8 de 2012 - 15:32:18

5

REPÚBLICA DE COLOMBIA



NOTARÍA CUARENTA Y UNA DEL CÍRCULO DE SANTAFÉ DE BOGOTÁ D.C.

Carrera 12 No. 93-26

Tels.: 621 4451/61/71/81/91 - 2186087 - 256 7730 - Fax: 218 6082.

PRIMERA-

Copia de la Escritura Pública No. -1785-

de fecha: 13 de JULIO- de 19 98

ACTO

"PROTOCOLIZACION".

OTORGANTES

"LAURA MICHELSEN NIÑO".



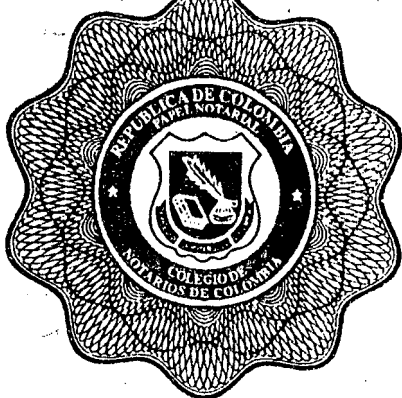
AGUSTÍN MORALES RIVEIRA

NOTARIO

Miembro del Colegio de Notarios de Colombia

Stella Comp.6 MICHELSE.170

AA 3125362



ESCRITURA PUBLICA NUMERO: [1785] - MIL SETECIENTOS OCHENTA Y CINCO.

OTORGADA EN LA NOTARIA CUARENTA Y UNA (41) DEL CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA, DISTRITO CAPITAL.

FECHA DE OTORGAMIENTO: TRECE (13) DE JULIO

DE MIL NOVECIENTOS NOVENTA Y OCHO (1998).

CLASE DE ACTO: PROTOCOLIZACION

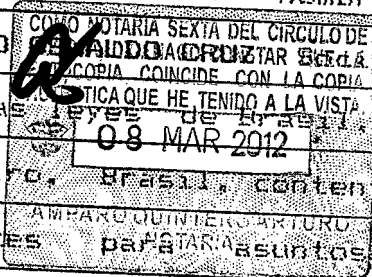
PERSONAS QUE INTERVIENEN EN EL ACTO: LAURA MICHELSEN NIÑO

Dentro del Circulo Notarial del Distrito Capital de Santafé de Bogotá, Departamento de Cundinamarca, República de Colombia, en donde queda radicada la Notaria Cuarenta y Una (41) de la circunscripción mencionada y cuyo titular es ABUSTIN MORALES RIVEIRA.

Comparecieron con minuta escrita: LAURA MICHELSEN NIÑO, mujer, mayor de edad, de nacionalidad colombiana, domiciliada en esta ciudad, de estado civil casada, identificada con la cédula de ciudadanía número 39.783.287 expedida en Usaquén y manifestó: PRIMERO: Que presenta para su protocolización el siguiente documento: i) El instrumento debidamente otorgado el día veintitres (23) de abril de mil novecientos noventa y ocho (1998), por ELOI DE SOUZA GARCIA en nombre y representación de la sociedad FUNDACAO DE APOIO A DOUTORAR S/A, sociedad constituida y existente de acuerdo a las leyes de Brasil, con domicilio en la ciudad de Rio de Janeiro, Brasil, contenido del nombramiento como representantes para asuntos de Propiedad Industrial e Intelectual y contra la competencia desleal a los abogados FERNANDO TRIANA, LAURA MICHELSEN, JUAN CARLOS URIBE Y JUAN PABLO TRIANA, y ii) Las certificaciones notariales y consulares, junto con sus respectivas traducciones oficiales, debidamente legalizado ante el

ESTE PAPEL NO TIENE COSTO ALGUNO PARA EL USUARIO

ADRIANA ESTHER DAUTISTA DIOLE
SECRETARIA
DECRETO 1534 DE 1984
NOTARIA 41 DE SANTAFE DE BOGOTA
Oficina principal



Ministerio de Relaciones Exteriores.

(HASTA AQUI LA MINUTA ESCRITA PRESENTADA POR EL(LA)(LOS)

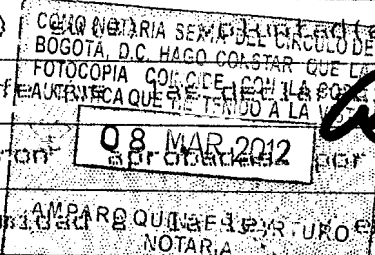
COMPARECIENTE(S)

ADVERTENCIAS

El Notario advirtió a los comparecientes: 1) Que las declaraciones emitidas por ellos deben obedecer a la verdad; 2) Que son responsables penal y civilmente en el evento que se utilice este instrumento con fines fraudulentos o ilegales; 3) Que se abstiene de dar fe sobre el querer o fuero interno de los comparecientes que no se expresó en este documento; 4) Que igualmente dejo expresa constancia sobre la importancia de la inscripción de la escritura en el evento que sea necesario, a la mayor brevedad posible en la entidad competente. 5) Por último les advierte que la protocolización de documentos no da mayor fuero o autenticidad de la que tienen dichos documentos.

OTORGAMIENTO Y AUTORIZACION

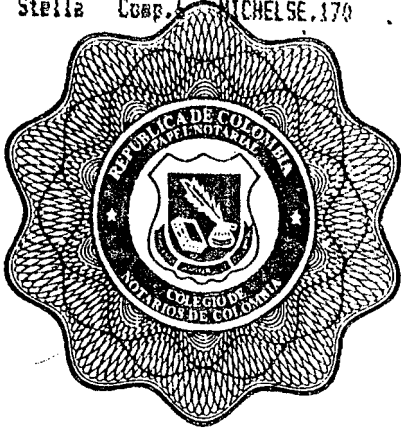
El documento precedente fue leído en forma legal por el(la, los) compareciente(s) quien(es) previa revisión minuciosa y no obstante las advertencias anteriores imparte(n) su aprobación al verificar que no hay ningún error y por encontrar que expresa(n) en forma fidedigna. El Notario da fe que las firmas firmadas por la(s) parte(s), fueron aprobadas por el(la, los) compareciente(s) de conformidad con la Ley 1090 en consecuencia autoriza con su firma la presente escritura pública dejando constancia que les advirtió sobre las relaciones que el



ADMON. NOTARIA AL DE BOGOTÁ

Stella Comp. MICHELSE, 170

AA 3125363



presente acto genera.

LA PRESENTE ESCRITURA PUBLICA SE
EXTENDIO EN LAS HOJAS DE PAPEL NOTARIAL
NUMEROS AA 3125362- 363.

EN CONSTANCIA SE FIRMA COMO APARECE EN LA HOJA DE PAPEL
NOTARIAL NUMERO AA 3129679
DERECHOS NOTARIALES \$ 6.900 , RECAUDO PARA LA
SUPERINTENDENCIA DE NOTARIADO Y REGISTRO \$1.710; y PARA EL
FONDO NACIONAL DE NOTARIADO \$1.710. RESOLUCION 0037 DEL 15 DE
ENERO DE 1998.

Se protocolizan los documentos anexos a esta escritura
pública. - SE PROTOCOLIZAN LOS DOCUMENTOS ANTES MENCIONADOS

ADRIANA ESTHER DAUTISTA BASAEE
SECRETARIA
DECRETO 1534 DEL 1998
NOTARIA 41 DE SANTIAGO DE BOGOTA
oficina protocolo

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE
BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA
COPIA COINCIDE CON LA COPIA
AUTENTICA QUE HE TENIDO A LA VISTA.
08 MAR 2012
AMPARO QUINTERO
NOTARIA

88

TRADUCCION OFICIAL 286-98 DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN IDIOMA
INGLES

N. de la T.: Se traducen las autenticaciones adjuntas a un poder escrito en idiomas Inglés y Español, otorgado en la ciudad Río de Janeiro, Brasil, el 23 de Abril de 1998, a favor de los doctores **FERNANDO TRIANA, LAURA MICHELSEN, JUAN CARLOS URIBE** y **JUAN PABLO TRIANA**, por Eloi de Souza García, en nombre y representación **Fundação Oswaldo Cruz** sociedad domiciliada en Avenida Brasil, 4365 - Castelo Mourisco - 5º andar Mangunhos, Río de Janeiro.

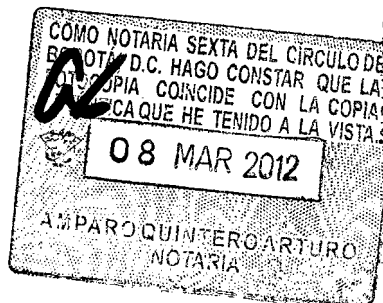
N. del T.: La firma de Eloi de Souza García fue autenticada ante André Luis Perira Pinto el 15 de Mayo de 1998

N. del T.: La firma de André Luis Perira Pinto en el documento antes traducido fue legalizado ante el Consulado de Colombia en Río de Janeiro, el 18 de Junio de 1998, No. 44/98. Pagado el impuesto de timbre y derechos consulares por US\$100.00. La firma del Cónsul Francisco Jordan Peñaranda fue reconocida por el Ministerio de Relaciones Exteriores de Bogotá el 10. de Julio de 1998 mediante Sello No. 250917 suscrito por el Jefe de Legalizaciones.

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA DEL DOCUMENTO ANTES DESCRITO
QUE PARA IDENTIFICACION SE SELLA POR LA SUSCRITA TRADUCTORA
OFICIAL ESTE 3 DE JULIO DE 1998.

PILAR GAMBOA MORALES
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL
RESOLUCION No. 1937 DEL
MINISTERIO DE JUSTICIA

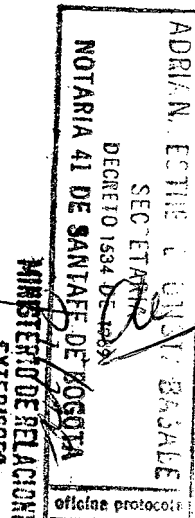
Pilar Gamboa Morales
Pilar Gamboa Morales
Resolución 1937 de 1991
Ministerio de Justicia
C.C. 39.682.927 de Usaquén

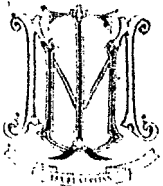


JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTA FE DE BOGOTA

98 JUL - 6 11:12

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO





94
TRIANA, URIBE & MICHELSEN

POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned ELOI DE SOUZA GARCIA
in representation FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
domiciled in Av. Brasil, 4365 - Castelo Mourisco - 5º andar-Mangunhos / Rio de Janeiro
in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby
appoint **FERNANDO TRIANA**, tpa. No. 45.265 c.c. No. 79.154.036; **LAURA MICHELSEN**, tpa. No.
67.897 c.c. No. 39.783.287; **JUAN CARLOS URIBE**, tpa. No. 54.493 c.c. No. 79.159.313 and **JUAN**
PABLO TRIANA, tpa. 63.077 c.c. No. 79.487.222; domiciled at Calle 93 B No. 12-48 (204), Santafé de
Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as
our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint
attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of
temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second or third alternate
representative is to replace the first or second one, or when the second or third is to replace the principal
one. In such cases, the principal representative, shall state his intention not to act as representatives
through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public
Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall
suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place.
When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second or third
alternate in their turn cases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the
first or second or third alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The
exercise of the representation by the first or second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above named attorneys-at-law so that they may
obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which
purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or
without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, in all matters
concerning the following: a) Obtainment of patents, models and designs; the registration of marks and
trade slogans; the deposit of commercial names and trade emblems; the obtainment of the declaration
and authorization of denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile,
voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Obtainment of plant
variety protection; c) Obtainment of functioning licenses, health registrations and any other petition
before the sanitary or administrative authorities; d) Obtainment of copyright registrations for any type of
artistic, literary, scientific, musical, video, films, video games, choreography works, software or any
other production in the artistic, scientific or literary fields capable of being reproduced or expressed by
any means known now or in the future; Registration of agreements related with the execution or transfer
of intellectual property rights; Deposit of names of periodic publications and television programs;
Obtention of reduced postal tariff; e) Actions of opposition, cancellation, nullity, infringement, writ of
mandamus, granting of licenses; and in general the civil, penal and administrative suits relating to all
those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters
they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist,
cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a Power of Attorney.

Given and signed this April 23, 1998

in RIO DE JANEIRO, BRAZIL

Signature Eloi Souza Garcia

Dr. ELOI DE SOUZA GARCIA
Presidente da FIOCRUZ

Calle 93B No. 12-48 (204) Bogotá, Colombia

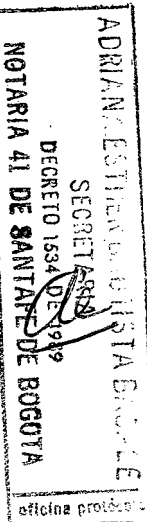
Tels.: (57-1) 611 4292 - 621 5810 - 621 7360 Fax.: (57-1) 611 4209

E-mail: juribe00@counsel.com

PILAR GAMBOA MORALES

TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL

RESOLUCION NO. 1237 DEL
GOBIERNO DE JUSTICIA



de Andre Luis Pereira

Pinto.

EA testamento

Giovana Pinto Oliveira - E. Substituta

da veridade.

Valor: 1,85

MRE - Seção Consular RJ, em

21/05/98

PODER

ANDRÉ LUIS PEREIRA PINTO
3.º SUBSTITUTO
11.ª CIRC. R.C.P.N. e TAB



Yo (nosotros), abajo suscrito(s) ELOI DE SOUZA GARCIA
en representación de FUNDACÃO OSWALDO CRUZ
domiciliado(s) en Av. Brasil, 4365 - Castelo Mourisco - 50 andar - Mangueiras/Rio de Janeiro
por el presente nombro (nombramos) a **FERNANDO TRIANA**, tpa. No. 45.265 c.c. No. 79.154.036;
LAURA MICHELSEN, tpa. No. 67.897 c.c. No. 39.783.287; **JUAN CARLOS URIBE**, tpa. No. 54.493
c.c. No. 79.159.313 y **JUAN PABLO TRIANA**, tpa. 63.077 c.c. No. 79.487.222; domiciliados en la
Calle 93 B No. 12-48 (204), Santafé de Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el
parágrafo 1ro. del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como
suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial
con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer
representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo
de aquel. La misma regla se aplicará cuando el segundo y tercer representantes suplentes hayan de
reemplazar al primero, al segundo o al principal. En tales casos, el representante principal, o el primero,
o segundo suplente, o tercer suplente en su caso, o todos ellos, declararán su intención de no ejercer la
representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro
Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el
certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar.
Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo o
tercer suplente, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso,
asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por
el primero o segundo o tercer suplente en su caso.

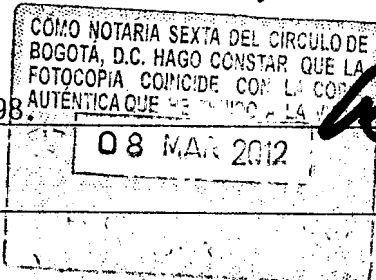
Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi
(nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo(amos) a los dichos
apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no
jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, en
todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos y dibujos
industriales, el registro de marcas y de lemas comerciales; el depósito de nombres comerciales y enseñas;
la obtención de la declaración y de la autorización de denominaciones de origen; su renovación, traspaso,
cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos;
b) Obtención de la protección para variedades vegetales; c) Obtención y tramitación de todo lo
relacionado con licencias de funcionamiento, registros sanitarios y cualquier otra petición ante las
autoridades sanitarias o administrativas; d) Obtención del registro de derechos de autor para cualquier
tipo de obra artística, literaria, científica, musical, videográfica, cinematográfica, coreográficas, o
cualquier otra producción, en el campo artístico, científico, o literario capaz de ser reproducido o
expresado por cualquier medio conocido ahora o por conocer en el futuro; Registro de contratos
relacionados con la ejecución o transferencia e derechos intelectuales; Depósito de nombres de
publicaciones periódicas y de programas de televisión; Obtención de tarifa postal reducida; e) Las
acciones de oposición, de cancelación, de nulidad, de medidas cautelares, de tutela, de concesión de
licencias y en general los procesos civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos
relacionados con todos estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan; Y
para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar,
admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y ratificar los actos de agentes
oficiosos.

Dado y firmado hoy 23 DE ABRIL DE 1998

en RIO DE JANEIRO, BRAZIL

Firma

Dr. ELOI DE SOUZA GARCIA
Presidente da FIOCRUZ



PILAR GAMBOA MORALES
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL
RESOLUCION No. 1987 DEL
MINISTERIO DE JUSTICIA



CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA

CONSULADO DE COLOMBIA
No. 44/98.

El Suscrito Cónsul General de Colombia en Rio de Janeiro, visto los documentos presentados por los interesados, CERTIFICA: Que el Señor ANDRE LUIS PEREIRA PINTO, quien como Escribiente Sustituto de la Notaría 110. de Rio de Janeiro, Brasil, autenticó la firma del signatario del poder precedente, ejercía en la fecha las funciones indicadas y su firma corresponde a la registrada en este Consulado.

Que la Compañía FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, es una sociedad constituida de acuerdo con las leyes del Brasil y cumple su objetivo conforme a las mismas.

Que el Señor ELÓY DE SOUZA GARCIA, quien en su caracter de PRESIDENTE de la citada Compañía, confiere el poder precedente y cuya firma fué autenticada ante la Notaría 110. de Rio de Janeiro, Brasil, es su representante legal en este país.

El Cónsul no asume responsabilidad por el contenido de este documento.

Rio de Janeiro, 18 de junio de 1998.



Francisco Jordan Peñaranda
FRANCISCO JORDAN PEÑARANDA
Cónsul General de Colombia.

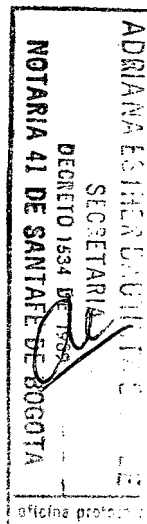
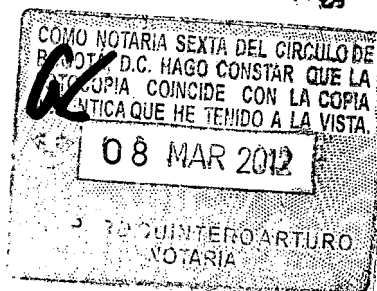
PAGADO IMPUESTO DE TIMBRE
US\$ 6.00 (SEIS DÓLARES)
PAGADO DERECHOS CONSULARES
US\$ 100.00 (CIEN DÓLARES)

COPIA FIRMADA APOYADA EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES
250917
Peñaranda

98 JUL - 11 PM 11:06
JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO



116



AA 3129679

HOJA NUMERO	TRES
DE LA ESCRITURA PUBLICA NUMERO	1785
DEL	13 DE JULIO DE 1998
VIENE DE LA HOJA DE PAPEL NOTARIAL	
NUMERO AA.	3125363

La siguiente firma se recepcionó
el día 13 JUL 1998 (Art. 9 Decr. 2148/83)

Laura Michelsen Niño



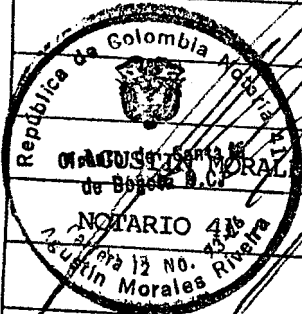
LAURA MICHELSEN NIÑO

c.c. 39783287

DE *unq*

INDICE DERECHO

EL NOTARIO



AGUSTÍN MORALES RIVEIRA

NOTARIO 4to
Calle 12 No. 2145
Agustín Morales Riveira

ADRIANA ESTHER BARRERA
SECRETARIA
DECRETO 1534 DE 1988
NOTARIA 41 DE SANITARI DE BOGOTÁ

CÓMO NOTARIA SEXTA DEL CÍRCULO DE
BOGOTÁ, D.C. HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON LA COPIA
AUTÉNTICA QUE HE TENIDO A LA VISTA
08 MAR 2012
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIO

...NO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE
...HAGO CONSTAR QUE LA
...CON LA COP
...TENDO A LA VIDA

03 MAR 2012

UPO

HOJA NUMERO -----SIETE----- (07) (ULTIMA)

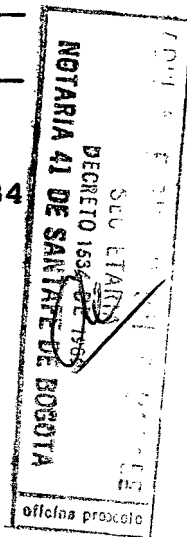
ES -----PRIMERA----- (01) COPIA (FOTOCOPIA) TOMADA
DE SU ORIGINAL CONFORME AL ARTICULO 79 DEL DECRETO 960 DE 1970.

SE EXPIDE EN -----SIETE----- 97) HOJAS
UTILES CON DESTINO A : "LAURA MICHELSEN NIÑO".
"-----".

COPIA AUTORIZADA POR LA SECRETARIA DE CONFORMIDAD AL DECRETO 1534
DE 1989.

DERECHOS RESOLUCION No. 0037 DEL 15 DE ENERO DE 1998.

SANTAFE DE BOGOTA D.C. "JULIO 14 DE 1998".



NOTA : CUALQUIER CAMBIO O MODIFICACION QUE SE REALICE SOBRE ESTAS
COPIAS SIN LA AUTORIZACION E INTERVENCION DEL NOTARIO CONFORME A
LA(S) LEY(ES) ES ILEGAL Y UTILIZARLA(S) PUEDE CAUSAR SANCION PENAL.

LA SECRETARIA



ADRIANA ESTHER BAUTISTA BASABE

NOTARIA 41 DEL CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA D.C.



RECEIVED
MAR 10 2012

RECEIVED

NOTARIA 41 DE S.A.

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE
BOGOTA, D.C. HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON LA COPIA
AUTENTICA QUE HE TENIDO A LA VISTA
08 MAR 2012
PEROQUINCE S.A.S.
NOTARIA

INVENTORES

José Procópio Moreno SENNA
Rua Barão de Jaguaripe 75/401, Ipanema 22421-000, Rio de Janeiro, RJ, BR

João Luiz Sampaio QUEIROZ
Rua Juruviara 152, Todos os Santos 20735-150, Rio de Janeiro, RJ, BR

Nadia Maria BATOREU
Rua Retiro dos Artistas 241, Bloco 01/205, Pechincha 22770-102, Jacarepaguá, Rio de Janeiro, RJ, BR

Maria da Glória Martins TEIXEIRA
Rua da Justiça 320/102, Vila da Penha 21221-320, Rio de Janeiro, RJ, BR

PCT

(PCT Rule 92*bis*.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

DE ALMEIDA, Kátia F.
Bhering, Almeida & Associados
Rua Beneditinos 16, 11º Andar, Centro
20081-050, Rio de Janeiro, RJ
BRÉSIL

Date of mailing (day/month/year) 15 September 2011 (15.09.2011)			
Applicant's or agent's file reference P1745		IMPORTANT NOTIFICATION	
International application No. PCT/BR2010/000263		International filing date (day/month/year) 10 August 2010 (10.08.2010)	
1. The following indications appeared on record concerning: ☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative			
Name and Address BATOREAU, Nadia Maria Rua Retiro dos Artistas 241, Bloco 01/205, Pechincha 22770-102, Jacarepaguá, Rio de Janeiro, RJ Brazil		State of Nationality BR State of Residence BR Telephone No. Facsimile No. E-mail address 	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning: ☐ the person ☒ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence			
Name and Address BATOREU, Nadia Maria Rua Retiro dos Artistas 241, Bloco 01/205, Pechincha 22770-102, Jacarepaguá, Rio de Janeiro, RJ Brazil		State of Nationality BR State of Residence BR Telephone No. Facsimile No. E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	
3. Further observations, if necessary: The applicant's name had been misspelt at time of deposit.			
4. A copy of this notification has been sent to: ☐ the receiving Office ☐ the International Searching Authority ☐ the Authority(ies) specified for supplementary search ☐ the International Preliminary Examining Authority ☐ the designated Offices concerned ☒ the elected Offices concerned ☐ other:			
The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland		Authorized officer Fahy Laurence e-mail pt09.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 09	

Form PCT/IB/306 (January 2009)

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION RELATING TO PRIORITY CLAIM

(PCT Rules 26bis.1 and 26bis.2 and
Administrative Instructions, Sections 402(c) and 409)

To:

DE ALMEIDA, Kátia F.
Bhering, Almeida & Associados
Rua Beneditinos 16, 11° Andar, Centro
20081-050, Rio de Janeiro, RJ
BRÉSIL

Date of mailing (day/month/year) 04 October 2011 (04.10.2011)	
Applicant's or agent's file reference P1745	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/BR2010/000263	International filing date (day/month/year) 10 August 2010 (10.08.2010)
Applicant FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ et al	

The applicant is hereby notified of the following in respect of the priority claim identified as item () in Box No. VI of the request (Form PCT/RO/101).

1. ☒ **Correction of priority claim.** In accordance with the applicant's notice received on 10 December 2010 (10.12.2010) the following priority claim has been corrected to read as follows:
BR 10 August 2009 (10.08.2009) PI 0914508-7
- ☐ even though the indication of the number of the earlier application is missing.
- ☐ even though the following indication in the priority claim is not the same as the corresponding indication appearing in the priority document:
- ☐ even though the international application has an international filing date which is later than the date on which the priority period expired, but is within two months from that date.
2. ☐ **Addition of priority claim.** In accordance with the applicant's notice received on the following priority claim has been added:
- ☐ even though the indication of the number of the earlier application is missing.
- ☐ even though the following indication in the priority claim is not the same as the corresponding indication appearing in the priority document:
- ☐ even though the international application has an international filing date which is later than the date on which the priority period expired, but is within two months from that date.
3. ☐ The priority claim is **considered void** (Rule 26bis.2(b)) because:
- ☐ **at the expiration of the prescribed time limit under Rule 26bis.1(a)**, the International Bureau had **not received a notice** from the applicant correcting the priority claim so as to comply with the requirements of Rule 4.10, as notified in the invitation (Form PCT/RO/110 or Form PCT/IB/316).
- ☐ the applicant's **notice was received after the expiration of the prescribed time limit under Rule 26bis.1(a)**; and consequently, the priority claim could not be corrected so as to comply with the requirements of Rule 4.10.
- ☐ the applicant's notice failed to correct the priority claim so as to comply with the requirements of Rule 4.10.
- The applicant may, before the technical preparations for international publication have been completed, submit information concerning the priority claim, which the International Bureau will publish together with the international application (Rule 26bis.2(d)).
4. ☐ As a **result of the correction and/or addition** of priority claim(s) under items 1 and/or 2, or of the priority claim(s) under item

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Gallay Laurence e-mail pt09.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 09
Facsimile No. +41 22 338 71 30 Form Form PCT/IB/318 (January 2009)	

1/T79UU9AQ0

16

Continuation of Form 318
NOTIFICATION RELATING TO PRIORITY CLAIM

PCT/BR2010/000263

Date of mailing (day/month/year)

04 October 2011 (04.10.2011)

3 being considered void, the (earliest) priority date is:

5. ☐ The priority claim cannot be corrected/added since the applicant's notice was received on , that is, after the expiration of the prescribed time limit under Rule 26bis.1(a). However, where the applicant's notice concerns a correction, in accordance with Rule 26bis.2(c)(i) to (iii), the priority claim(s) indicated in Box VI of the request **will not be considered void**.

The applicant may, prior to the expiration of 30 months from the priority date and subject to the payment of a fee, request the International Bureau to publish information concerning the matter. See Rule 26bis.2(e) and the *PCT Applicant's Guide*, Annex B2(IB).

6. ☐ In the case where **multiple priorities** have been claimed, the above item(s) relate(s) to the following priority claim(s):

A copy of this Notification has been sent to the receiving Office and

- ☐ to the International Searching Authority (*where the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have not yet been issued*).
- ☐ to the Authority(ies) specified for supplementary search (*where a request for supplementary search has been submitted and the supplementary international search report has not yet been issued*).
- ☐ to the International Preliminary Examining Authority (*where a demand for international preliminary examination has been made and the IPRP (Chapter II) has not yet been issued*).
- ☐ to the designated Offices (*in accordance with Rule 93bis*).

VERSÃO CORRIGIDA

(19) Organização Mundial da Propriedade Intelectual
Secretaria Internacional



(43) Data de Publicação Internacional
17 de Fevereiro de 2011 (17.02.2011)

(10) Número de Publicação Internacional
WO 2011/017791 A9

PCT

(51) Classificação Internacional de Patentes :
C07K 16/12 (2006.01) A61K 39/40 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)

(21) Número do Pedido Internacional :
PCT/BR2010/000263

(22) Data do Depósito Internacional :
10 de Agosto de 2010 (10.08.2010)

(25) Língua de Depósito Internacional : Português

(26) Língua de Publicação : Português

(30) Dados Relativos à Prioridade :
020090076200
10 de Agosto de 2009 (10.08.2009) BR

(71) Requerente (para todos os Estados designados, exceto US) : FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ [BR/BR]; Avenida Brasil, Nº 4365, Manguinhos, 21045-900, Rio de Janeiro, RJ (BR).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Requerentes (para US unicamente) : SENNA, José Procópio Moreno [BR/BR]; Rua Barão de Jaguaripe 75/401, Ipanema, 22421-000, Rio de Janeiro, RJ (BR). QUEIROZ, João Luiz Sampaio [BR/BR]; Rua Juruviana 152, Todos os Santos, 20735-150, Rio de Janeiro, RJ (BR).

Janeiro, RJ (BR). BATOREAU, Nadia Maria [BR/BR]; Rua Retiro dos Artistas 241, Bloco 01/205, Pechincha, 22770-102, Jacarepaguá, Rio de Janeiro, RJ (BR). TEIXEIRA, Maria da Glória Martins [BR/BR]; Rua da Justiça 320/102, Vila da Penha, 21221-320, Rio de Janeiro, RJ (BR).

(74) Mandatário : DE ALMEIDA, Katia, F.; Bhering, Almeida & Associados, Rua Beneditinos 16, 11º Andar, Centro, 20081-050, Rio de Janeiro, RJ (BR).

(81) Estados Designados (sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção nacional existentes) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

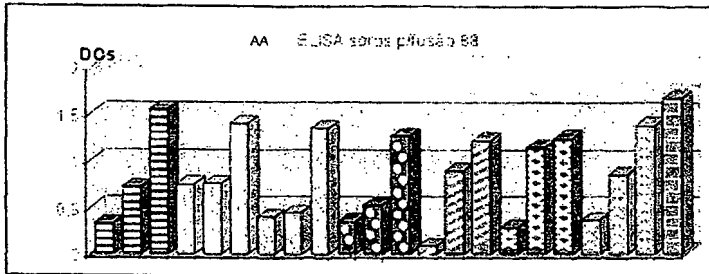
(84) Estados Designados (sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção regional existentes) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiático (AM, AZ, BY, KG, KZ,

(Continua na página seguinte)

(54) Title : MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST THE PBP2-A PROTEIN AND HOMOLOGOUS SEQUENCES FOR THE TREATMENT OF INFECTIONS BY AND IMMUNODIAGNOSTICS OF BACTERIA OF THE FIRMICUTES PHYLUM

(54) Título : ANTICORPOS MONOCLONAIS PARA A PROTEÍNA PBP2-A E SEQUÊNCIAS HOMÓLOGAS PARA O TRATAMENTO DE INFECÇÕES E IMUNODIAGNÓSTICO EM BACTÉRIAS DO FILO FIRMICUTES

FIGURA 1



AA ... ELISA serums for fusion 88

(57) Abstract : The present invention relates to monoclonal antibodies capable of recognising and binding to the PBP2-a protein and to other proteins having sequences homologous to PBP2-a, including pathogenic species such as the methiciline-resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA), coagulase-negative *Staphylococcus*, *Staphylococcus sciuri* and *Enterococcus*, and any other bacteria containing the PBP2-a protein or homologous sequences. The invention also relates to the use of the monoclonal antibodies capable of recognising and binding to the PBP2-a protein and to other proteins having sequences homologous to PBP2-a in a complementary immunodiagnostic test for detecting resistance to beta-lactam antibiotics.

(57) Resumo :

(Continua na página seguinte)

WO 2011/017791 A9

MD, RU, TJ, TM), Europeu (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(48) Data de publicação da presente versão corrigida :
14 de Abril de 2011

(15) Informação sobre Correção :
MISSING

Publicado:

— com relatório de pesquisa internacional (Art. 21(3))

A presente invenção se refere à anticorpos monoclonais capazes de reconhecer e se ligar à proteína PBP2a e outras proteínas que apresentem seqüências homólogas à PBP2a, incluindo os patógenos *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina - MRSA, *Staphylococcus coagulase negativa*, *Staphylococcus sciuri*, *Enterococcus* spp. e qualquer outra bactéria que venha possuir a PBP2a ou seqüências homólogas a esta proteína. A invenção se refere ainda a utilização dos anticorpos monoclonais capazes de reconhecer e se ligar à proteína PBP2a e outras proteínas que apresentem seqüências homólogas à PBP2a em imunodiagnóstico complementar para a detecção da resistência aos beta-lactâmicos.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2010/000263

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC (2010.01) C07K 16/12 C07K 16/40 A61K 39/40

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC (2010.01) C07K A61K

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

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

MEDLINE, EPODOC, BIOSIS, EMBASE, DERWENT, DGENE, GENESEQ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	SAITO M; SEKIGUCHI K; YAJIMA R; HINA M; DOSS R C; KANNO H. Immunological detection of penicillin-binding protein 2' of methicillin-resistant staphylococci by using monoclonal antibodies prepared from synthetic peptides. Journal of clinical microbiology. 1995, Vol 33 N° 9, pages 2498-2500, ISSN 0095-1137. see abstract page 2498	1, 2, 8 to 19 3 to 7
X Y	XU X; TANG X-H; XIE G-E Preparation, characterization and preliminary application of monoclonal antibody against the transpeptidase domain of MRSA-PBP2a. Chinese journal of cellular and molecular immunology. 2007, Vol. 23, N°6, pages 552-555, ISSN 1007-8738. abstract MEDLINE	1, 2, 8 to 19 3 to 7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

09 DEZ 2010 (09.12.2010)

Date of mailing of the international search report

15 DEZ 2010 (15.12.2010)

Name and mailing address of the ISA/

INSTITUTO NACIONAL DA
PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Rua Marink Velga nº 9, 18º andar
cep: 20090-050, Centro - Rio de Janeiro/RJ
+55 21 2139-3663

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/BR2010/000263

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)	
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. ☒	Claims Nos.: 7 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐	Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
1. ☐	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐	As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest	☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation. ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2010/000263

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DEO YM; RUSSONIELLO C; TREML J; SALIM B; KREISWIRTH B; KELER T Development and characterization of MRSA-Specific human monoclonal antibodies for therapeutic and prophylactic treatment of MRSA infections. ABSTRACTS OF THE GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. 1999, Vol. 99, página 274. See the whole document	1 a 19
Y	WO 0071585 A1 (MEDAREX INC [US]) 30 November 2000 (2000-11-30) see abstract Pages 6, 7, 8. Claims 20, 21 and 23	5 a 7
Y	US 2003224000 A1 04 December 2003 (2003-12-04) see abstract	1 a 19
A	KR 20070082448 A (DINONA [KR]) 21 August 2007 (2007-08-21) see abstract	1 a 19
P,Y	WO 2009137677 A2 (HAZEL TOM [US]) 12 November 2009 (2009-11-12) see abstract do Derwent	1 a 19
P,Y	KR 100943302 B1 (DINONA [KR]) 23 February 2010 (2010-02-23) see abstract do Derwent	1 a 19
A	ROTH, DM; SENNA JPM; MACHADO DC Evaluation of the humoral immune response in BALB/c mice immunized with a naked DNA vaccine anti-methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Genetics and Molecular Research. 2006, Vol.5, Nº 3, pages 503-512.	1 a 19
A	SENNA JPM; ROTH DM; OLIVEIRA JS; MACHADO DC; SANTOS DS. Protective immune response against methicillin resistant Staphylococcus aureus in a murine model using a DNA vaccine approach. Vaccine, 2003, Vol.21, pages 2661-2666.	1 a 19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/BR2010/000263

WO 0071585 A1	2000-11-30	AU 5867100 A	2000-12-12
		CA 2373221 A1	2000-11-30
		EP 1173485 A1	2002-01-23
		JP 2003503015 T	2003-01-28
US 2003224000 A1	2003-12-04	AU 2002364740 A1	2003-07-30
		AU 2009210372 A1	2009-09-10
		CA 2469571 A1	2003-08-07
		CA 2469714 A1	2003-07-24
		EP 1465926 A2	2004-10-13
		EP 1470237 A2	2004-10-27
		JP 2005516044 T	2005-06-02
		JP 2005524624 T	2005-08-18
		JP 2010013454 A	2010-01-21
		US 2003228322 A1	2003-12-11
		US 7169903 B2	2007-01-30
		US 2008014202 A1	2008-01-17
		WO 03059259 A2	2003-07-24
		WO 03063772 A2	2003-08-07
KR 20070082448 A	2007-08-21	KR 100771584 B1	2007-10-30
WO 2009137677 A2	2009-11-12	WO 2009137677 A3	2010-01-07
KR 100943302 B1	2010-02-23	WO 2010104245 A1	2010-09-16

23
TRANSLATION

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY
(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference P1745	FOR FURTHER ACTION See Form PCT/IPEA/416																									
International application No. PCT/BR2010/000263	International filing date (day/month/year) 10.08.2010	Priority date (day/month/year) 10.08.2009																								
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K16/12, C07K16/40, A61K39/40																										
Applicant FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ																										
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of 11 sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☒ (sent to the applicant and to the International Bureau) a total of 28 sheets, as follows: ☐ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions). ☒ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) _____, containing a sequence listing, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see paragraph 3bis of Annex C of the Administrative Instructions). 4. This report contains indications relating to the following items: <table><tr><td>☒</td><td>Box No. I</td><td>Basis of the report</td></tr><tr><td>☐</td><td>Box No. II</td><td>Priority</td></tr><tr><td>☒</td><td>Box No. III</td><td>Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</td></tr><tr><td>☐</td><td>Box No. IV</td><td>Lack of unity of invention</td></tr><tr><td>☒</td><td>Box No. V</td><td>Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</td></tr><tr><td>☐</td><td>Box No. VI</td><td>Certain documents cited</td></tr><tr><td>☒</td><td>Box No. VII</td><td>Certain defects in the international application</td></tr><tr><td>☒</td><td>Box No. VIII</td><td>Certain observations on the international application</td></tr></table>			☒	Box No. I	Basis of the report	☐	Box No. II	Priority	☒	Box No. III	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability	☐	Box No. IV	Lack of unity of invention	☒	Box No. V	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement	☐	Box No. VI	Certain documents cited	☒	Box No. VII	Certain defects in the international application	☒	Box No. VIII	Certain observations on the international application
☒	Box No. I	Basis of the report																								
☐	Box No. II	Priority																								
☒	Box No. III	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability																								
☐	Box No. IV	Lack of unity of invention																								
☒	Box No. V	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement																								
☐	Box No. VI	Certain documents cited																								
☒	Box No. VII	Certain defects in the international application																								
☒	Box No. VIII	Certain observations on the international application																								
Date of submission of the demand	Date of completion of this report																									
Name and mailing address of the IPEA/BR	Authorized officer																									
Facsimile No.	Telephone No.																									

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.

PCT/BR2010/000263

Box No. I

Basis of the report

1. With regard to the language, this report is based on:
- ☒ the international application in the language in which it was filed
- ☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of:
- ☐ international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))
- ☐ publication of the international application (Rule 12.4(a))
- ☐ international preliminary examination (Rule 55.2(a) and/or 55.3(a))
2. With regard to the elements of the international application, this report is based on (replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report):
- ☐ the international application as originally filed/furnished
- ☒ the description:
- pages 1-13, 15-48 as originally filed/furnished
- pages* 14; 14A; 49A; 49B; 49C; 49D; 50 received by this Authority on 16.11.2011
- pages* _____ received by this Authority on _____
- ☒ the claims:
- nos. _____ as originally filed/furnished
- nos.* _____ as amended (together with any statement) under Article 19
- nos.* on pages 1-4 received by this Authority on 16.11.2011
- nos.* _____ received by this Authority on _____
- ☒ the drawings:
- sheets 1-9 as originally filed/furnished
- sheets* _____ received by this Authority on _____
- sheets* _____ received by this Authority on _____
- ☒ a sequence listing - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing.
3. ☒ The amendments have resulted in the cancellation of:
- ☒ the description, pages 14
- ☒ the claims, nos. 1-19
- ☐ the drawings, sheets/figs _____
- ☐ the sequence listing (specify): _____
4. ☒ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since either they are considered to go beyond the disclosure as filed, or they were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c) and (c-bis)):
- ☒ the description, pages 49A; 49B; 49C; 49D; 50
- ☒ the claims, nos. 13, 14, 15 and 16
- ☐ the drawings, sheets/figs _____
- ☐ the sequence listing (specify): _____
5. ☐ This report has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 70.2(e)).
6. ☐ Supplementary international search report(s) from Authority(ies) _____ have been received and taken into account in drawing up this report (Rule 45bis.8(b) and (c)).

* If item 4 applies, some or all of those sheets may be marked "superseded."

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.

PCT/BR2010/000263

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application

☒ claims, Nos. 17

because:

☒ the said international application, or said claims Nos. 17 (16.11.2011)
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

Claim 17 relates to a method for treating or preventing an infection and as such, it was not searched (PCT Article 17(2) (a) (i), Rule 39.1(iv)). However, since said method involves a single step, the administration to a human or animal patient of a quantity of isolated monoclonal antibody, the latter was used when establishing this written opinion.

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☒ the claims, or said claims Nos. 13, 14, 15 and 16 are so inadequately supported
by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

No opinion is formed for claims 13-16, since their subject matter is supported by the amended pages 49A, 49B, 49C, 49D, which are inadmissible because they include subject matter that goes beyond the disclosure of the invention as filed (PCT Article 34(4) (a) (ii) and Rule 70.2(c)).

☐ no international search report has been established for said claims Nos. _____

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13ter.1(a) or (b) and 13ter.2.

☒ See Supplemental Box for further details.

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.

PCT/BR2010/000263

Box No. V	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement		
1. Statement			
Novelty (N)	Claims	1-12, 17 (received on 16.11.2011)	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-12, 17 (received on 16.11.2011)	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-12, 17 (received on 16.11.2011)	YES
	Claims		NO
2. Citations and explanations (Rule 70.7)			
1. Reference is made to the following documents: D1: Saito et alia, 1995 D2: Xu et alia, 2007 2. Summary of the claimed subject matter The present application relates to a monoclonal antibody generated by immunisation with a fragment of the penicillin-binding protein PBP2a of methyciline-resistant <i>S. aureus</i>. It also relates to the pharmaceutical composition, the method for diagnosing resistance to beta-lactam antimicrobial agents, and to the method for treating and preventing infection by bacteria containing PBP2a or homologous proteins. 3. Novelty (PCT Article 33(2)) The subject matter of the claims 1-12 and 17 received on 16 November 2011 is novel (PCT Article 33(2)).			

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.

PCT/BR2010/000263

Box No. V	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
4.	Inventive step (PCT Article 33(3)) The subject matter of the claims 1-12 and 17 received on 16 November 2011 involves an inventive step (PCT Article 33(3)). The analysis of the subject matter claimed in the claims 1-12 and 17 received on 16 November 2011 and of documents D1 and D2 shows that D1 and D2 have indeed used PBP2a peptides of MRSA, including the domain near the active centre, like the fragment used in this application. Documents D1 and D2, however, included no assays demonstrating the bactericidal effect of the antibodies described. Thus, although D1 and D2 describe anti-PBP2a monoclonal antibodies, and D2 describes antibodies with high affinity for PBP2a, this does not ensure that these antibodies have a bactericidal effect like that of the antibody described in the present application.
5.	Industrial applicability (PCT Article 33(4)) The subject matter of the claims 1-12 and 17 received on 16 November 2011 is industrially applicable (PCT Article 33(4)).

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/BR2010/000263

Box No. VII Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

Contrary to PCT Rule 13bis, no deposit data regarding the hybridomas at the origin of the monoclonal antibodies according to the present application have been found. The applicant must be aware that this information concerning this deposit might be required in the national phase, in accordance with PCT Rule 13bis.7.

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/BR2010/000263

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The claims 1-12 received on 16 November 2011 do not clearly define the subject matter for which protection is sought (PCT Article 6) because claim 1 is not completely supported by the description. Claims 1-12 are broad and contain subject matter that was not described in the description in a manner that provided sufficient proof that the inventor was in possession of the alleged invention as a whole at the time the invention was made.

More specifically, claim 1 is broad and in its present wording its scope includes monoclonal antibodies having in the light-chain and heavy-chain variable domain thereof alternatively the sequences 6, 7, 8, 12, 13, 14, and also variable domains with at least 80% identity with said sequences. The scope of this type of claim includes, for example, a monoclonal antibody containing a variable domain containing SEQ. ID. NO: 7, which corresponds to the CDR2 of the variable heavy chain, but does not define the other five CDRs which, together, establish the connection to the epitope, and thus allows for innumerable possible monoclonal antibodies.

The description and the sequence listing do not describe all the monoclonal antibodies that can fall within this scope, in view of the innumerable possibilities of monoclonal antibodies allowed by the way in which the claim was drafted.

In fact, the description identifies only two monoclonal antibodies, designated 10 and 38, wherein only the CDRs of the light and heavy variable domains of the latter

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY		International application No. PCT/BR2010/000263
Box No. VIII	Certain observations on the international application	
have been specified. The possibility to combine CDRs and also the possibility to conservatively substitute amino acids in these sequences allows for innumerable possible different antibodies that might not retain the features disclosed in the application. There is no support for the belief that all the possible combinations of CDRs and all the possible conservative amino acid substitutions can be included within the scope of the claims. In confirmation of the above, document WO2006081171 describes SEQ ID NO: 13, which has 100% identity with SEQ ID NO: 7 of the claimed antibody. However, the specific binding agent described binds with the amyloid-beta antigen, and there is no proof that this agent binds with the PBP2a protein, although it has 100% identity with SEQ ID NO: 7 as defined in claim 1. Claims 2 and 4 (received on 16 November 2011) do not clearly define the subject matter for which protection is sought (PCT Article 6) because these claims relate to monoclonal antibodies but the variable chain domain of the antibody is defined in terms of DNA sequences. The claims 13-16 received on 16 November 2011 are inadmissible because the subject matter is not supported by the description (PCT Article 6). These claims are supported by pages 49A, 49B, 49C, 49D, which are inadmissible because they include subject matter that goes beyond the disclosure of the invention as filed (PCT Article 34(4)(a)(ii)).		

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.

PCT/BR2010/000263

Supplemental Box Relating to Sequence Listing

Continuation of Box No. I, item 2:

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this report was established on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - b. (time)
 - ☒ in the international application as filed
 - ☐ together with the international application in electronic form
 - ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search and/or examination
 - ☐ by this Authority as an amendment* on _____

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

On 26 March 2010, this Search Authority invited the applicant to present the declaration according to the standards in Annex C of the Administrative Instructions, together with the respective declaration.

In a letter dated 16 November 2010, the applicant presented the requested declaration together with two CDs containing the electronic file with the sequence listing.

* If item 4 in Box No. I applies, the sequence listing, which forms part of the basis of the report, may be marked "superseded."

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.
Continuation of: BOX I.4

In reply to the written opinion, the applicant filed new pages 14, 14A, 49A, 49B, 49C and 49D, which were received on 16 November 2011.

The amendments on pages 49A, 49B, 49C and 49D are inadmissible under PCT Article 34.4(a)(ii) because these pages contain subject matter that goes beyond the disclosure of the invention as filed.

The information presented on pages 49A, 49B, 49C and 49D that goes beyond the disclosure of the invention as filed relates to:

- the description of the sequences of the constant domain of the IgG, IgD, IgA, IgE or IgM isotype, which can be added to the variable light and heavy chains (page 49A);
- the term "antibody", as including fragments that are functionally equivalent to an antibody and retain the ability to bind specifically to an antigen (page 49A);
- the examples of binding fragments covered by the term "antibody", including: a monovalent fragment; bivalent fragments, Fd fragment, Fv fragment, scFv, dAb fragment, a combination of two or more isolated CDRs joined by a synthetic linker and diabodies (page 49B);
- the pharmaceutical compositions also contain diluents, buffer salts, detergents, stabilisers, preservatives, solubilisers and/or other materials suitable for inclusion in pharmaceutical compositions (pages 49C and 49D);
- the real dosage levels of the active principles in the

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.

PCT/BR2010/000263

Supplemental Box

pharmaceutical compositions (page 49D); and
- oral, rectal and vaginal administration forms.

All the above-mentioned features were not described in the original application (PCT Article 5), and therefore are inadmissible under PCT Article 34.4(a)(ii).

Since the amendments on pages 49A, 49B, 49C and 49D were not admitted, the amendment on the page 50 received on 16 November 2011 is inadmissible, since lines 1 and 2 must continue from the text on page 49 (as originally filed), to ensure the continuity of the text.

The claims 13-16 received on 16 November 2011 are inadmissible because their subject matter is not supported by the description (PCT Article 6). These claims are supported by the amendments filed on pages 49A, 49B, 49C and 49D, which are inadmissible because they include subject matter that goes beyond the disclosure of the invention as filed (PCT Article 34(4)(a)(ii)).

ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA PROTEÍNA PBP2-a Y
SECUENCIAS HOMÓLOGAS PARA EL TRATAMIENTO DE INFECCIONES
E INMUNODIAGNÓSTICO EN BACTERIAS DEL FÍLUM *FIRMICUTES*

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a los anticuerpos monoclonales capaces de reconocer y unirse a la proteína PBP2a y a otras proteínas que presentan las secuencias homólogas a PBP2a, incluyendo los patógenos *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina - MRSA, *Staphylococcus* coagulasa-negativa, *Staphylococcus sciuri*, *Enterococcus spp.*, y cualquier otra bacteria que posee PBP2a o secuencias homólogas a esta proteína.

La invención todavía se refiere al uso de los anticuerpos monoclonales capaces de reconocer y unirse a la proteína de PBP2a y a otras proteínas que presentan secuencias homólogas a PBP2a en una inmunodiagnos15 complementaria para la detección de la resistencia a beta-lactamas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 Infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* resistentes a
metecilina (MRSA) es una causa importante de la preocupación para los
especialistas, presentando tasas de mortalidad y morbilidad más altas que
aquellas de las infecciones causadas por *Estafilococos* sensibles a metecilina
(1). Además, estas infecciones causan un tiempo más largo de hospitalización
25 y un costo más alto con los antimicrobianos, conduciendo a un coste más alto
en el tratamiento de pacientes infectados por este patógeno (1).

Vancomicina ha sido el primer antimicrobiano escogido para el tratamiento de infecciones causadas por MRSA. Sin embargo, el aislamiento

cada vez mayor de las cepas de MRSA en comunidades en los Estados Unidos y Australia (2, 3, 4), junto con la identificación de las cepas de MRSA con resistencia intermedia a vancomicina en Japón, Estados Unidos (5), y Brasil (6), provocan que la escena actual llegue a ser más severa. La descripción de cepas MRSA totalmente resistentes a vancomicina en 2004 (7) ha causado la preocupación enorme en la comunidad médico-científica. MRSA ahora representa un candidato fuerte para convertirse en el “superbicho o superbacteria” temeroso - un patógeno resistente a todos los fármacos disponibles hoy en día.

10 Generalmente, tasas del predominio de MRSA (relación de todas las infecciones por *S. aureus* causadas por MRSA) en infecciones en hospitales están aumentando gradualmente en las décadas pasadas. En un estudio conducido por Jarvis et al., incluyendo 1268 ICU (unidades de cuidado intensivo) en 337 hospitales en los Estados Unidos, el número de infecciones por MRSA en ICU cambió a partir de 660 a 2184 casos y el predominio crece a partir de la 35% hasta el 64.4% (8). En Japón, las tasas de predominio de infecciones en el hospital (HI) causadas por MRSA pueden presentar valores preocupantes, a partir del 60% hasta el 90% (9). En los estudios conducidos en los estados unidos, el porcentaje cambió del 2% en 1974 al 50% en 1997 (10, 11) y, en algunos hospitales en los Estados Unidos, más del 80% de HI son causados por MRSA (12). En Inglaterra, el predominio aumentó del 1.5% al 15.2% entre 1989 y 1995 y ahora (2004) la estimación es de 41.5% (13).

Además de las altas tasas de predominio, especialmente en la enseñanza y hospitales de gran tamaño, MRSA se juzga como el patógeno principal que causa brotes epidémicos en los hospitales brasileños (14). En 1986, más del 50% de cepas *S. aureus* con el origen del hospital aislado en pacientes de hospitales de la universidad en São Paulo eran resistentes a meticilina y, en 1993, la incidencia de MRSA en el hospital pediátrico de la

escuela de medicina paulista era del 70% (15). En un estudio conducido en hospitales en Belo Horizonte, Resende y otros. (16) precisaron un predominio del 71% de MRSA.

Las cepas de MRSA presentan una proteína de unión a penicilina con la afinidad muy baja para los antimicrobianos en la clase beta-lactama, tal como PBP2a (17). En presencia de esta enzima, que es codificada por el gen *mecA*, la bacteria es acertadamente sintetizada para peptidoglicano, incluso en presencia de los beta-lactamas. Esta enzima puede también encontrarse en *Staphylococcus* coagulasa-negativa y en *Staphylococcus Sciuri* - una bacteria presente en la flora normal de los perros. Además de resistencia a beta-lactamas, las cepas MRSA del hospital presentan resistencia a la mayoría de las otras clases de antimicrobianos disponibles, con el uso de glicopéptidos (vancomicina y teicoplanina) restantes como primer tratamiento de elección.

Dos estudios que usaban la vacuna de DNA contra PBP2a demostraron que esta proteína es inmunogénica y que la inmuno-respuesta obtenida puede conferir protección contra MRSA en análisis conducido en el modelo murina (18, 19). Sin embargo, se sabe que, en infecciones del hospital, la mayoría de los pacientes están inmunodeprimidos (20). En estos casos, una vacuna no puede generar los anticuerpos protectores a su debido tiempo para controlar una infección bacteriana.

Inmunogenicidad de PBP2a

PBP2a es una enzima multimodular clase II según la clasificación de Goffin y de Ghuysen (40). Esta enzima de 76-kilodalton está compuesta por una región de unión de membrana, un dominio no transpeptidasa y un dominio transpeptidasa, que contiene un núcleo activo de 4-aminoácido (STQK), responsable de las reacciones de transpeptidación

bacteriana (20 bis Ryfell, 1990).

Estudios del estado de la técnica con la vacuna de ADN contra PBP2a demuestran que los resultados de la reducción bacteriana (cuantificación renal) en animales inmunizados sometidos a desafíos por
5 infección sistémica eran de 3 a 4 veces en el trabajo de Ohwada et al. y de 1000 veces en el trabajo de Senna et al. Los autores de estos estudios utilizaron la secuencia completa (excepto la región de fijación de membrana) del gen *mecA* y un fragmento interno del dominio transpeptidasa, respectivamente.

10 Pero, según lo que se mencionó anteriormente, una vacuna no es capaz de generar anticuerpos protectores a su debido tiempo para controlar una infección bacteriana. Así, en caso de infecciones por MRSA, la administración de anticuerpos monoclonales anti-PBP2a es la terapia más adecuada para el tratamiento de estas infecciones.

15

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

El objetivo principal de la actual invención es proporcionar anticuerpos monoclonales capaces de reconocer y unirse a proteínas PBP2a
20 (SEQ ID NO.:1) y otras proteínas que presentan secuencias homólogas a PBP2a, incluyendo los patógenos *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina - MRSA, *Staphylococcus coagulasa-negativa*, *Staphylococcus sciuri*, *Enterococcus spp.*, y cualquier otra bacteria que posea PBP2a o secuencias homólogas a esta proteína.

25 Otro objetivo de invención es la utilización de anticuerpos monoclonales capaces de reconocer y unirse a la proteína PBP2a y otras proteínas que presentan secuencias homólogas a PBP2a en una inmunodiagnos complementario para la detección de resistencia a

betalactamas.

Los anticuerpos monoclonales de la presente invención están representados por secuencias SEQ ID NO.: 6, SEQ ID NO.: 7, SEQ ID NO.: 8, SEQ ID NO.: 9, SEQ ID NO.: 10, SEQ ID NO.: 11, SEQ ID NO.: 12, SEQ ID NO.: 13, SEQ ID NO.: 14, SEQ ID NO.: 15, SEQ ID NO.: 16 y SEQ ID NO.: 17.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra la prueba de inmunoenzima (ELISA) de sueros de animales inmunizados para producir anticuerpos anti-PBP2a.

La figura 2 muestra el resultado de un gel de poliacrilamida con muestras crudas y muestras después de la purificación.

La figura 3 muestra la prueba de inmunotransferencia de MRSA y lisados de MSSA contra un sobrenadante que contiene los anticuerpos monoclonales anti-PBP2a.

Figura 4 es una representación de los resultados de citometría de flujo de bacterias MRSA (CEB) y MSSA, incubados con anticuerpo monoclonal anti-PBP2a y marcados con ficoeritrina (PE).

La figura 5 muestra la prueba *in vitro* de protección (MIC - concentración inhibitoria mínima) conferida por el anticuerpo monoclonal anti-PBP2a purificado y vancomicina contra un inóculo de diferentes cepas MRSA.

La figura 6A muestra resultados de cuantificación renal en los animales tratados y no tratados con el anticuerpo monoclonal anti-PBP2a, sometido a una infección sistémica con una dosis subletal de cepa de MRSA CEB.

La figura 6B muestra resultados de cuantificación renal en los animales tratados y no tratados con el anticuerpo monoclonal anti-PBP2a, sometido a una infección sistémica con una dosis subletal de sepa ibérica

MRSA (clon epidémico europeo).

La figura 6C muestra resultados de cuantificación renal en los animales tratados y no tratados con el anticuerpo monoclonal anti-PBP2a, sometido a una infección sistémica con una dosis subletal de cepas WB79

5 CA-MRSA (cepa de la comunidad brasileña).

La figura 7A muestra la curva de supervivencia de animales tratados (protegidos) y animales no tratados (control) después de la infección por una dosis bacteriana letal (MRSA CEB).

La figura 7B muestra la curva de supervivencia de animales
10 tratados (protegidos) y los animales no tratados (control) después de la infección por una dosis bacteriana letal (MRSA Ibérico).

La figura 7C muestra la curva de supervivencia de animales tratados (protegidos) y animales no tratados (control) después de la infección por una dosis bacteriana letal (WB79 CA-MRSA).

15 La figura 8A muestra la cuantificación bacteriana en los riñones de animales tratados con el anticuerpo monoclonal anti-PBP2a, vancomicina y anticuerpo + asociación de vancomicina y animales no tratados después de la infección con bacterias (MRSA CEB).

La figura 8B muestra la cuantificación bacteriana en los riñones
20 de animales tratados con el anticuerpo monoclonal anti-PBP2a.

Las figuras 9A-9B muestran la interacción entre PBP2a recombinante (antígeno) y el clon de anticuerpos monoclonales 38 (figura 9A) y clon 10 (figura 9B).

La figura 10 es un gráfico del segundo análisis por citometría de
25 flujo de muestras de MRSA en presencia del anticuerpo anti-PBP2a marcado con FITC.

La figura 11 muestra el resultado de la protección *in vitro* conferida por los anticuerpos contra la cepa de enterococcus VRE.

La figura 12 se refiere a la dosis LD50 y dosis letal para la determinación de infección intraperitoneal.

La figura 13 muestra el resultado de eficacia de la protección *in vivo* de anti-PBP2a y anticuerpo monoclonal PBP5 de enterococos contra
5 infección sistémica.

La figura 14 muestra la prueba de inmunotransferencia para lisados de *Enterococcus faecium* resistentes a vancomicina contra sobrenadante que contiene anticuerpos monoclonales anti-PBPBP2a.

10

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La aparición de infecciones por bacterias multi-resistentes a antimicrobianos representa un aumento alarmante. La prevalencia de infecciones en el hospital causadas por MRSA ha aumentado en todas las
15 partes del mundo presentando alta morbilidad y causando alto costo debido al uso intensivo de antimicrobianos y al período más largo de hospitalización de pacientes (24). El tratamiento a base de quimioterapia ha mostrado signos de agotamiento, con aparición de muy pocos fármacos realmente novedosos y eficientes en el mercado (25).

20

En este contexto, inmunoterapia pasiva (re)aparece como una alternativa prometedora, presentando una serie de características ventajosas en comparación con la quimioterapia convencional: entre ellas, la menor toxicidad, mayor vida media plasmática (que facilita el tratamiento por la reducción de la dosis y quizás un tratamiento final a menor costo) y, sobre
25 todo en el caso de producto presentado aquí, toxicidad selectiva, recomendado por Paul Ehrlich (donde el fármaco selectivamente elimina el patógeno referido) (25a). Esta última característica es muy útil para prevenir la llamada presión de selección, interpretada por antimicrobianos de amplio

espectro - que provee la aparición de bacterias multi-resistentes (26).

Para desarrollar este producto, los inventores seleccionaron PBP2a como un objetivo, basado en estudios preliminares con la vacuna de ADN en modelos murina (18, 19, 21) y análisis de la molécula
5 inmunoestructural. PBP2a tiene su estructura dilucidada en 2002 (29) y se deposita en PDB (Protein Data Bank (Banco de Datos de Proteínas)) bajo el código lwmr.

Diferente de otros enfoques, los inventores trabajan con una región interna de la molécula con 76 aminoácidos, que flanquean el núcleo
10 activo de enzima (SxxK), en el dominio de transpeptidasa. Análisis de identificación de epítipo fueron realizados en la molécula y en su presentación a los diferentes alelos CHM clase II (programa Tepitope), con posterior verificación de su ubicación en la molécula (programa Visor SPDB). Este enfoque nos permite evaluar la facilidad de acceso de anticuerpos a
15 estos objetivos en la molécula nativa.

Este análisis computarizado muestra la presencia de epítipes cerca al núcleo activo de enzima, con grado excelente de reconocimiento por alelos CHM clase II, situado en la superficie PBP2a (no se muestran datos).

Estas vistas previas *in silico* fueron confirmadas por las pruebas
20 de reconocimiento objetivo realizadas (inmunotransferencia y citometría de flujo), y la unión de anticuerpo a esta región PBP2a demostró ser capaz de otorgar protección alta, demostrada por los resultados obtenidos en los ensayos realizados *in vitro* e *in vivo*. Los anticuerpos generados por el fragmento de 76-aminoácidos mostraron que confieren una mayor protección
25 que la generada por inmunización con PBP2a completo, como se había mostrado por los trabajos de Ohwada y Senna y fueron confirmados por los resultados de los inventores.

La epidemiología de las infecciones causadas por MRSA

muestra la presencia de los tipos clonales predominantes, responsables de brotes y epidemias en los hospitales de todo el mundo. Estos clones presentan una mayor capacidad de colonización y virulencia en comparación con cepas MRSA no epidémicas (30).

5 Como una forma de validar los resultados obtenidos, se pretende trabajar con diferentes clones de MRSA (clones epidémicos), representantes de la mayoría de las infecciones (especialmente las del hospital) causadas por MRSA.

10 La cepa CEB (clon epidémico brasileño) es responsable de la mayoría de las infecciones causadas por MRSA en los hospitales brasileños (31), siendo identificada también en otros países de América del Sur (32, 33), Portugal y Checoslovaquia (34). El clon epidémico europeo (Ibérico-MRSA) se encuentra en países europeos y en Estados Unidos (35).

15 Debido al aumento de casos de infecciones en la comunidad causadas por MRSA, uno de estas cepas (WB79 CA-MRSA), aisladas en Brasil, fue incluida en las pruebas actuales. Estas pruebas presentan características diferenciadas de las encontradas en hospitales, con mayor virulencia (presencia de Panton-Valentine leucocidina) y el perfil de resistencia a los antimicrobianos distintos de las cepas MRSA de hospital (36).
20 Recientemente, fue identificado un brote de infecciones por CA-MRSA en una población de hombres que practican sexo con otros hombres en los Estados Unidos (37). Desde esta fecha, podemos decir que las infecciones causadas por MRSA asumen un carácter de STD (enfermedades de transmisión sexual).

25 Los resultados de la protección conferidos por la administración de anticuerpos anti-PBP2a mostraron eficacia contra todos los diferentes clones probados, que nos llevó a creer en su aplicabilidad para infecciones (comunidad u hospital) causadas por cualquier tipo de MRSA.

 Algunas características importantes del producto de la presente

invención necesitan ser comentadas.

(i) resultados de protección *in vitro* motivan a creer que el mecanismo implicado de acción - bloque de una región cerca al núcleo activo de la molécula - es suficiente para inhibir el crecimiento bacteriano y multiplicación. De forma similar a los antibióticos beta-lactama, este mecanismo es dependiente del tiempo, la necesidad de que la bacteria se encuentre en la fase de multiplicación para exponer el objetivo de la acción de los fármacos

(ii) esta característica se ve favorecida por las propiedades farmacocinéticas de anticuerpos, las cuales presentan larga vida media de plasma (38). Comparando la terapia antibiótica, esto significa una administración en menor número de dosis, presentando la instalación de tratamiento para el paciente y tal vez menor costo final como consecuencia. Estas ideas fueron confirmadas en la práctica en el ensayo comparativo de protección con vancomicina (véase abajo).

(iii) la inhibición del crecimiento bacteriano *in vitro* significa también que el anticuerpo no necesita los mecanismos auxiliares tradicionales de respuesta antígeno-anticuerpo, tales como activación por opsonización y complemento. Teniendo en cuenta que la mayoría de las infecciones de hospital ocurre en pacientes que tienen el estado de inmunodepresión, esta característica del producto es extremadamente importante.

(iv) se sabe que el *Staphylococcus aureus* presenta una proteína A en su superficie. Esta molécula característicamente se une a la región Fc de inmunoglobulinas, que obstaculizan la actividad de opsonización del sistema inmunitario (38). Debido a los resultados obtenidos en nuestros ensayos, creemos que la concentración de anticuerpo administrado es capaz de saturar la proteína A existente en la superficie bacteriana, no previniendo el bloque PBP2a por los anticuerpos administrados.

Infecciones sistémicas causadas por MRSA han sido tratadas con el uso de glucopéptidos, especialmente vancomicina. Sin embargo, este fármaco presenta una gama de efectos secundarios, inmunotoxicidad (42), ototoxicidad, nefrotoxicidad y neutropenia transitoria (43) entre ellos y necesita
5 la administración durante largos períodos, presentando un alto costo de tratamiento final.

Utilizando un modelo de infección murina, fue posible comparar un tratamiento con vancomicina frente a anticuerpos monoclonales y la combinación de dos fármacos. Los resultados obtenidos indican que una dosis
10 de anticuerpos tenía acción similar o superior a 5 dosis de vancomicina y que la administración simultánea de los dos fármacos era más eficiente en la eliminación de la bacteria que la administración aislada. Estos datos son extremadamente importantes, ya que es posible pensar en un menor costo de tratamiento con el anticuerpo y una más eficiente recuperación de pacientes
15 con estado grave con la administración de vancomicina y anticuerpos.

Además de la utilización de los anticuerpos monoclonales anti-PBP2a para el tratamiento de infecciones por MRSA, la actual invención todavía considera las siguientes aplicaciones:

(i) los resultados del reconocimiento de una proteína con peso
20 molecular cercano a uno de PBP5 en la cepa de *Enterococcus sp.*, por anticuerpo monoclonal anti-PBP2a indican que es posible obtener una respuesta protectora contra este patógeno con la administración de anticuerpos. PBP5 presenta homología con PBP2a, con ambos siendo clasificados como PBP clase B multimodular, con baja afinidad por beta-
25 lactamas (40). Enterococos son bacterias que causan infecciones graves en hospital, presentando alto grado de resistencia intrínseca y adquirida a antimicrobianos. Cepas resistentes a la vancomicina (VRE) representan un reservorio de genes de resistencia a glucopéptidos y pueden ser transferidas

a otros patógenos (41).

(ii) estos anticuerpos pueden tener aplicabilidad para la identificación de PBP2a mediante pruebas de inmunodiagnos. Por ejemplo, el uso de pruebas inmunes basadas en la aglutinación de partículas de látex
5 unidas al anticuerpo puede proporcionar un resultado que prevé resistencia a todos los antibióticos beta-lactama en pocas horas. En las pruebas convencionales de sensibilidad a antimicrobianos (como pruebas de sensibilidad a los antibióticos), estos resultados sólo son liberados después de 12 a 24 horas.

10 (iii) una vez que los anticuerpos monoclonales se han utilizado con éxito en aplicaciones tópicas contra úlceras crónicas (infliximab, consulte referencia Streit et al. y WO 1999041285 A1), estos anticuerpos pueden administrarse tópicamente para promover la descolonización nasal por MRSA y para el tratamiento de lesiones cutáneas causadas por este patógeno.

15 Basados en el conocimiento y los problemas encontrados en el estado de la técnica, los inventores actuales realizan vacunas en animales con una vacuna de ADN con construcciones correspondientes a la *mecA* del gen (SEQ ID NO.: 2) sin la región de fijación de membrana y vacunas con una región interior de 76 aminoácidos del dominio transpeptidasa (SED ID NO.: 3)
20 que comprende el núcleo activo de la enzima.

Las inmunizaciones se realizaron en las mismas condiciones presentadas en las obras de Ohwada et al y Senna et al, quienes desarrollaron una vacuna de ADN contra PBP2a, utilizando la secuencia completa (excepto la región de fijación de membrana) del gen *mecA* y un
25 fragmento interno del dominio transpeptidasa. Las inmunizaciones se realizaron con 4 dosis y los animales inmunizados y un grupo control no inmunizado fueron desafiados por una infección sistémica con MRSA y una determinación del número de bacterias presentes en los riñones de los

animales en dos periodos distintivos. Los resultados obtenidos demostraron que la inmunización con el fragmento de transpeptidasa confieren una mayor reducción en el número de bacterias presentes en los riñones de animales de aquellas en los animales vacunados con el gen *mecA*.

5 Por lo tanto, vemos que los anticuerpos generados contra el fragmento transpeptidasa proporcionan una mejor protección en las condiciones usadas (vacuna de ADN en modelo murina) que uno por anticuerpos contra PBP2a. El fragmento de transpeptidasa incluye el núcleo activo de enzima STQK (SEQ ID NO.: 4).

10 En consecuencia, basándose en los resultados encontrados, los inventores dirigen la invención para producir anticuerpos monoclonales capaces de reconocer y unirse a la proteína PBP2a y otras proteínas presentando secuencias homólogas a la proteína PBP2a y mediante el uso de fragmento de transpeptidasa que incluye el núcleo activo de enzima.

15 Ahora se describirá la invención con referencia a ejemplos, que no deben ser considerados como limitación.

La invención se describirá ahora con referencia a los ejemplos, que no deben considerarse limitativos.

20

EJEMPLO 1

Materiales y métodos:

25

1. Bacterias:

Se utilizaron las siguientes cepas *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina: Ibérica-MRSA, COL-MRSA (cedida por Unité des Agents Antimicrobiens - Institut Pasteur [unidad de agentes antimicrobianos -

Instituto Pasteur], Dr. Patrice Courvalin), WB79 CA-MRSA y CEB-MRSA (cedido por el Dr. Agnes Figueiredo, Instituto de Microbiologia [Instituto de microbiología] de UFRJ); una cepa *Enterococcus faecalis* resistentes a la vancomicina; y una cepa *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina (MSSA).

- 5 Cepas de *Escherichia coli* BL21 DE3 (Novagen) y TOP10 (Invitrogen) también se utilizaron como control.

2. Animales:

- Ratones Balb/C hembra, 4 a 8 semanas de edad, obtenidos de
- 10 CECAL-FIOCRUZ y alojan en LAEAN-BioManguinhos fueron utilizados en la inmunización y estudios *in vivo* de protección.

3. Inmunización:

- Los ratones (4 animales) recibieron una dosis inicial de 100
- 15 microgramos de pCI-Neo plásmido:fragmento de gen MRSA *mecA* (18), seguido por una dosis de 10 microgramos de proteína recombinante purificada 14 días más tarde, correspondiente a una región interna de PBP2a de MRSA (21), emulsionada en adyuvante de Freund completo, seguido por otras dosis 14 días más tarde, emulsionadas en adyuvante incompleto de Freund.
- 20 Catorce días después, el animal con mejor respuesta inmunitaria (evaluado por inmunoensayo de enzima - ELISA) recibió una dosis intravenosa de 10 microgramos de proteína purificada diluida en PBS (solución salina amortiguada de fosfato). Tres días después de la inyección IV, el animal fue sometido a la eutanasia por asfixia en CO₂ (CEUA L0009-07 protocolo -
- 25 FIOCRUZ), y el bazo asépticamente fue eliminado para la fusión celular. El suero de los animales con mejor respuesta inmune fue usado como control positivo para otras pruebas inmunológicas.

4. Producción de anticuerpos monoclonales:

Los linfocitos removidos del bazo fueron sometidos a la fusión con las células de mieloma SP2/0-Ag14 (ATCC 1581), utilizando polietilenglicol para la fusión y fueron cultivados en medio de hipoxantina-aminopterin-timidina a 37°C en atmósfera de CO₂ 10%, según el protocolo para la producción de anticuerpos monoclonales en Current Protocols in Immunology (22). Se evaluaron los hibridomas resultantes por la prueba de ELISA después de 14 días, utilizando la proteína recombinante purificada como antígeno, de acuerdo con lo que se describe a continuación. Los mejores hibridomas fueron sometidos a la clonación, con selección de los mejores clones por ELISA y estos últimos están almacenados en nitrógeno líquido.

5. Inmunoensayo de enzima - ELISA:

Placas de plástico Maxisorb de 96 pozos están sensibilizados con 500 nanogramos/pozo de proteína recombinante (fragmento PBP2a) en regulador de pH de carbonato/bicarbonato y se incuban a 4°C durante toda la noche. En el día siguiente, las placas se lavan tres veces con PBS que contiene 0.05% de Tween 20 y se bloquean en PBS y el 5% de leche desnatada durante dos horas a 37°C. Las muestras para ser analizadas (suero de animales inmunizados diluidos a 1:100 o sobrenadantes de cultivo celular) y se incuban por 2 horas a 37°C fueron utilizados. La placa fue lavada tres veces con PBS y Tween 20 (0.05%) nuevamente y el conjugado anti-Ig (HRP Ig anti-ratón SIGMA A 0412) fue añadido en dilución de 1:5000, seguido de incubación a 37°C durante 90 minutos. Después de este período, la placa fue lavada tres veces con PBS y Tween 20 (0.05%), con adición de desarrollador de color TMB peroxidasa (BioRad) e incubación durante 15 minutos, protegido de la luz. La reacción fue interrumpida por la adición de 0.5

N de H₂SO₄, y la lectura se realizó a 450 nm. Un suero policlonal hiperinmune diluido 1:200 se utilizó como control positivo.

5.1. Ensayos de avidéz basados en inmunoensayo de enzima

5

5.1.1. Ensayo de avidéz con urea (Niederhouser et al. 5.1):

El protocolo es similar al inmunoensayo (5), con las siguientes modificaciones: tras la incubación de muestras (100 ng de anticuerpo monoclonal purificado clon 10 y 2.0 ng de anticuerpo monoclonal purificado clon 38) durante dos horas a 37°C, las muestras fueron sometidas a tres lavados con urea 8 M en PBS y Tween 20 (0.05%), seguido por cuatro lavados en PBS y Tween 20 (0.05%), presentando la misma muestra normalmente procesada (sin tratamiento con urea) como control. Tras la lectura de la densidad óptica de muestra, la tasa de avidéz fue calculada por la relación de lectura con urea dividida por la lectura sin urea, multiplicado por 100 (resultado percentil).

10

15

5.1.2. Ensayo de avidéz con tiocianato de amonio (Goldblat et al - 5.2)

El protocolo es similar a un inmunoensayo (5), con las siguientes modificaciones: tras la incubación de muestras (100 ng de anticuerpo monoclonal purificado clon 10 y 2.0 ng de anticuerpo monoclonal purificado clon 38) durante dos horas a 37°C, las muestras fueron sometidas a tratamiento con tiocianato de amonio durante 30 minutos a 37°C en las concentraciones siguientes: 3 M; 1.5 M; 1.0 M; 0.75 M; 0.50 M; 0.25 M; y 0.125 M. Una muestra no tratada con tiocianato de amonio fue utilizada como control para cada clon.

20

25

Tras la lectura de la densidad óptica de muestra, la tasa de avidéz fue calculada por la siguiente fórmula: AR (tasa de avidéz) = [(log 50 –

$\log A) \times (B - A) / [\log B - \log A] +$; donde $\log 50 = 1.70$. A es la menor concentración de tiocianato de amonio que se traduce en una reducción de absorbancia inferior al 50%, y B es la mayor concentración de tiocianato de amonio que se traduce en una reducción de absorbancia superior al 50%.

5

6. Producción y purificación de anticuerpo monoclonal:

Una muestra de clones previamente seleccionados 10 y 38 fueron cultivados en un medio sin suero (GIBCO VP-SFM) con la adición de 1% de BSA en frascos de 100 ml en una estufa con atmósfera de 10% CO₂.

- 10 Los sobrenadantes fueron sometidos a centrifugación, seguido de filtración en filtros de 0.22 micrómetros y purificados en cromatografía de alta resolución (HPLC) con proteína A SelectSure resina MAB (GE). Los anticuerpos fueron neutralizados a pH 7.0 con 1 M Tris, pH 10.0, dializado contra PBS 0.5x en agua desionizada. Las muestras fueron sometidas a procedimiento de
- 15 liofilización, resuspendidas en agua desionizada, cuantificadas por el método de Lowry y evaluadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida.

7. Reconocimiento de objetivo:

20

7.1. Reconocimiento *in vitro* PBP2a - inmunotransferencia:

- Una cepa de MRSA (CEB), una cepa de *Staphylococcus aureus* (MSSA) sensible a meticilina, una cepa de *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina y la cepa BL-21 DE3 *Escherichia coli* fueron cultivadas en fase exponencial. Un ml de cada muestra se centrifuga y lisa por agitación en
- 25 perlas de vidrio en un dispositivo de batidora mini-Bead (Biospect Products), 3 veces durante 30 segundos. Una alícuota de cada muestra fue sometida a electroforesis en gel de poliacrilamida de desnaturalización 12% (SDS-PAGE), y las proteínas fueron transferidas posteriormente a una membrana de nylon

(Hybond N-BioRad). La membrana fue bloqueada bajo agitación suave durante dos horas en regulador de pH de PBS que contiene 10% leche desnatada y 1% de BSA (albúmina de suero bovino). La membrana fue lavada tres veces en PBS y Tween 20 (0.05%) y tres veces en PBS. A continuación, este último se colocó en incubación durante dos horas, con sobrenadante de anticuerpo monoclonal anti-PBP2a diluido en PBS en una relación 1:1. Tras la incubación, la membrana fue lavada como anteriormente se describió y conjugado de fosfatasa alcalina (anticuerpo anti-IgG murina - Sigma A3688) en la relación de 1:15,000 y se incubó durante noventa minutos. Después de este período, el lavado en PBS se realizó nuevamente y el desarrollo con sustrato Western Blue para fosfatasa alcalina (Promega) se realizó.

7.2. Reconocimiento PBP2a en la superficie de la bacteria - citometría de flujo:

Una cepa de MRSA (CEB) fue cultivada en la fase estacionaria (ON) o exponencial. Las muestras fueron lavadas en PBS 1x y se resuspenden en un DO_{600} de 0.6 ($\sim 10^8$ bacterias/ml). Estas últimas se centrifugan en 1 ml (10^8 bacterias) y resuspenden en BSA 0.5% y una dilución de 1:10 de suero normal (murina/humano). A continuación, las muestras se incuban durante 30 minutos a 4°C, y más tarde, los concentrados (pellas) fueron lavadas 2 veces en PBS y resuspendidas en 100 microlitros de PBS que contiene BSA 0.5% y una dilución de anticuerpo monoclonal anti-PBP2a 1:10000 e incubadas durante 30 minutos a 4°C. Después de este paso, las muestras fueron lavadas previamente nuevamente y resuspendidas en 100 microlitros de PBS y BSA 0.5% y una dilución (1:1000) de conjugado de PE (ficoeritrina) ratón anti-Ig, más tarde siendo incubado en oscuridad durante 30 minutos a 4°C. A continuación, las muestras fueron lavadas nuevamente y fijadas durante 15 minutos a 4°C en PBS que contiene 2% de

paraformaldehído. Después de esta preparación, las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo (Becton y Dickinson - FACScalibur).

5 8. Ensayos de protección *in vitro* - determinación de concentración inhibitoria mínima:

Cepas MSRA (CEB, Ibéricas, COL y CA) fueron cultivadas en fase exponencial hasta 600 nm de densidad óptica igual a 0.5. El inóculo aplicado fue ajustado para contener aproximadamente 100,000 bacterias. Caldo de Müller Hinton, inóculo bacteriano y crecientes cantidades de anticuerpo monoclonal de anti-PBP2a purificado se añadieron a los tubos de ensayo o placas de 24 cavidades. Las placas o tubos fueron sometidos a incubación a 37°C durante 12 horas. Después de este período, la presencia o ausencia de turbidez se observó en las muestras. La concentración inhibitoria mínima fue considerada como la menor cantidad de anticuerpo capaz de inhibir el crecimiento bacteriano de inóculo (100,000 bacterias).

9. Ensayos de protección *in vivo*:

20 9.1. Determinación de dosis letal y LD₅₀ para cepas MRSA

La determinación de la dosis letal y LD₅₀ se realizo de acuerdo al método Reed Muench (23) para cepas MRSA (CEB, Ibérico, WB79 CA y COL). Grupos de ratones Balb/C hembra de 8 semanas se inoculan por vía intraperitoneal con crecientes dosis de bacterias y se observan durante 7 días. Los animales que sobrevivieron después de este período fueron sometidos a la eutanasia, conforme a las normas de bienestar animal establecidas.

25 9.2. Infección sistémica y ensayos de cuantificación renal bacteriana

Cepas MRSA (CEB, Ibéricas y WB79 CA) fueron cultivadas en fase exponencial ($DO_{600} \sim 0.6$), lavadas y resuspendidas en PBS estéril 1x en $DO_{600} \sim 0.5$, correspondiente a aproximadamente 2×10^8 bacterias. Esta concentración fue calculada por dilución y siembra en placas de agar BHI que contienen 10 microgramos de oxacilina/ml. Ratones hembra Balb/C de 8 semanas recibieron una dosis intraperitoneal de 400 microgramos de anticuerpo monoclonal anti-PBP2a purificado en el primer día. En el sexto día, los animales fueron sometidos a la eutanasia y los riñones asépticamente fueron retirados. A continuación, los riñones fueron homogeneizados en 1 ml de caldo de Luria estéril y sucesivamente se diluyeron en serie de 10. 100 microlitros de cada dilución se sembraron en placas de agar BHI con 10 microgramos/ml de oxacilina e incubaron durante 24 horas a 37°C , con un recuento de las colonias resultantes y cálculos de diluciones totales que se realizaron.

15

9.3. Ensayo de supervivencia

Cepas MRSA fueron cultivadas en las mismas condiciones descritas anteriormente, pero se realizó un ajuste del inóculo para la LD_{50} previamente establecida. Ratones hembra Balb/C de 8 semanas recibieron una dosis intraperitoneal de 500 microgramos de anticuerpo monoclonal anti-PBP2a purificado en el primer día. En el día siguiente, estos animales además de un grupo de control fueron infectados con una dosis de aproximadamente 2.5 a 6.0×10^8 bacterias por vía intraperitoneal, según la LD_{50} de cada cepa. Los animales fueron observados durante 10 días, con los supervivientes siendo sometidos a eutanasia.

25

10. Estudio de protección *in vivo* comparativo de anticuerpo monoclonal anti-PBP2a y vancomicina - cuantificación renal:

Ensayo I

Cuatro grupos de ratones Balb/C hembra de 8 semanas (4 animales por grupo) recibieron una dosis infectiva de 6.0×10^7 bacterias (CEB-MRSA) por vía intraperitoneal. Los animales recibieron dosis de anticuerpo monoclonal purificado (MAB), vancomicina, MAB + vancomicina y control negativo, de acuerdo a los grupos siguientes:

Grupo 1: MAB (400 microgramos) (primer día)

Grupo 2: vancomicina (150 microgramos, vía intramuscular, 12/12 horas)

Grupo 3: vancomicina + MAB (350 microgramos) (1 día después de la infección)

Grupo 4: control

Las primeras dosis de anticuerpos y vancomicina se administraron 4 horas después de la administración de la dosis infectiva. Los animales fueron sometidos a la eutanasia en el cuarto día, y los riñones asépticamente fueron eliminados y sometidos a calificación renal, de acuerdo con lo que se describió anteriormente.

20

Ensayo II

Este ensayo se realizó en la misma forma que el anterior, pero con una baja dosis infecciosa (7.0×10^6 bacterias), con el grupo 1 que se trata con 500 microgramos de anticuerpo monoclonal purificado; grupo 2 tratado con vancomicina (150 microgramos, vía intramuscular, 12/12 horas; 5 dosis); grupo 3 tratado con vancomicina + 500 microgramos de anticuerpo monoclonal; y grupo 4 control (animales no tratados).

25

11. Regiones de complementariedad de identificación-

complementariedad (CDR) de cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo monoclonal anti-PBP2a

11.1. Extracción de ARNm de células de hibridoma

5 Una centrifuga de 10 ml (pella) de un cultivo de células de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales se procesa para extracción de ARNm utilizando el kit de RNeasy Minikit (Qiagen).

11.2. Obtención de ADNc

10 Reacción de transcriptasa inversa: kit de transcriptasa inversa M-MLV (Invitrogen) fue utilizado para la obtención de ADN complementario, siguiendo las pautas de fabricación.

11.3. Amplificación de cadenas VH y VL por reacción en cadena

15 de polimerasa (PCR)

Las reacciones se realizaron mediante las secuencias de arranque (iniciadores) a continuación.

20

25

55

5

10

15

SEQ ID NO.	Secuencia	Uso
PARA CADENA PESADA		
18	5' ATG(GA) A(GC)TT(GC)(TG)GG(TC)T(AC)A(AG)CT(GT)G(GA)TT 3'	Amplificación VH
19	5' ATG(GA)AATG(GC)A(GC)CTGGT(CT)(TA)T(TC)CTCT 3'	Amplificación VH
20	5' GATGTGAAGCTTCAGGAGTC 3'	Amplificación VH
21	5' CAGGTGCAGCTGAAGGAGTC 3'	Amplificación VH
22	5' CAGGTGCAGCTGAAGCAGTC 3'	Amplificación VH
23	5' CAGGTTACTCTGAAAGAGTC 3'	Amplificación VH
24	5' GAGGTCCAGCTGCAACAATCT 3'	Amplificación VH
25	5' GAGGTCCAGCTGCAGCAGTC 3'	Amplificación VH
26	5' CAGGTCCAACTGCAGCAGCCT 3'	Amplificación VH
27	5' GAGGTGAAGCTGGTGGAGTC 3'	Amplificación VH
28	5' GATGTGAACTTGAAGTGTC 3'	Amplificación VH
29 (gamma 1)	5' TGGACAGGGATCCAGAGTTCAGGTCACT 3'	Amplificación VH
PARA CADENA LIGERA		
30	5' GACATTGTGATGACCCAGTCT 3'	Amplificación VL
31	5' GATGTTTTGATGACCCAAACT 3'	Amplificación VL
32	5' GATATTGTGATAACCCAG 3'	Amplificación VL
33	5' GACATTGTGCTGACCCAATCT 3'	Amplificación VL
34	5' GATATTGTGCTAACTCAGTCT 3'	Amplificación VL
35	5' GATATCCAGATGACACAGACT 3'	Amplificación VL
36	5' GACATCCAGCTGACTCAGTCT 3'	Amplificación VL
37	5' CAAATTGTTCTCACCCAGTCT 3'	Amplificación VL
38	5' CAGGCTGTTGTGACTCAGGAA 3'	Amplificación VL
39 (kappa 18)	5' TACAGTTGGTGCAGCATC 3'	Amplificación VL

11.4. Secuenciación de cadenas ligeras y pesadas de anticuerpo monoclonal anti-PBP2a

20

Pasos de secuenciación:

25

I. Amplificación

Esta se realizó mediante las secuencias de arranque anteriores, definidas por SEQ ID NO.: 18 SEQ ID NO.: 39.

II. Secuenciación

Se utilizó el dispositivo ABI Prism 3100, analizador genético (Hitachi).

11.5. Análisis de secuencia e identificación de cadena ligera y pesada CDR

Las secuencias de ADN obtenidas fueron analizadas con la ayuda del programa Star ADN y fueron traducidas a secuencias de aminoácidos (sitio ExpASy – programa de traducción) para análisis posterior por algoritmos de Kabat (24) y Chotia (25) para la identificación de cadenas ligera y pesada de CDR.

12. Determinación de constantes de asociación y disociación de anticuerpos monoclonales (método de clones 10 y 38 por resonancia plasmón superficie [SPR] [Biacore])

Se realizaron mediciones de SPR, mediante un sensor CM-5 en un dispositivo de Biacore X® (Biacore AB, Uppsala, Suecia). La unión de reactivos y reguladores de pH de HBS-EP (10 mM hepes, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% P20 [Tween 0, pH 7.4]) fueron adquiridos con la empresa GE Healthcare.

EJEMPLO 2

1. Obtención de anticuerpos monoclonales de murina anti-PBP2a:

Un grupo de animales fue sometido al protocolo de inmunización de acuerdo a lo que se describió anteriormente. El resultado evaluado por la prueba ELISA es descrito en la figura 1.

Tras el procedimiento de fusión (fusión de número 90-LATAM), el sobrenadante de 96 cavidades (hibridomas) fue analizado por la prueba ELISA. De este total, se seleccionaron las cinco mejores muestras y se ampliaron las células (clonación). A continuación, una vez más, los sobrenadantes resultantes fueron analizados por ELISA. Muestras positivas

fueron validadas por inmunotransferencia contra la proteína recombinante purificada (PBP2a) para validar los resultados obtenidos por ELISA. El resultado final está en el cuadro I.

La figura 1 muestra el resultado de la prueba de inmunoenzima (ELISA) de los sueros de animales inmunizados para producir anticuerpos anti-PBP2a. Cada trazo corresponde al suero diluido 1:100 de los animales inmunizados. Suero de control positivo es un trazo angular [□□□]. La primera barra de cada trazo: suero pre-inmune; segunda barra: suero después de la cuarta inmunización; y la tercera barra: suero después de la quinta inmunización.

CUADRO I

Clonaciones de fusión 90: balance final

Hibridomas clonados	No. total de clones	Clones positivos (ELISA)	Clones positivos (inmuno-transferencia)	Clones seleccionados
77	70	2	1 (clon 38)	1
68	108	10	1 (clon 10)	1
79	91	Cero	-	-
17	101	Cero	-	-
70	48	2	Cero	-
	418	14	2	2

De los clones seleccionados, el clon 77-38 fue sometido a procedimiento de re-clonación para verificar la estabilidad de células para secretar los anticuerpos monoclonales. De las 50 cavidades analizadas, todas presentan un resultado positivo por la prueba ELISA. Estos clones fueron ampliados y son almacenados en nitrógeno líquido en las instalaciones de LATAM (laboratorio de tecnología de anticuerpo monoclonal).

2. Crecimiento, producción y purificación de anticuerpos monoclonales:

El procedimiento fue normalizado de acuerdo a lo que se

describió anteriormente. El resultado obtenido es aproximadamente de 4 miligramos de anticuerpos monoclonales para cada 100 ml de sobrenadante sometido al procedimiento de purificación. Los resultados obtenidos pueden verse a continuación.

5 En la figura 2, podemos ver un gel de poliacrilamida con muestras crudas y después de la purificación. Esta figura 2 muestra el gel de poliacrilamida no desnaturalización con muestras de sobrenadante antes (columna 1) y después de la purificación (2) en la columna HPLC con resina MAb SelectSure. Columnas 3 a 9 corresponden a fracciones de muestra
10 purificadas obtenidas. La flecha indica el tamaño aproximado de 150 kDa.

3. Caracterización funcional de anticuerpos monoclonales:

3.1. Reconocimiento *in vitro* de PBP2a - inmunotransferencia

15 A fin de investigar la capacidad de reconocimiento de anticuerpos por el direccionamiento en el patógeno (PBP2a y secuencias similares), se realizó la prueba de inmutransferencia con bacterias presentando PBP2a (CEB y COL MRSA), una cepa de MSSA (*Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina) (no presentando PBP2a), una cepa de
20 *Enterococcus sp.*, resistente a vancomicina (presentando PBP5), una transpeptidasa con baja afinidad para antibióticos beta-lactama (homólogos a PBP2a) y una cepa de *Escherichia coli* (donde se generó la proteína recombinante) como control negativo. Los resultados obtenidos muestran que el anticuerpo fue capaz de reconocer una proteína con peso molecular de
25 aproximadamente 76 kDa en MRSA y cepas *Enterococcus sp.*, correspondientes al tamaño de PBP2a y PBP5, respectivamente. No reactividad del anticuerpo monoclonal fue visto con proteínas de *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina (PBP2a-negativo) ni con la

cepa de *Escherichia coli*. Los resultados pueden verse en la figura 3 (inmunotransferencia contra MRSA y MSSA).

El resultado de la prueba de inmunotransferencia de lisados MRSA y MSSA contra el sobrenadante que contiene los anticuerpos monoclonales anti-PBP2a se muestra en la figura 3.

- 1.- marcador de peso molecular (caleidoscopio);
- 2.- crecimiento de muestra de MSSA en fase exponencial;
- 3 y 4.- crecimiento de muestra de MRSA en fase exponencial;
- 5.- crecimiento de muestra MSSA en fase estacionaria (durante la noche); y
- 6 y 7.- crecimiento de muestras MRSA en fase estacionaria. La flecha izquierda indica el peso molecular de PBP2a.

3.2. Reconocimiento de PBP2a en la superficie de la bacteria - citometría de flujo

El objetivo de la prueba de citometría de flujo es validar la capacidad de reconocimiento del objetivo de la bacteria en su forma nativa por el anticuerpo monoclonal. En pruebas anteriores (inmunotransferencia), observamos el reconocimiento del objetivo en proteínas sometidas a un proceso de desnaturalización que se produce durante la separación de proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida de desnaturalización. Una vez más, analizamos una cepa de control negativo (MSSA, PBP2a negativo) y una cepa MRSA (CEB) cultivadas en fases estacionarias y exponenciales. Los resultados obtenidos muestran que el anticuerpo es capaz de reconocer el destino en la superficie bacteriana en ambas condiciones. La presencia de la proteína A en la superficie de *Staphylococcus* no fue capaz de inhibir el enlace de anticuerpos con PBP2a. Los resultados obtenidos pueden verse en la figura 4.

La figura 4 muestra los resultados de la citometría de flujo de MRSA (CEB) y bacterias MSSA incubadas con anticuerpo monoclonal anti-PBP2a y marcados con ficoeritrina (PE). En (1), las bacterias de MSSA; en (2), MRSA crece en fase estacionaria; en (3), MRSA crece en fase exponencial. Las poblaciones de MRSA presentan un desplazamiento a la derecha, correspondiente a un aumento en las células marcadas por el conjugado fluorescente.

4. Evaluación de protección conferida por el anticuerpo monoclonal anti-PBP2a:

4.1. Pruebas *in vitro* de protección

Determinación de concentración inhibidora mínima (MIC)

Estos ensayos tienen como objetivo evaluar la capacidad del anticuerpo para unirse directamente al objetivo en un sistema cerrado. Para los anticuerpos monoclonales con finalidad terapéutica, resultados positivos tienen importancia extrema, como significan que el anticuerpo es capaz de reconocer el objetivo y a bloquear el crecimiento bacteriano sin la ayuda del sistema inmune hospedero, tal como mecanismos de opsonización y activación de complemento, resultando de la acción combinada con el sistema inmune innato y adaptativo del hospedero. Se evaluaron las cepas CEB, COL y MRSA ibéricas, donde valores similares de MIC (aproximadamente 500 microgramos) fueron vistos en las condiciones evaluadas. Estos datos indican que independientemente de los antecedentes genéticos de las diferentes cepas MRSA, las dosis de anticuerpos necesarias para bloquear el crecimiento no son las mismas. Estos resultados pueden verse en la figura 5.

La figura 5 muestra la prueba de la protección *in vitro* (MIC - concentración inhibidora mínima) conferida por el anticuerpo monoclonal anti-PBP2a purificado y vancomicina contra un inóculo de 10^5 células de diferentes cepas MRSA. La ausencia de turbidez indica que no hay ningún crecimiento bacteriano en las condiciones analizadas.

- 1A: CEB MRSA (clon brasileño epidémico) + 250 μ g de anticuerpo;
- 2A: CEB MRSA + 500 μ g de anticuerpo;
- 3A: CEB MRSA + 750 μ g de anticuerpo;
- 4A y 6A: controles negativos de cepa CEB MRSA.
- 1B: COL MRSA + 250 μ g de anticuerpo;
- 2B: COL MRSA + 500 μ g de anticuerpo;
- 3B: COL MRSA + 750 μ g de anticuerpo;
- 4B y 6B: controles negativos de cepa de COL MRSA.
- 1C: MRSA ibérico (clon epidémico europeo - EEC) + 250 μ g de anticuerpo;
- 2C: EEC MRSA + 500 μ g de anticuerpo;
- 3C: EEC MRSA + 750 μ g de anticuerpo;
- 4C y 6C: controles negativos de cepa de EEC MRSA.
- 1D: CEB MRSA + 150 μ g de vancomicina;
- 2D: CEB MRSA + 300 μ g de vancomicina;
- 3D: CEB MRSA + 500 μ g de vancomicina;
- 4D: CEB MRSA + 750 μ g de vancomicina;
- 5D y 6D: controles negativos.

4.2. Pruebas de protección *in vivo*

4.2.1. Determinación de las dosis letales y sub-letales para cepas CEB, ibérica, WB79 CA y COL MRSA:

5 Estos ensayos son necesarios para que la protección *in vivo* sea evaluada en los dos modelos utilizados - la cuantificación renal por dosis subletales prueba y la prueba de supervivencia después de la infección sistémica con un inóculo más grande de bacterias - capaces de provocar la muerte de aproximadamente 50% de los animales (LD_{50}). La ruta elegida fue

10 intraperitoneal, debido a la facilidad de administración y a la ausencia de pérdidas. Una adaptación del método Reed-Muench fue utilizado para realizar el ensayo, con dos animales por condición (dosis infecciosa bacteriana en concentraciones crecientes) para determinar LD_{50} y dosis subletales, y tres

15 diferentes dosis fueron probadas, una vez que hemos tenido conocimiento previo sobre las dosis letales medias para *Staphylococcus aureus*. Cepa de COL MRSA, el primer clon MRSA que tiene su genoma secuenciado, se utiliza como cepa de referencia para estudios sobre este patógeno. Sin embargo,

20 demostró ser poco virulenta, requiriendo altas dosis infectivas en relación con los otros clones MRSA para causar infección en animales. Por lo tanto, no fue utilizada en los ensayos de protección.

4.2.2. Ensayos de protección renal después de una infección sistémica con dosis subletales

25 Utilizando un modelo de cuantificación renal después de la infección, estos ensayos permitirán evaluar la capacidad del anticuerpo para reducir la presencia de bacterias en órganos vitales (riñón) después de una infección sistémica. En tres ensayos independientes con cepas virulentas de MRSA de

diferentes orígenes genéticos se alcanzó una reducción superior a 3 log (1000 veces). En estos ensayos, los animales recibieron una dosis anterior de 500 microgramos de anticuerpo. La protección conferida por una dosis menor de anticuerpo (250 microgramos) fue evaluada en el ensayo con tensión CA-
5 MRSA, donde una reducción bacteriana también se observó, pero menor que la obtenida con la dosis de 500 microgramos. Los resultados pueden verse en las figuras 6A, 6B y 6C.

La figura 6A muestra los resultados de cuantificación renal en los
10 animales tratados y no tratados con el anticuerpo monoclonal anti-PBP2a y sometido a una infección sistémica con una dosis subletal de cepa de MRSA CEB. En bandas horizontales: log de concentración de bacterias aisladas de los riñones de cada animal no tratado. En el patrón de cuadros: log de cantidad de bacterias aisladas de los riñones de cada animal tratado con el
15 anticuerpo. Cuantificación bacteriana: controles: C1: 2000 bacterias; C2: 29,000 bacterias; C3: 220,000 bacterias; C4: 52,000 bacterias (media de 75,750 bacterias). Animales tratados (protegidos): P1: 20 bacterias; P2, P3 y P4: 10 bacterias (media de 12.5 bacterias). Reducción en la cantidad de bacterias recuperadas de los animales tratados en relación con los no
20 tratados: 6060 veces.

La figura 6B muestra los resultados de cuantificación renal en animales tratados y no tratados con el anticuerpo monoclonal anti-PBP2a y sometidos a una infección sistémica con una dosis subletal de cepa de MRSA ibérica (clon
25 epidémico europeo). En bandas horizontales: log de concentración de bacterias aisladas de los riñones de cada animal no tratadas. En el patrón de cuadros grandes: log de cantidad de bacterias aisladas de los riñones de cada animal tratado con el anticuerpo. Barras en patrón de cuadros pequeños

indican las medias respectivas obtenidas. Cuantificación bacteriana: controles: C1: 210,000 bacterias; C2: 44,000 bacterias; C3: 300,000 bacterias; C4: 290,000 bacterias (media de 211,000 bacterias). Animales tratados (protegidos): P1: 80 bacterias; P2: 200 bacterias; P3: 10 bacterias; y P4: 60 bacterias (media de 87.5 bacterias). Reducción de la cantidad de bacterias recuperadas de los animales tratados en relación con los no tratados: 2420 veces.

La figura 6C muestra los resultados de cuantificación renal en los animales tratados y no tratados con el anticuerpo monoclonal anti-PBP2a y sometidos a una infección sistémica con una dosis subletal de cepa WB79 CA-MRSA (cepa de comunidad brasileña). Cinco primeras barras (en xx, trazado horizontal y patrón de cuadros grandes): log de concentración de bacterias aisladas de los riñones de cada animal no tratado. Primera barra (en xx): estimado en relación con un animal muerto antes de la eutanasia. Barras de 6, 7, 8 y 9 (en trazado horizontal y patrón de cuadros): log de cantidad de bacterias aisladas de los riñones de animales tratados con 250 μ g de anticuerpo monoclonal anti-PBP2a. Barras 10, 11, 12 y 13 (en triángulos): log de cantidad de bacterias aisladas de los riñones de cada animal tratados con 500 μ g de anticuerpo. Barras de cuadros (barra 5, 9 y 13) indican las medias respectivas obtenidas. Cuantificación bacteriana: controles: C1: 650,000 bacterias; C2: 26,000 bacterias; C3: 17.000 bacterias; C4: 500,000 bacterias (estimación del animal muerto) (media de 231,000 bacterias). Los animales tratados con 250 μ g de anticuerpo: P1: cero; P2: 5,400 bacterias; P3: 830 bacterias; y P4: 10 bacterias (media de 1,560 bacterias). Los animales tratados con 500 μ g de anticuerpo: P1: 80; P2: cero; P3: 210; P4: 80 bacterias (media de 92.5). Reducción de la cantidad de bacterias recuperadas de los animales tratados en relación con los no tratados con 250 μ g de anticuerpo:

149 veces. Con 500 µg: 2,497 veces.

4.2.3. Ensayos de supervivencia

5 En este tipo de ensayo, evaluamos la protección conferida por los anticuerpos en animales después de una infección con una carga bacteriana capaz de matar el 50% de los animales (LD_{50}) o más. Se evaluó la protección contra las tres cepas utilizadas en el ensayo de cuantificación renal. En los tres ensayos independientes se observó una reducción
10 significativa en (i) tiempo de supervivencia y (ii) la supervivencia de animales bajo tratamiento con los anticuerpos monoclonales anti-MRSA.

 En el ensayo con la cepa de CEB MRSA, el 70% de los animales bajo tratamiento sobrevivieron a la infección, contra sólo el 10% del grupo control (no tratado). En el ensayo con la cepa de MRSA ibérica, los resultados
15 obtenidos fueron similares, con 60% de la protección de animales bajo tratamiento y 100% de muerte en el grupo de control. En el ensayo con la cepa CA MRSA, una protección del 100% se observa, frente al 70% en los animales de control. Estos resultados pueden verse en las figuras 7A, 7B y 7C.

20 La figura 7A muestra la curva de supervivencia de animales tratados (protegidos) y no tratados (control) después de la infección por una dosis de 2.3×10^8 bacterias (CEB MRSA) administrada por vía intraperitoneal (LD_{50}).

 La figura 7B muestra la curva de supervivencia de animales
25 tratados (protegidos) y no tratados (control) después de la infección por una dosis de 4.2×10^8 bacterias (MRSA ibérica) administradas por vía intraperitoneal ($\sim LD_{50}$).

 La figura 7C muestra la curva de supervivencia de animales

tratados (protegidos) y no tratados (control) después de la infección por una dosis de 1.1×10^9 bacterias (WB79 CA-MRSA) administradas por vía intraperitoneal ($\sim LD_{50}$).

5 4.2.4. Estudio comparativo sobre la protección conferida por los anticuerpos monoclonales frente a vancomicina

10 Como vancomicina es una primera opción antimicrobiana para el tratamiento de infecciones graves por MRSA, se realizó un estudio comparativo sobre protección en un modelo diferente de las anteriores. En este estudio, los animales fueron infectados y la administración de los antimicrobianos o anticuerpos monoclonales comenzó justo después de cuatro horas de la infección. El estudio se realizó con tres grupos distintos: uno tratado con vancomicina, otro tratado con anticuerpos monoclonales y un
15 tercero con administración simultánea de antimicrobianos + anticuerpos. Dosis de vancomicina fueron ajustadas y administradas de manera similar a los casos de infecciones en humanos (500 mg cada 12 horas).

20 Los resultados obtenidos indican que hay una reducción de alrededor de 15 veces la cantidad de bacterias presentes en los riñones de los animales tratados con antimicrobianos o anticuerpos tres días después de la infección. Sin embargo, una reducción de 4,617 veces fue vista en el grupo que recibió tratamiento con antimicrobianos y anticuerpos.

25 Basándose en estos resultados, podemos concluir que la protección conferida por una dosis de anticuerpos correspondía a cinco dosis de vancomicina y que la administración simultánea de anticuerpos y vancomicina fue muy eficiente en la reducción de la carga bacteriana observada en los riñones de los animales infectados. Este estudio fue repetido con una dosis infectiva baja a fin de que podamos observar mejor la acción

protectora de anticuerpos monoclonales anti-MRSA ambos aislados y en asociación con vancomicina (ver figuras 8A-8B).

Después de la conducción del segundo ensayo con una dosis infectiva baja, los resultados obtenidos confirman los resultados iniciales. La protección conferida por el tratamiento con anticuerpo monoclonal causa una reducción de 89 veces, que era más alta que la protección obtenida con el tratamiento con 5 dosis de vancomicina (reducción de 35 veces). Sin embargo, el resultado de reducción más significativo fue visto en el grupo tratado con anticuerpos + vancomicina, causando una reducción de 450 veces.

La figura 8A muestra la cuantificación bacteriana en los riñones de los animales tratados con el anticuerpo monoclonal anti-PBP2a, vancomicina y asociación de anticuerpos + vancomicina y en animales no tratados después de la infección con 6.0×10^7 bacterias (CEB MRSA). El principio del tratamiento pasa 4 horas después de la infección. Vancomicina fue administrada cada 12 horas (5 dosis). Barras 1, 2, 3, 4 y 5 (trazo): log de concentración de bacterias recuperadas de animales no tratados (controles). C1: 7,000,000; C2: 295,000; C3: 380,000; C4: 3,200,000 (media: 2,718,750 bacterias). Barras 6, 7, 8, 9 y 10 (patrón de cuadros): log de concentración de bacterias recuperadas procedentes de animales tratados con 400 μ g de anticuerpo monoclonal anti-PBP2a. P1: 4,200; P2: 310,000; P3: 330,000; P4: 90,000 (media de 183,550 bacterias). Barras 11, 12, 13, 14 y 15 (esferas): animales tratados con vancomicina. P1: 110,000; P2: 58,000; P3: 500,000; P4: 21,000 (media de 172,250 bacterias). Barras 16, 17, 18, 19 y 20 (triángulos): log de concentración de bacterias recuperadas de animales tratados con anticuerpos (300 μ g) + vancomicina. P1: 1,100; P2: 700; P3: 450; P4: 90 (media de 585 bacterias).

La figura 8B muestra la cuantificación bacteriana en los riñones

de los animales tratados con anticuerpo monoclonal anti-PBP2a (barras 7 a 12), vancomicina (barras 13 a 18), anticuerpo + asociación de vancomicina (19 a 24) y de los animales no tratados (barras 1 a 6) después de la infección con 7.0×10^6 bacterias (CEB MRSA). Inicio de tratamiento en 4 horas después de la infección. Vancomicina administrada cada 12 horas (5 dosis). Barras 1 a 6: log de concentración de bacterias recuperadas de animales no tratados (controles). C1: 6,000; C2: 1,000; C3: 500; C4: 118,000; y C5: 1,000 (media: 25,220 bacterias). Barras 7 a 12: log de concentración de bacterias recuperadas procedentes de animales tratados con 500 μ g de anticuerpo monoclonal anti-PBP2a. MB1: 450; MB2: 200; MB3: 100; MB4: 20; MB5: cero (media de 284 bacterias). Barras 13 a 18: animales tratados con vancomicina. VC1: 100; VC2: 700; VC3: cero; VC4: cero; VC5: 2800 (media de 720 bacterias). Barras 19 a 24: log de concentración de bacterias recuperadas de animales tratados con anticuerpo (500 μ g) + vancomicina. MBV1: 130; MBV2: 20; MBV3: 10; MBV4: 80; MBV5: 20 (media de 56 bacterias).

5. Ensayos de avidez

Resultados de las pruebas de avidez de los clones de anticuerpos monoclonales 10 y 38:

Avidez de protocolo de urea:

Clon 10: $1.03/1.46$ (lectura de DO con/sin tratamiento) = 70.5%

Clon 38: $1.00/1.21$ = 82.6%

Avidez de protocolo de tiocianato de amonio:

Clon 10 (DO):

Control: 1.12

Muestras tratada con tiocianato:

2M = 0.046; 1.5 M = 0.047; 1 M = 0.107; 0.75 M = 0.483; 0.5 M = 0.602; 0.375 M = 0.684

Tasa de avidéz: 2.47

Clon 38 (DO):

Control: 1.22

Muestras tratadas con tiocianato:

5 2M = 0.056; 1.5 M = 0.062; 1 M = 0.129; 0.75 M = 0.648; 0.5 M = 0.758; 0.375 M = 0.793

Tasa de avidéz: 4.40

Se observa que los índices de avidéz del clon 38 eran superiores a los del clon 10 en ambos ensayos. Además, está comprobado que, de acuerdo con ambos protocolos, fue necesario utilizar 50 veces más anticuerpos del clon 10 que del clon 38 a fin de alcanzar un DO cercano a 1.0.

10

6. Determinación de constantes de asociación y disociación de los anticuerpos monoclonales (clones 10 y 38 por el método de resonancia plasmón superficial [SPR] [BIAcore])

15

Los resultados obtenidos por el método SPR confirman los resultados preliminares de la avidéz de anticuerpo, donde el clon 38 mostró resultados superiores a los del clon 10 nuevamente. De acuerdo con los datos en el cuadro II, vemos que clon 38 muestra afinidad 450 veces mayor que el clon 10.

20

Esta afinidad es principalmente debida a su mayor tasa de asociación, que es aproximadamente 100 veces mayor que la de un clon 10. Debido a la gran afinidad del clon 38, sus medidas presentan parámetros cerca del umbral de detección de equipo. Sin embargo, debido a la atención en la planificación y conducción de la prueba, obtuvimos un excelente ajuste para los datos de prueba utilizando el modelo de Langmuir, que indica que los datos obtenidos son confiables.

25

Las figuras 9A-9B muestran la interacción entre PBP2a

recombinante (antígeno) y clon 38 de anticuerpos monoclonales (figura 9A) y clon 10 (figura 9B). Curvas de trazos fumosos representan datos SPR en las concentraciones de acuerdo a la llave derecha. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado, y el modelo teórico de Langmuir 1:1 para cada curva se muestra en negro en cada curva. Unidades de respuesta están representadas en el eje vertical, y el tiempo está representado en la línea horizontal en segundos. Las líneas más cercanas se refieren al eje horizontal que representa la línea de base para cada muestra (control negativo).

10

CUADRO II

Constantes de disociación e interacción entre antígeno (PBP2a) y clones de anticuerpos monoclonales 10 y 38

15

	$k_a \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$	$k_d \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$K_D \text{ (nM)}$
Clon 10	$4.42 \times 10^3 \pm 5.7$	$1.16 \times 10^{-4} \pm 5.63 \times 10^{-7}$	26.2
Clon 38	$5.45 \times 10^5 \pm 384$	$3.13 \times 10^{-5} \pm 2.11 \times 10^{-10}$	5.7×10^{-2}

7. Identificación de regiones de determinación de complementariedad (CDR) de las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo monoclonal anti-PBP2a

Tras el procedimiento de extracción de ARNm en las células de hibridoma del clon que producen los anticuerpos usados (clon 38), se realizó la obtención de ADNc y reacciones de PCR fueron realizadas con este material para alelos diferentes de cadena ligera y pesada. Los materiales obtenidos fueron sometidos a secuenciación utilizando las mismas secuencias de arranque (definidas por SEQ ID NO.: 18 a SEQ ID NO.: 39) utilizadas en reacciones de PCR. Cadena ligera 391 y cadena pesada 310 fueron identificadas en tres diferentes secuenciaciones. Aplicando algoritmos de Chotia y Kabat, obtenemos la identificación de CDR de cadena ligera y pesada, que son el blanco de las reivindicaciones adjuntas.

Presentamos las secuencias de la CDR de cadena ligera y pesada a continuación.

5	SEQ ID NO.: 6 – CDR 1 aminoácidos de cadena ligera. RSSQSIGHSNNGNTYLE
	SEQ ID NO.: 7 - CDR 2 aminoácidos de cadena ligera. KVSNRFS
	SEQ ID NO.: 8 – CDR 3 aminoácidos de cadena ligera. FQGSYVPLT
	SEQ ID NO.: 9 - CDR 1 ADN de cadena ligera. cgcagcagccagagcattggccatagcaacggcaacacctatctggaa
	SEQ ID NO.: 10 - CDR 2 ADN de cadena ligera. aaagtgagcaaccgctttagc
10	SEQ ID NO.: 11 - CDR 3 ADN de cadena ligera. tttcagggcagctatgtgccgctgacc
	SEQ ID NO.: 12 - CDR 1 aminoácidos de cadena pesada. GFSITSSSSCWH
	SEQ ID NO.: 13 – CDR 2 aminoácidos de cadena pesada. RICYEGSISYSPSLKS
	SEQ ID NO.: 14 – CDR 3 aminoácidos de cadena pesada. ENHDWFFDV
	SEQ ID NO.: 15 – CDR 1 ADN de cadena pesada. ggctttagcattaccagcagcagcagctgctggcat
15	SEQ ID NO.: 16 – CDR 2 ADN de cadena pesada. cgcatttgctatgaaggcagcattagctatagcccagcctgaaaagc
	SEQ ID NO.: 17 – CDR 3 ADN de cadena pesada. gaaaaccatgattggtttttgatgtg

Datos de complementariedad

Además se realizaron otros ensayos, procediendo el desarrollo de la invención. Estos figuran a continuación, a través de ejemplos.

20

EJEMPLO 3

Un segundo estudio que usa la cepa CEB MRSA se llevó a cabo, siguiendo el mismo protocolo descrito en el ejemplo 1, punto 7.2, con la adición de dos pulsos de agitación por vórtice, de 15 segundos cada uno, después de cada lavado; con el fin de desagregar aglomerados de *Staphylococcus aureus* y a aumentar la cantidad de PBP2a expuestas a los anticuerpos.

25

Los marcadores FITC (isotiocianato de fluoresceína) y PE (ficoeritrina) fueron probados, con muestras de control (i. bacteria pura, sin contacto con el anticuerpo monoclonal; y ii. bacteria pura más marcador FITC o PE) y la muestra se trata con anticuerpos monoclonales y se somete a marcado con PE o FITC que se analiza. Se realizaron las lecturas en el dispositivo FACsalibur en modo lineal.

La figura 10 es un gráfico de análisis por citometría de flujo de muestras MRSA en presencia del anticuerpo anti-PBP2a marcado con FITC. Curva (x) corresponde a muestra no marcada, y la curva (y) corresponde a una muestra marcada.

Los resultados obtenidos mostraron que aproximadamente el 22% de la población marcada fue detectada por el dispositivo, confirmando el reconocimiento del objetivo (PBP2a) presente en la superficie bacteriana por anticuerpos anti-PBP2a (figura 10).

EJEMPLO 4

Los inventores reconocen aún la protección conferida por el anticuerpo monoclonal anti-PBP2a de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina contra enterococcus. De acuerdo con lo que ya anteriormente fue mencionado aquí, el anticuerpo reconoce proteínas presentes en cepas *Enterococcus sp.*, probablemente PBP5 – una transpeptidasa con baja afinidad para beta-lactamas, presentes en todas las cepas de enterococcus, con peso molecular de aproximadamente 76 kDa (237 aminoácidos). Esta enzima presenta homología refiriéndose a PBP2a de MRSA, según la alineación (ClustalW) relacionada a continuación:

	PBP5Efas	MERSNRNKKSSKNPLILGVLSALVLIAAAVGGYYAYSQWQAKQELAEAKKTATTFLNLVLSK	60
	PBP5efam	-----KHGKNRTGAYIAG--AVILIAAAGGGYFYYQHYQETQAVEAGEKTVEQFVQALNK	53
	PBP2a	-----MKKIKIVPLILIVVVVVGFIYFYASKDKEINNTIDAIEDKNFKQVYKD	48
		* : * : * : *	
	PBP5Efas	QEFDKLPSVVQEASLKKNGYDTKSVVEKYQAIYSGIQAEGVKASDVQVKKAKDNQYTTY	120
	PBP5efam	GDYNKAAEMTSKKAANKSALSEKEILDKYQNIYGAAADVKGQLQISNLKVDKKDDSTYSFSY	113
	PBP2a	SSY-----ISKSDNGEVEMTERPIKIYNSLGVKDINIQDRKIKKVSKNKKRVDA	97
		.. : * . : : : * . : : : : * . : : : *	
5	PBP5Efas	KLSMSTPLGEMKDLSYQSSIAKKGDYQIAWKPSLIFPDMSGNDKISIQVDNAKRGEIVD	180
	PBP5efam	KAKMNTSLGELKDLSYKGTLDNRNDGQTTINWQPNLVFPEMEGNDKVSLLTQEAARNIID	173
	PBP2a	QYKIKTNYGNIDRN-VQFNFKVEDGMWKLWDHHSVIIPGMQKDQSIHIENLKSERGKILD	156
		: : : * * : : : : : * . : : : * * . : : : : : : : : : * : * : *	
	PBP5Efas	RNGSGLAINKVFDEVGVVPGKLGSGAEKTANIKAFSDKFGVSVDEIN---QKLSQGWVQA	237
	PBP5efam	RNGEPLATTGKLKQLGVVPSKLGDEKTANIKAIASSFDLTEDAIN---QAISQSWVQP	230
	PBP2a	RNNVELANTGTHMRLGIVPKNVS-----KKDYKAIAKELSISEDYINNKKWIKIGYKMIPS	211
		** . ** . : : * : : : : : : : : * * * : : : : *	
	PBP5Efas	DSFVPITVASEPVTTELPTG--AATKDTESTRYYPLGEACAINR-VYGTITAEDIEKN--PE	292
	PBP5efam	DYFVPLKIIDGATPELPAG--ATIQEVDGRYYPLGEAAQLIGYVGEDITAEDIDKN--PE	286
	PBP2a	FHFKTVKKMDYLSDFAKKFHLTTNETESRNYPLEKATSHLLGYVGPINSEELKQKEYKG	271
		* : . : . : : : : : : : * * * : * : * : * : * : *	
10	PBP5Efas	LSSTGVIGKTGLERAFDKELRGQDGGSLVILDDK-ENVKKALQTKKKDGQTIKLTIDSG	351
	PBP5efam	LSSNGKIGRSGLEMAFDKDLRGTGGKLSITDAD-GVEKKVLIEHEVQNGKDIKLTIDAK	345
	PBP2a	YKDDAVIGKKGLEKLYDKKLQHEDEGYRVTIVDDNSNTIAHTLIEKKKDGKDIQLTIDAK	331
		.. . * : : * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
	PBP5Efas	VQQQAFAlFdkRPGSAVITDPQKGDLLATVSSPSYDPNKMANGISQKEYDAYNNNKDLPF	411
	PBP5efam	AQKTAfDSLGGKAGSTVATTPKTGDLALASSPSYDPNKMNGISQEDYKSYEENPEQPF	405
	PBP2a	VQKSIYNNMKNDYGSGTAIHPTGELLALVSTPSYDVYPFMYGMSNEEYINKLTEDKKEPL	391
		. * : : : * * . * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
	PBP5Efas	TARFATGYAPGSTFKIITGAIGLDAGTLKPDEELEINGLKWQKDKSWGGYFATRVKEAS-	470
	PBP5efam	ISRFATGYAPGSTFKMITAAIGLDNGTIDPNEVLTINGLKWQKDKSSWSGSYQVTRVSDVS-	464
	PBP2a	<u>LNKfQITTSpgSTQKILTAMIGLNNKTLDDKTSYKIDGKGWQKDKSWGGYNVTRYEVVNG</u>	451
		: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
15	PBP5Efas	PVNLRTALVNSDNIYFAQOTLRMGEDKFRAGLNKFIgEELDLPIAMTPAQISNEDKFNS	530
	PBP5efam	QVDLKTALIYSDNIYTAQETLKMGEKKFRIGLDKFIgEDLDLPISMNPAQISNEDSFNS	524
	PBP2a	NIDLKQAISSDNIFFARVALELGSKKFEKGMKKLGVEDIPSDYPFYNAQISNKN-LDN	510
		: : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
	PBP5Efas	EILLADTGYGQGQLLISPIQQATMYSVFQNNGTLVYPKLVLDKETKK-KDNVISANAANT	589
	PBP5efam	DILLADTGYGQGELLINPIQQAAMYSVFANNGTLVYPKLIADKETD-KKNVIGETALQT	583
	PBP2a	EILLADSGYGQGEILINPVQILSIYSALENNGNINAPHLLKDTKNKVWKKNIISKENINL	570
		: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
	PBP5Efas	IATDLLGSVEDPSGYVYNNYNNPNFSLAAKTGTAEIKDKQDTDGKENSFLLTLDRSNNKFL	649
	PBP5efam	IVPDLREVVQDVNGTAHSLSALGIPLAAKTGTAEIKEKQDVKGKENSFLFAFNPDNQGYM	643
	PBP2a	LNDGMQQVVN--KTHKEDIYRSYANLIGKSGTAELKMKQGESGRQIGWFISYDKDNPNMM	628
		: : : * : . : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
20	PBP5Efas	TMIMVENSGENGSAtdISKPLIDYLEATIK-----	679
	PBP5efam	MVSMLENKEDDDSAtdKRASELLQYLNQNYQ-----	673
	PBP2a	MAINVKDVQDKGMASYNAKISGKVYDELYENGNKKYDIDE	668
		: : : : . . * : : . : : :	

La alineación se realizó con secuencias correspondientes a PBP5 de los enterococos *E. faecalis* (Efas) y *E. faecium* (Efam) con MRSA PBP2a. Secuencias marcadas (negritas - PBP5; subrayado - PBP2a) corresponden a la región de PBP2a utilizada para generar anticuerpos monoclonales. Aminoácidos correspondientes al núcleo activo de enzima están marcados en cursivas.

Así, ensayos de protección *in vitro*, determinación de la dosis letal y LD₅₀, y se realizaron ensayos *in vivo* (dosis subletales con ensayo de cuantificación y supervivencia renal con dosis letal) con una cepa de enterococcus en modelo murino (ratones Balb/C), como se había llevado a
 5 cabo con MRSA. Estos resultados pueden verse en los informes correspondientes.

1.1. Ensayos de protección *in vitro*

El objetivo de este ensayo fue evaluar la protección *in vitro*
 10 conferida por los anticuerpos contra la cepa de enterococcus VRE.

La prueba de protección *in vitro* (MIC), anticuerpo monoclonal purificado clon (90/DA5/CB5/AA3 hib 77) contra cepa clínica *Enterococcus f.* (VRE), laboratorio Richet.

15 Condiciones:

Muestra: purificada de sobrenadante por HPLC, resina de MAB SelecSure, dializada, liofilizada.

Cuantificación de anticuerpo (método de Lowry): 3.5 mg/ml

Inóculo: cepa VRE

20 Pre-inóculo: colonia 1 VRE en 20 ml Lb y vancomicina (10 mg/ml), a 37°C, 160 rpm

Inóculo: 400 ml de pre-inóculo en 20 ml Lb, 200 ml erlenmayer, 37°C, 160 rpm

DO_{600nm} lectura después de 7 horas: 0.7

25 Cuantificación: 5.5×10^8 bacterias/ml

Condiciones de prueba:

Inóculo: 5.5×10^5 bacterias

Concentraciones de anticuerpo: 300, 400, 500, 600 y 700 mg de

anticuerpo

Medio de cultivo: 1 ml de caldo Luria

Placa de cultivo celular, 24 cavidades

Control positivo: caldo Luria + inóculo bacteriano

5 Control negativo: caldo Luria

Incubación: 18 horas, 37°C

La figura 11 muestra el resultado de la evaluación de la protección conferida por los anticuerpos. En la figura 11, tenemos:

- 10 A. 300 mg de anticuerpo
- B. 400 mg de anticuerpo
- C. 500 mg de anticuerpo
- D. 600 mg de anticuerpo
- E. control negativo
- F. control positivo
- 15 G. 700 mg de anticuerpo

1.2. LD₅₀ y determinación de dosis letal por vía intraperitoneal -

Enterococcus faecium resistente a vancomicina

20 Protocolo:

Animales hembra de 7-semanas Balb/C, peso medio de 20 gramos

Día 01 - pre-inóculo: 1 colonia de cepa VRE en 10 ml de caldo Lb y vancomicina (10 mg/ml), tubo de 50 ml Falkow, crecimiento ON 37°C,
25 160 rpm

Día 02 - inóculo: 1 ml de pre-inóculo en 50 ml de Lb caldo/vancomicina (250 ml erlenmayer) - 4 viales, 37°C, 160 rpm, crecimiento hasta OD_{600nm} = 0.80

Centrifugación durante 10 minutos, 4000 rpm, resuspensión en PBS 1x estéril, OD 1.2

Cuantificación: 2.1×10^8 bacterias/ml

- 5 A. 60 microlitros (1.5×10^7)
- B. 300 microlitros (6.5×10^7)
- C. 900 microlitros (reducido a 300 microlitros/dosis) (1.5×10^8)
- D. 4.5 ml (reducido a 300 microlitros/dosis) (6.5×10^8)
- E. 9.0 ml (1.2×10^9 bacterias) (reducido a 300 microlitros/dosis)
- F. 45.0 ml (6.5×10^9 bacterias) (reducido a 300 microlitros/dosis)

10 La observación del animal se realizó desde el día 02 para el décimo día del ensayo.

El resultado se muestra en la figura 12, y se concluye que la dosis letal es de 1.2×10^9 bacterias y LD_{50} es de 6.5×10^8 bacterias.

15 Cuantificación renal de animales supervivientes en el séptimo día:

- A. (1.5×10^7): sin crecimiento bacteriano
- B (6.5×10^7): sin crecimiento bacteriano
- C (1.5×10^8): 3100 bacterias
- 20 D (6.5×10^8): 2.8×10^4 bacterias

1.3. Prueba de protección *in vivo* - prueba de supervivencia - dosis letal, infección sistémica por vía intraperitoneal en modelo murina

25 El objetivo de este ensayo fue evaluar la eficacia de la protección *in vivo* de anticuerpo monoclonal anti-PBP2a contra la infección sistémica con dosis letal, cepa de *Enterococcus faecium* (VRE).

1. Anticuerpo (purificado de sobrenadante de cultivo de células en medio con suero)

- Muestra purificada dializada y liofilizada (HPLC SelecSure MAB), resuspendida y filtrada antes de su uso.

- Cuantificación (método de Lowry): 1.0 mg/ml

2. Modelo murina: animales hembra de 8 semanas Balb/C,
5 pesan de 23 a 25 gramos

3. Protocolo:

Grupo A (6 animales): 650 mg de anticuerpo (350 mg + 300 mg)

Grupo B (6 animales): control (administración salina)

4. Preparación del inóculo bacteriano:

10 Cepa VRE:

pre-inóculo, día 01, 10 ml de caldo BHI y vancomicina en 10 mg/ml ON, 37°C, 160 rpm

inóculo, día 03:300 ml de pre-inóculo en 30 ml de BHI y vancomicina, DO₆₀₀ de 1.31, centrifugado durante 10 minutos, 4,000 rpm, se
15 resuspende en PBS estéril 0.5x, ajuste en OD = 1.10, diluciones y placas para la cuantificación (2.0×10^8 bacterias/ml); inóculo: 12 ml, centrifugado resuspendido en 300 ml, ruta IP ($\sim 2.2 \times 10^9$ bacterias)

Horario:

Día 01: Inoculación de IP del anticuerpo (350 mg)

20 Día 02: Inoculación IP del anticuerpo (300 mg), infección sistémica en la tarde (IP, 250 ml de solución bacteriana – 2.2×10^9 bacterias)

Día 02 al día 13: observación del animal.

Los resultados se muestran en la figura 13. Sólo 2 animales
tratados murieron (66.6% de protección). Todos los animales de control
25 murieron en el segundo día.

1.4. Prueba de protección *in vivo* - infección sistémica por vía intraperitoneal en modelo murina con *Enterococcus faecium* resistentes a la

vancomicina

El objetivo fue evaluar la eficacia de la protección *in vivo* de anticuerpos monoclonales anti-PBP2a y PBP5 de enterococos contra infección sistémica, cepa de *E. faecium* (VRE).

5

Prueba:

1. Anticuerpos (purificados de sobrenadante de cultivo de células en medio con suero)

10 - Muestra purificada dializada, liofilizada y resuspendida (AffiPrep ProteinA Biorad/HPLC SelecSure MAB).

- Cuantificación (método de Lowry): 1.5 mg/ml

2. Modelo murina: animales hembra Balb/C de 8 semanas, peso de 19 a 23 gramos

3. Protocolo:

15 Grupo A (4 animales): 500 microgramos de anticuerpo (en 2 meses, d01, d02)

Grupo B (4 animales): control no protegido

4. Preparación de inóculo bacteriano:

cepa MRSA ibérica:

20 pre-inóculo, 10 ml de caldo Lb ON, 37°C, 120 rpm

inóculo: 200 microlitros de pre-inóculo en 20 ml de Lb, DO₆₀₀ de 0.80, centrifugado durante 10 minutos, 4,000 rpm, resuspendido en PBS estéril 0.5x, ajuste en OD = 0.51, diluciones y placas para cuantificación (2.4×10^8 bacterias/ml); inóculo: 500 microlitros, ruta IP (2.4×10^8 bacterias)

25

Horario:

Día 01: inoculación de 250 microgramos de anticuerpo por vía intraperitoneal

Día 02: inoculación de 250 microgramos de anticuerpo por vía

intraperitoneal e infección sistémica (intraperitoneal, 500 microlitros de solución bacteriana)

Día 06: eutanasia, cuantificación bacteriana en los riñones

Basándose en los resultados anteriores, podemos destacar:

- 5 Ensayos de protección *in vitro* - determinación de concentración inhibidora mínima:

Un total de 700 microgramos de anticuerpo es capaz de bloquear el crecimiento de 550,000 bacterias. Estos valores son más altos que el MIC obtenido de cepas MRSA, que eran aproximadamente 500 microgramos.

- 10 Estudios de protección *in vivo*:

Prueba de protección *in vivo* - infección sistémica por vía intraperitoneal en modelo murina con dosis subletales de *Enterococcus faecium* resistentes a la vancomicina.

- 15 Los animales recibieron 500 microgramos de anticuerpo monoclonal, vía intraperitoneal (IP) y fueron sometidos a infección sistémica, ruta IP, con 2.4×10^8 bacterias. Cuatro días después, son sometidos a la eutanasia y la escisión de los riñones para cuantificación bacteriana. Animales tratados presentan una media de 87.5 bacterias/animal, mientras que los controles (animales sin tratamiento infectados) presentan una media de
- 20 211,000 bacterias/animal.

Prueba de supervivencia después de la administración de la dosis letal

- 25 Los animales recibieron 650 microgramos del anticuerpo monoclonal (vía IP) y fueron sometidos a infección sistémica (vía IP) y se observaron diariamente durante 10 días. Animales de control (no tratados) mueren hasta el segundo día después de la infección; dos de los animales tratados (6) mueren en el segundo día; los demás permanecieron vivos hasta el

final de la prueba. La tasa de supervivencia fue del 66.6%.

Por lo tanto, una vez más hemos confirmado que anticuerpo monoclonal MRSA anti-PBP_a mostraron que otorgan protección cruzada contra enterococos. Sin embargo, las dosis necesarias para conferir
5 protección fueron superiores a las utilizadas contra MRSA en condiciones similares. Esto es probablemente debido a la menor capacidad del anticuerpo para reconocer PBP₅ con la misma eficacia como PBP_{2a}, que fue desarrollado.

Por lo tanto, la presente invención descrita aquí - anticuerpos
10 monoclonales anti-PBP_{2a}, capaces de unirse específicamente a PBP_{2a} y secuencias homólogas - tiene aplicabilidad en infecciones causadas por bacterias que presentan esta proteína o sustancias similares (MRSA, MRSE y *Enterococcus spp.*, y cualquier otro patógeno que tiene una proteína homóloga a PBP_{2a}).

Es importante destacar que una vez que estas infecciones son
15 un problema mundial y los ensayos se llevaron a cabo contra los clones MRSA epidémicos conocidos, el producto de la presente invención tiene aplicación en cualquier lugar donde hay infecciones por este agente patógeno.

Los documentos relativos al estado de la técnica del
20 conocimiento de los inventores, citados en el informe descriptivo actual, se enumeran a continuación.

1. KOPP, BJ. NIX DE, ARMSTRONG EP. Clinical and economic analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. The Annals of Pharmacotherapy; 38:1377-82. 2004.
- 25 2. BOYCE, JM. Are the epidemiology and microbiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* changing? JAMA; 279(8):623-4. 1998.
3. HUNT, C; DIONNE M, et. al. Four pediatric deaths from

community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Minnesota and North Dakota, 1997-1999. Morbidity and Mortality weekly report-CDC USA. 48(32):707-10. 1999.

4. O'BRIEN, FG; PEARMAN, JW; GRACEY, M; RILEY, TV.
5 GRUBB, WB. Community strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* involved in a hospital outbreak. Journal of Clin Microbiol. 37(9):2858-62. 1999.
5. TENOVER, FC; LANCASTER, MV; HILL, BC; STEDWARD, CD; STOCKER, SA; HANCOCK, GA; et. al. Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides. Journal of
10 Clin Microbiol. 36(4):1020-27. 1998.
6. LUTZ, L; MATOS, SB; KUPLICH, N; MACHADO A; BARTH AL. Características laboratoriais de *Staphylococcus aureus* isolado de paciente que não respondeu ao tratamento com vancomicina. Primeiro Encontro de Controle de Infecção Hospitalar do MERCOSUL. 1999.
- 15 7. COSGROVE, SE; CARROLL, KC; PERL, TM. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. Clin Infect Diseases. 39(4):539-45. 2004.
8. JARVIS, WR; SCHLOSSER JMA, CHINN RY, TWETTEN S, JACSON M. National prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in inpatients at US health care facilities, 2006. Am J Infect Control.
20 35(10):631-7. 2007.
9. YAMAUCHI, M. Japan struck by resistant *Staphylococcus aureus*. British Medical Journal. 306:740. 1993.
10. PANLILIO, AL; CULVER, DH; GAYNES, RP. Methicillin-
25 resistant *Staphylococcus aureus* in US hospitals, 1975-1991. Infection Control and Hospital Epid. 13:582-86. 1992.
11. LOWRY, F. *Staphylococcus aureus* infections. New England Journal of Medicine. 339:520-32. 1998.

12. FARR, BM. Prevention and control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Current Opinion Infectious Diseases*. 17:317-22. 2004.
13. TIEMERSMA, EW; BRONZWA, ER; SLAM, et. al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999-2002. *Emerging Infectious Diseases*. 10:1627-34, 2004.
14. BERETTA, ALRZ; TRABASSO, P.; STUCCHI, RB; MORETTI, ML. Use of molecular epidemiology to monitor the nosocomial dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an University hospital from 1991-2001. *Braz. Journal of Medical and Biological Research*. 37:1345-51. 2004.
15. 15. PANNUTI, CS; GRINBAUM, RS. An overview of nosocomial infection control in Brazil. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 16(3):170-74. 1995.
16. RESENDE, EM; COUTO, BRGM; STARLING, CEF; MÓDENA, CM. Prevalence of nosocomial infections in general hospitals in Belo Horizonte. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 19(11):872-76. 1998.
- 16a. Grundmann H., Aires de Souza M., Boyce J. and Tiemersma J. Emergence and resurgence of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public threat health. *Lancet*. 2006. 368:874-85.
17. GUIGNARD, B; ENTENZA, JM; MOREILLON P. Beta-lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Curr. Opin Pharmacol*. 5(5):479-89. 2005.
18. SENNA, JP; ROTH, DM; OLIVEIRA, JS; MACHADO, DC, SANTOS DS. Protective immune response against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a murine model using a DNA vaccine approach. *Vaccine*. 21:2661-66. 2003.

19. OHWADA, A; SEKIYA, M; HANAKI, H; ARAI, KK; HIRAMATSU, K, FUKUCHI, Y. DNA vaccination by *mecA* sequence evokes an antibacterial immune response against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents and Chemother.* 44:767-74. 1999.
- 5 20. DOMBROWSKI, JC; WINSTON, LG. Clinical failures of appropriately-treated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *J. Infect.* 57(2):110-5. 2008.
- 20bis. RYFFEL, C; TESCH, W; BICH-MACHIN, I.; REYNOLDS, PE; BARBERIS-MAINO, L; KAYSER, FH; BERGER-BACHI, B. Sequence
10 comparison of *mecA* genes isolated from methicillin-resistant *S. aureus* and *S. epidermidis*. *Gene.* 94:137-38. 1990.
21. ROTH, DM; SENNA, JP; MACHADO, DC. Evaluation of the humoral immune response in BALB/c mice immunized with a naked DNA vaccine anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Genetics Molecular
15 Research.* 5(3):503-12. 2006.
22. YOKOYAMA, W. Production of monoclonal antibodies: induction of immune responses, p. 2.5.4-2.5.8. In: J.E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach and W. Strober (ed). *Current Protocols in Immunology*, vol. 1. Wiley and Sons, Hoboken, N.J. 1995.
- 20 23. REED, LJ AND MUENCH H. *Am. J. Hyg.* 27:493-97. 1938.
24. KABAT, EA; WU, TT; BILOFSKY, H; M REID-MULLER, PERRY, H. Sequence of proteins of immunological interest. National Institutes of Health, Bethesda. 1993.
25. CHOTIA, C; LESK, AM; TRAMONTANO, A; LEVITT, M; SMITH-GILL, PADLAN, EA; DAVIES, D; TULIP, WR. Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature*, 342:877-883. 1989.
- 25 26. GOULD IM. The clinical significance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Hospital Infections*, 61(4):277-82. 2005.

27. ANDREMONT, A; TIBON-CORNILLOT, M. Le triomphe des bactéries, la fin des antibiotiques? Ed Max Milo, 1 ed, 2007.
28. Silverstein, Arthur M. Paul Ehrlich's receptor immunology. San Diego: Academic Press, 2002.
- 5 29. LIM, D; STRINADKA NC. Structural basis for the beta lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Nat Struct Biol. 9(11): 870-6. 2002.
- 10 30. PAPAKYIRIAKOU, H; VAZ, D; SIMOR, A; LOUIE M; MCGAVIN MJ. Molecular analysis of the accessory gene regulator (agr) locus and balance of virulence factor expression in epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Infect Dis. 181(3):2400-4. 2000.
- 15 31. TEIXEIRA, LA; RESENDE, CA; ORMONDE, LR; ROSENBAUM, R; FIGUEIREDO AM, DE LENCASTRE H, TOMASZ A. Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil. J Clin Microbiol. 33(9):2400-4. 1995.
32. DA SILVA, COIMBRA MV; TEIXEIRA, LA; RAMOS, RL; PREDARI, SC; CASTELLO, L; FAMIGLIETTI A, VA, C; KLAN, L; FIGUEIREDO AM. Spread of the Brazilian epidemic clone of a multiresistant MRSA in two cities in Argentina. J Med Microbiol. 49(2):187-92. 2000.
- 20 33. SENNA, JP; PINTO, CA; MATEOS, S; QUINTANA, A; SANTOS DS. Spread of a dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone between Uruguayan and South Brazil Hospitals. J Hospital Infect. 53(2):15607. 2003.
- 25 34. MELTER, O; SANTOS SANCHES, I; SCHINDLER, J; AIRES DE SOUZA, M; KOVÁROVA, V; ZEMLICKOVÁ, H; DE LENCASTRE H. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal types in the Czech Republic. J Clin Microbiol, 37(9):2798-803. 1999.
35. DA SILVA COIMBRA MV, SILVA-CARVALHO MC;

- WISPLINGHOFF H; HALL GO; TALLENT S; WALLACE, S; EDMOND, MB;
FIGUEIREDO, AM; WEINZEL, RP. Clonal spread of methicillin-resistant
Staphylococcus aureus in a large geographic area of the United States. J Hosp
Infect. 53(2):103-10. 2003.
- 5 36. NYGAARD, TK; DELEO, FR; VOYICH, JM. Community-
associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus skin infections:
advances toward identifying the key virulence factors. Curr Op Infect Dis.
21(2):147-52. 2008.
- 10 37. DIEP, BA; CHAMBERS, HF; GRABER, CJ; SZUMOWSKI,
JD; MILLER, LG; HAN, LL; CHEN, JH; LIN, F; et. al. Emergence of multidrug-
resistant, community-associated, methicillin-resistant Staphylococcus aureus
clone USA300 in men who have sex with men. Ann Intern Med. 148(4):249-57.
2008.
- 15 38. REICHERT, JM; DEWITZ, MC. Anti-infective monoclonal
antibodies: perils and promise of development. Nat Rev Drug Discov. 5(3):191-
5. 2006.
39. GAO, J; STEWART, GC. Regulatory elements of the
Staphylococcus aureus protein A (Spa) promoter. J Bacteriol. 186(12):3738-48.
2004.
- 20 40. GOFFIN, C; GHUYSEN JM. Multimodular penicillin-binding
proteins: an enigmatic family of orthologs and parologs. Microbiol Mol Biol Rev.
62(4):1079-93. 1998.
41. COURVALIN P. Vancomycin resistance in gram-positive
cocci. Clin Infect Dis. 1; 42 Suppl 1:S25-34. 2006.
- 25 42. BAILIE GR, NEAL D. Vancomycin ototoxicity and
nephrotoxicity. Med Toxicol Adverse Drug Exp. 3:376-86. 1988.
43. SALGUERO E; PLAZA D; MARINO A; MORENO C;
DELGADO G. Characterising vancomycin's immunotoxic profile using Swiss

and CFW mice as na experimental model. Biomed Pharmacother. Sept 16.
2008.

REIVINDICACIONES

1.- Un anticuerpo monoclonal aislado que se une a la proteína
5 PBP2a de bacterias resistentes a meticilina (MRSA), caracterizado porque
comprende una región de cadena variable que consta de una secuencia de
aminoácidos, de acuerdo a lo que se selecciona de grupos SEQ ID NO.: 6,
SEQ ID NO.: 7, SEQ ID NO.: 8, SEQ ID NO.: 12, SEQ ID NO.: 13 y SEQ ID
NO.: 14 o secuencias de aminoácidos correspondientes al menos 80%
10 idénticas a ellas.

2.- Un anticuerpo monoclonal aislado que se une a la proteína
PBP2a de bacterias resistentes a meticilina (MRSA), caracterizado porque
comprende una región de cadena variable que consta de una secuencia de
ADN, de acuerdo a lo que se selecciona de grupos SEQ ID NO.: 9, SEQ ID
15 NO.: 10, SEQ ID NO.: 11, SEQ ID NO.: 15, SEQ ID NO.: 16 y SEQ ID NO.: 17
o secuencias de ADN correspondientes al menos 80% idénticas a ellas.

3.- Un anticuerpo monoclonal aislado que se une a la proteína
PBP5 de *Enterococcus spp.*, caracterizado porque comprende una región de
cadena variable que consta de una secuencia de aminoácidos, de acuerdo a
20 lo que se selecciona de grupos SEQ ID NO.: 6, SEQ ID NO.: 7, SEQ ID NO.:
8, SEQ ID NO.: 12, SEQ ID NO.: 13 y SEQ ID NO.: 14 o secuencias de
aminoácidos correspondientes al menos 80% idénticas a ellas.

4.- Un anticuerpo monoclonal aislado que se une por sí mismo a
la proteína PBP5 de *Enterococcus spp.*, caracterizado porque comprende una
25 región de cadena variable que consta de una secuencia de ADN, de acuerdo a
lo que se selecciona de grupos SEQ ID NO.: 9, SEQ ID NO.: 10, SEQ ID NO.:
11, SEQ ID NO.: 15, SEQ ID NO.: 16 y SEQ ID NO.: 17 o secuencias de ADN
correspondientes al menos 80% idénticas a ellas.

5.- Un método de diagnóstico de resistencia a antimicrobianos beta-lactama, caracterizado porque comprende la adición de un anticuerpo monoclonal aislado, de acuerdo con lo que se define en una de las reivindicaciones 1 o 2, puro o en asociación con otras sustancias, para
5 muestras bacterianas sospechosas de contener PBP2a o proteínas homólogas a éstas.

6.- Una composición farmacéutica útil para el tratamiento o prevención de la infección por bacterias que poseen PBP2a o proteínas homólogas a éstas, caracterizada porque comprende una cantidad de
10 anticuerpo monoclonal aislado de acuerdo con lo que se define en las reivindicaciones 1 o 2 y un vehículo farmacéutico, portador o excipiente.

7.- El uso del anticuerpo monoclonal aislado de acuerdo con lo que se define en las reivindicaciones 1 o 2, para preparar un medicamento para tratar o prevenir una infección por una bacteria que posee PBP2a o
15 proteínas homólogas a ésta en un paciente.

8.- El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado por una cadena pesada variable que posee una región CDR1 que incluye la secuencia GFSITSSSSCWH (SEQ ID NO.: 12) (CDR1 VH) y la secuencia de ácido nucleico correspondiente, con las posibles
20 degeneraciones.

9.- El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado por una cadena pesada variable que posee una región CDR2 que incluye la secuencia RICYEGSISYSPSLKS (SEQ ID NO.: 13) (CDR2 VH) y la secuencia de ácido nucleico correspondiente, con las posibles
25 degeneraciones.

10.- El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado por una cadena pesada variable que posee una región CDR3 que incluye la secuencia ENHDWFFDV (SEQ ID NO.: 14) (CDR3 VH) y la

secuencia de ácido nucleico correspondiente, con las posibles degeneraciones.

11.- El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado por una cadena ligera variable que posee una región CDR1 que
5 incluye la secuencia RSSQSIGHSTNGNTYLE (SEQ ID NO.: 6) (CDR1 VL) y la secuencia de ácido nucleico correspondiente, con las posibles degeneraciones.

12.- El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado por una cadena ligera variable que posee una región CDR2 que
10 incluye la secuencia KVSNRFS (SEQ ID NO.: 7) (CDR2 VL) y la secuencia de ácido nucleico correspondiente, con las posibles degeneraciones.

13.- El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado por una cadena ligera variable que posee una región CDR3 que
15 incluye la secuencia FQGSYVPLT (SEQ ID NO.: 8) (CDR3 VL) y la secuencia de ácido nucleico correspondiente, con las posibles degeneraciones.

14.- El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado por una cadena ligera variable que posee una región CDR1 que
incluye la secuencia SEQ ID NO.: 9 y la secuencia de nucleótido correspondiente, con las posibles degeneraciones.

20 15.- El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado por una cadena ligera variable que posee una región CDR2 que incluye la secuencia SEQ ID NO.: 10 y la secuencia de nucleótido correspondiente, con las posibles degeneraciones.

25 16.- El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado por una cadena ligera variable que posee una región CDR3 que incluye la secuencia SEQ ID NO.: 11 y la secuencia de nucleótido correspondiente, con las posibles degeneraciones.

17.- El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 2,

caracterizado por una cadena pesada variable que posee una región CDR1 que incluya la secuencia SEQ ID NO.: 15 y la secuencia de nucleótido correspondiente, con las posibles degeneraciones.

18.- El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 2,
5 caracterizado por una cadena pesada variable que posee una región CDR2 que incluye la secuencia SEQ ID NO.: 16 y la secuencia de nucleótido correspondiente, con las posibles degeneraciones.

19.- El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 3,
caracterizado por una cadena pesada variable que posee una región CDR3
10 que incluye la secuencia SEQ ID NO.: 16 y la secuencia de nucleótido correspondiente, con las posibles degeneraciones.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales capaces de reconocer y unirse a la proteína PBP2a y otras proteínas

5 presentando secuencias homólogas a PBP2a, incluyendo los patógenos *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina - MRSA, *Staphylococcus* coagulasa-negativa, *Staphylococcus sciuri*, *Enterococcus spp.*, y cualquier otra bacteria que posea PBP2a o secuencias homólogas a esta proteína; la invención todavía se refiere a la utilización de anticuerpos monoclonales

10 capaces de reconocer y unirse a la proteína PBP2a y otras proteínas presentando secuencias homólogas a PBP2a en un inmunodiagnos complementario para la detección de resistencia a beta-lactamas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Solicitante: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

<120> Título de la invención: ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA PROTEÍNA PBP2-a Y SECUENCIAS HOMÓLOGAS PARA EL TRATAMIENTO DE INFECCIONES E INMUNODIAGNOSIS EN BACTERIAS DEL FÍLUM *FIRMICUTES*

<130> Número de referencia: P1704

<160> Números de secuencias: 39

<170> Software: PatentIn versión 3.3

<210> SEQ ID NO: 1

<211> Longitud: 668

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Staphylococcus aureus

<220> Característica:

<221> Nombre/Clave: MISC_CARACTERÍSTICA

<223> Otra Información: secuencia de aminoácido de PBP2a

<400> Secuencia: 1

Met	Lys	Lys	Ile	Lys	Ile	Val	Pro	Leu	Ile	Leu	Ile	Val	Val	Val	Val	
1				5					10					15		
Gly	Phe	Gly	Ile	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Ser	Lys	Asp	Lys	Glu	Ile	Asn	Asn	
			20					25					30			
Thr	Ile	Asp	Ala	Ile	Glu	Asp	Lys	Asn	Phe	Lys	Gln	Val	Tyr	Lys	Asp	
		35					40					45				
Ser	Ser	Tyr	Ile	Ser	Lys	Ser	Asp	Asn	Gly	Glu	Val	Glu	Met	Thr	Glu	
	50					55					60					
Arg	Pro	Ile	Lys	Ile	Tyr	Asn	Ser	Leu	Gly	Val	Lys	Asp	Ile	Asn	Ile	
65					70					75				80		
Gln	Asp	Arg	Lys	Ile	Lys	Lys	Val	Ser	Lys	Asn	Lys	Lys	Arg	Val	Asp	
			85						90					95		
Ala	Gln	Tyr	Lys	Ile	Lys	Thr	Asn	Tyr	Gly	Asn	Ile	Asp	Arg	Asn	Val	
			100					105					110			
Gln	Phe	Asn	Phe	Val	Lys	Glu	Asp	Gly	Met	Trp	Lys	Leu	Asp	Trp	Asp	
		115					120					125				
His	Ser	Val	Ile	Ile	Pro	Gly	Met	Gln	Lys	Asp	Gln	Ser	Ile	His	Ile	
	130					135					140					
Glu	Asn	Leu	Lys	Ser	Glu	Arg	Gly	Lys	Ile	Leu	Asp	Arg	Asn	Asn	Val	
145					150					155				160		
Glu	Leu	Ala	Asn	Thr	Gly	Thr	Ala	Tyr	Glu	Ile	Gly	Ile	Val	Pro	Lys	
				165					170					175		

Asn Val Ser Lys Lys Asp Tyr Lys Ala Ile Ala Lys Glu Leu Ser Ile
 180 185 190

Ser Glu Asp Tyr Ile Lys Gln Gln Met Asp Gln Asn Trp Val Gln Asp
 195 200 205

Asp Thr Phe Val Pro Leu Lys Thr Val Lys Lys Met Asp Glu Tyr Leu
 210 215 220

Arg Asp Phe Ala Lys Lys Phe His Leu Thr Thr Asn Glu Thr Glu Ser
 225 230 235 240

Arg Asn Tyr Pro Leu Gly Lys Ala Thr Ser His Leu Leu Gly Tyr Val
 245 250 255

Gly Pro Ile Asn Ser Glu Glu Leu Lys Gln Lys Glu Tyr Lys Gly Tyr
 260 265 270

Lys Asp Asp Ala Val Ile Gly Lys Lys Gly Leu Glu Lys Leu Tyr Asp
 275 280 285

Lys Lys Leu Gln His Glu Asp Gly Tyr Arg Val Thr Ile Val Asp Asp
 290 295 300

Asn Ser Asn Thr Ile Ala His Thr Leu Ile Glu Lys Lys Lys Lys Asp
 305 310 315 320

Gly Lys Asp Ile Gln Leu Thr Ile Asp Ala Lys Val Gln Lys Ser Ile
 325 330 335

Tyr Asn Asn Met Lys Asn Asp Tyr Gly Ser Gly Thr Ala Ile His Pro
 340 345 350

Gln Thr Gly Glu Leu Leu Ala Leu Val Ser Thr Pro Ser Tyr Asp Val
 355 360 365

Tyr Pro Phe Met Tyr Gly Met Ser Asn Glu Glu Tyr Asn Lys Leu Thr
 370 375 380

Glu Asp Lys Lys Glu Pro Leu Leu Asn Lys Phe Gln Ile Thr Thr Ser
 385 390 395 400

Pro Gly Ser Thr Gln Lys Ile Leu Thr Ala Met Ile Gly Leu Asn Asn
 405 410 415

Lys Thr Leu Asp Asp Lys Thr Ser Tyr Lys Ile Asp Gly Lys Gly Trp
 420 425 430

Gln Lys Asp Lys Ser Trp Gly Gly Tyr Asn Val Thr Arg Tyr Glu Val
 435 440 445

Val Asn Gly Asn Ile Asp Leu Lys Gln Ala Ile Glu Ser Ser Asp Asn
450 455 460

Ile Phe Phe Ala Arg Val Ala Leu Glu Leu Gly Ser Lys Lys Phe Glu
465 470 475 480

Lys Gly Met Lys Lys Leu Gly Val Gly Glu Asp Ile Pro Ser Asp Tyr
485 490 495

Pro Phe Tyr Asn Ala Gln Ile Ser Asn Lys Asn Leu Asp Asn Glu Ile
500 505 510

Leu Leu Ala Asp Ser Gly Tyr Gly Gln Gly Glu Ile Leu Ile Asn Pro
515 520 525

Val Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Ala Leu Glu Asn Asn Gly Asn Ile
530 535 540

Asn Ala Pro His Leu Leu Lys Asp Thr Lys Asn Lys Val Trp Lys Lys
545 550 555 560

Asn Ile Ile Ser Lys Glu Asn Ile Asn Leu Leu Thr Asp Gly Met Gln
565 570 575

Gln Val Val Asn Lys Thr His Lys Glu Asp Ile Tyr Arg Ser Tyr Ala
580 585 590

Asn Leu Ile Gly Lys Ser Gly Thr Ala Glu Leu Lys Met Lys Gln Gly
595 600 605

Glu Thr Gly Arg Gln Ile Gly Trp Phe Ile Ser Tyr Asp Lys Asp Asn
610 615 620

Pro Asn Met Met Met Ala Ile Asn Val Lys Asp Val Gln Asp Lys Gly
625 630 635 640

Met Ala Ser Tyr Asn Ala Lys Ile Ser Gly Lys Val Tyr Asp Glu Leu
645 650 655

Tyr Glu Asn Gly Asn Lys Lys Tyr Asp Ile Asp Glu
660 665

<210> SEQ ID NO: 2

<211> Longitud: 2007

<212> Tipo: ADN

<213> Organismo: Staphylococcus aureus

<220> Característica:

<221> Nombre/Clave: MISC_CARACTERÍSTICA

<223> Otra Información: ácido nucleico del gen mecA que codifica para la PBP2a

<400> Secuencia: 2

ttattcatct atacgtatt ttttattacc gttctcatat agctcatcat acactttacc	60
tgagattttg gcattgtagc tagccattcc tttatcttgt acatctttaa cattaatagc	120
catcatcatg tttggattat ctttatcata tgatataaac cacccaattt gtctgccagt	180
ttctccttgt ttcattttga gttctgcagt accggatttg ccaattaagt ttgcataaga	240
tctataaata tcttctttat gtgttttatt tacgacttgt tgcataccat cagttaatag	300
attgatattt tctttggaaa taatattttt cttocaaact ttgtttttcg tgtcttttaa	360
taagtgaggt gcgttaatat tgccattatt ttctaagcgc ctatagattg aaaggatctg	420
tactgggtta atcagtattt caccttgtcc gtaacctgaa tcagctaata atatttcatt	480
atctaaattt ttgtttgaaa tttgagcatt ataaaatgga taatcacttg gtatatcttc	540
accaacacct agttttttca tgcctttttc aaatttctta ctgcctaatt cgagtgtac	600
tctagcaaag aaaatgttat ctgatgattc tattgcttgt ttttaagtcga tattaccatt	660
taccacttca tatcttgtaa cgttgtaacc accccaagat ttatcttttt gccaaccttt	720
accatcgatt ttataacttg ttttatcgtc taatgttttg ttatttaacc caatcattgc	780
tgtaaatatt ttttgagttg aacctgggtga agttgtaatc tggaaacttg tgagcagagg	840
ttctttttta tcttcgggta atttattata ttcttcgtta ctcatgccat acataaatgg	900
atagacgtca tatgaagggtg tgcttacaag tgctaataat tcacctgttt gaggggtggat	960
agcagtacct gagccataat catttttcat gttgttataa atactctttt gaacttttagc	1020
atcaatagtt agttgaatat ctttgccatc tttttctttt ttctctatta atgtatgtgc	1080
gattgtattg ctattatcgt caacgattgt gacacgatag ccatcttcat gttggagott	1140
tttatcgtaa agtttttcga gtcccttttt accaataact gcatcatctt tatagccttt	1200
atattctttt tgttttaatt cttcagagtt aatgggacca acataaccta atagatgtga	1260
agtcgctttt tctagaggat agttacgact ttctgtttca ttagttgtaa gatgaaattt	1320
ttttgcgaaa tcacttaaat attcatccat ttttttaacg gttttaagtg gaacgaaggt	1380
atcatcttgt acccaatttt gatccatttg ttgtttgata tagtcttcag aaatacttag	1440
ttcttttagcg attgctttat aatctttttt agatacatc tttggaacga tgccatatctc	1500
atatgctggt cctgtattgg ccaattccac attgtttcgg tctaaaattt taccacgttc	1560
tgattttaaa ttttcaatat gtatgctttg gtctttctgc attcctggaa taatgacgct	1620
atgatcccaa tctaacttcc acataccatc ttctttaaca aaattaaatt gaacgttgcg	1680
atcaatgtta ccgtagtttg ttttaatttt atattgagca tctactcggt ttttattttt	1740
agatactttt tttattttac gatcctgaat gtttatatct ttaacgccta aactattata	1800
tattttttatc ggacgttcag tcatttctac ttcaccatta tcgcttttag aaatataact	1860
gctatcttta taaacttggt tgaaattttt atcttcaatt gcatcaatag tattattaat	1920
ttcttttatct tttgaagcat aaaaatatat accaaaccog acaactacaa ctattaaaat	1980

aagtggaaca atttttatct ttttcat 2007

<210> SEQ ID NO: 3
<211> Longitud: 76
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Staphylococcus aureus

<220> Característica:
<221> Nombre/Clave: MISC_CARACTERÍSTICA
<223> Otra Información: secuencia de aminoácido de fragmento de PBP2a

<400> Secuencia: 3

Met Tyr Gly Met Ser Asn Glu Glu Tyr Asn Lys Leu Thr Glu Asp Lys
1 5 10 15

Lys Glu Pro Leu Leu Asn Lys Phe Gln Ile Thr Thr Ser Pro Gly Ser
20 25 30

Thr Gln Lys Ile Leu Thr Ala Met Ile Gly Leu Asn Asn Lys Thr Leu
35 40 45

Asp Asp Lys Thr Ser Tyr Lys Ile Asp Gly Lys Gly Trp Gln Lys Asp
50 55 60

Lys Ser Trp Gly Gly Tyr Asn Val Thr Arg Tyr Glu
65 70 75

<210> SEQ ID NO: 4
<211> Longitud: 4
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Staphylococcus aureus

<220> Característica:
<221> Nombre/Clave: MISC_CARACTERÍSTICA
<223> Otra Información: secuencia de aminoácido de centro activo de PBP2a

<400> Secuencia: 4

Ser Thr Gln Lys
1

<210> SEQ ID NO: 5
<211> Longitud: 228
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Staphylococcus aureus

<400> Secuencia: 5
atgtatggca tgagcaacga agaataaac aaactgaccg aagataaaaa agaaccgctg 60
ctgaacaaat ttcagattac caccagcccg ggcagcacc agaaaattct gaccgcgatg 120
attggcctga acaacaaaac cctggatgat aaaaccagct ataaaattga tggcaaaggc 180
tggcagaaag ataaaagctg gggcggctat aacgtgaccc gctatgaa 228

<210> SEQ ID NO: 6
<211> Longitud: 16

<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Staphylococcus aureus

<220> Característica:
<221> Nombre/Clave: MISC_CHARACTERÍSTICA
<223> Otra Información: secuencia de aminoácido de cadena ligera para CDR1

<400> Secuencia: 6

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Gly His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

<210> SEQ ID NO: 7
<211> Longitud: 7
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Staphylococcus aureus

<220> Característica:
<221> Nombre/Clave: MISC_CHARACTERÍSTICA
<223> Otra Información: secuencia de aminoácido de cadena ligera para CDR2

<400> Secuencia: 7

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> SEQ ID NO: 8
<211> Longitud: 9
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Staphylococcus aureus

<220> Característica:
<221> Nombre/Clave: MISC_CHARACTERÍSTICA
<223> Otra Información: secuencia de aminoácido de cadena ligera para CDR3

<400> Secuencia: 8

Phe Gln Gly Ser Tyr Val Pro Leu Thr
1 5

<210> SEQ ID NO: 9
<211> Longitud: 48
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Staphylococcus aureus

<220> Característica:
<221> Nombre/Clave: MISC_CHARACTERÍSTICA
<223> Otra Información: secuencia de ADN de cadena ligera para CDR1

<400> Secuencia: 9
cgcagcagcc agagcattgg ccatagcaac ggcaacacct atctggaa

<210> SEQ ID NO: 10
<211> Longitud: 21
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Staphylococcus aureus

<220> Característica:
<221> Nombre/Clave: MISC_CHARACTERÍSTICA
<223> Otra Información: secuencia de ADN de cadena ligera para CDR2

<400> Secuencia: 10
aaagtgagca accgcttttag c 21

<210> SEQ ID NO: 11
<211> Longitud: 27
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Staphylococcus aureus

<220> Característica:
<221> Nombre/Clave: MISC_CHARACTERÍSTICA
<223> Otra Información: secuencia de ADN de cadena ligera para CDR3

<400> Secuencia: 11
tttcagggca gctatgtgcc gctgacc 27

<210> SEQ ID NO: 12
<211> Longitud: 12
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Staphylococcus aureus

<220> Característica:
<221> Nombre/Clave: MISC_CHARACTERÍSTICA
<223> Otra Información: secuencia de aminoácido de cadena pesada para CDR1

<400> Secuencia: 12

Gly Phe Ser Ile Thr Ser Ser Ser Ser Cys Trp His
1 5 10

<210> SEQ ID NO: 13
<211> Longitud: 16
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Staphylococcus aureus

<220> Característica:
<221> Nombre/Clave: MISC_CHARACTERÍSTICA
<223> Otra Información: secuencia de aminoácido de cadena pesada para CDR2

<400> Secuencia: 13

Arg Ile Cys Tyr Glu Gly Ser Ile Ser Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> SEQ ID NO: 14
<211> Longitud: 9
<212> Tipo: PRT
<213> Organismo: Staphylococcus aureus

<220> Característica:
<221> Nombre/Clave: MISC_CHARACTERÍSTICA
<223> Otra Información: secuencia de aminoácido de cadena pesada para CDR3

<400> Secuencia: 14

Glu Asn His Asp Trp Phe Phe Asp Val
1 5

<210> SEQ ID NO: 15

<211> Longitud: 36

<212> Tipo: ADN

<213> Organismo: Staphylococcus aureus

<220> Característica:

<221> Nombre/Clave: MISC_CARACTERÍSTICA

<223> Otra Información: secuencia de ADN de cadena pesada para CDR1

<400> Secuencia: 15

ggcttttagca ttaccagcag cagcagctgc tggcat 36

<210> SEQ ID NO: 16

<211> Longitud: 48

<212> Tipo: ADN

<213> Organismo: Staphylococcus aureus

<220> Característica:

<221> Nombre/Clave: MISC_CARACTERÍSTICA

<223> Otra Información: secuencia de ADN de cadena pesada para CDR2

<400> Secuencia: 16

cgcatttgct atgaaggcag cattagctat agcccgagcc tgaaaagc 48

<210> SEQ ID NO: 17

<211> Longitud: 27

<212> Tipo: ADN

<213> Organismo: Staphylococcus aureus

<220> Característica:

<221> Nombre/Clave: MISC_CARACTERÍSTICA

<223> Otra Información: secuencia de ADN de cadena pesada para CDR3

<400> Secuencia: 17

gaaaaccatg attgggtttt tgatgtg 27

<210> SEQ ID NO: 18

<211> Longitud: 33

<212> Tipo: ADN

<213> Organismo: Staphylococcus aureus

<400> Secuencia: 18

atggaagctt gctgggtcta caagctgtgg att 33

<210> SEQ ID NO: 19

<211> Longitud: 30

<212> Tipo: ADN

<213> Organismo: Staphylococcus aureus

<400> Secuencia: 19

atggaaatgg cagcctgggc ttattcctct 30

<210> SEQ ID NO: 20

<211> Longitud: 20

<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Staphylococcus aureus

<400> Secuencia: 20
gatgtgaagc ttcaggagtc 20

<210> SEQ ID NO: 21
<211> Longitud: 20
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Staphylococcus aureus

<400> Secuencia: 21
caggtgcagc tgaaggagtc 20

<210> SEQ ID NO: 22
<211> Longitud: 20
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Staphylococcus aureus

<400> Secuencia: 22
caggtgcagc tgaagcagtc 20

<210> SEQ ID NO: 23
<211> Longitud: 20
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Staphylococcus aureus

<400> Secuencia: 23
caggttactc tgaagagtc 20

<210> SEQ ID NO: 24
<211> Longitud: 21
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Staphylococcus aureus

<400> Secuencia: 24
gaggtccagc tgcaacaatc t 21

<210> SEQ ID NO: 25
<211> Longitud: 20
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Staphylococcus aureus

<400> Secuencia: 25
gaggtccagc tgcagcagtc 20

<210> SEQ ID NO: 26
<211> Longitud: 21
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Staphylococcus aureus

<400> Secuencia: 26
caggtccaac tgcagcagcc t 21

<210> SEQ ID NO: 27
<211> Longitud: 20
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Staphylococcus aureus

<400> Secuencia: 27
gaggtgaagc tgggtggagtc 20

<210> SEQ ID NO: 28	
<211> Longitud: 20	
<212> Tipo: ADN	
<213> Organismo: Staphylococcus aureus	
<400> Secuencia: 28	
gatgtgaact tggaagtgtc	20
<210> SEQ ID NO: 29	
<211> Longitud: 29	
<212> Tipo: ADN	
<213> Organismo: Staphylococcus aureus	
<400> Secuencia: 29	
tggaacaggga tccagagttc caggtcact	29
<210> SEQ ID NO: 30	
<211> Longitud: 21	
<212> Tipo: ADN	
<213> Organismo: Staphylococcus aureus	
<400> Secuencia: 30	
gacatttgtga tgacccagtc t	21
<210> SEQ ID NO: 31	
<211> Longitud: 21	
<212> Tipo: ADN	
<213> Organismo: Staphylococcus aureus	
<400> Secuencia: 31	
gatgttttga tgacccaaac t	21
<210> SEQ ID NO: 32	
<211> Longitud: 18	
<212> Tipo: ADN	
<213> Organismo: Staphylococcus aureus	
<400> Secuencia: 32	
gatatttgtga taaccag	18
<210> SEQ ID NO: 33	
<211> Longitud: 21	
<212> Tipo: ADN	
<213> Organismo: Staphylococcus aureus	
<400> Secuencia: 33	
gacatttgtgc tgacccaatc t	21
<210> SEQ ID NO: 34	
<211> Longitud: 21	
<212> Tipo: ADN	
<213> Organismo: Staphylococcus aureus	
<400> Secuencia: 34	
gatatttgtgc taactcagtc t	21
<210> SEQ ID NO: 35	
<211> Longitud: 21	
<212> Tipo: ADN	

<213> Organismo: Staphylococcus aureus

<400> Secuencia: 35
gatatccaga tgacacagac t 21

<210> SEQ ID NO: 36
<211> Longitud: 21
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Staphylococcus aureus

<400> Secuencia: 36
gacatccagc tgactcagtc t 21

<210> SEQ ID NO: 37
<211> Longitud: 21
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Staphylococcus aureus

<400> Secuencia: 37
caaattgttc tcacccagtc t 21

<210> SEQ ID NO: 38
<211> Longitud: 21
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Staphylococcus aureus

<400> Secuencia: 38
caggctgttg tgactcagga a 21

<210> SEQ ID NO: 39
<211> Longitud: 18
<212> Tipo: ADN
<213> Organismo: Staphylococcus aureus

<400> Secuencia: 39
tacagttggt gcagcatc 18

FIG. 1

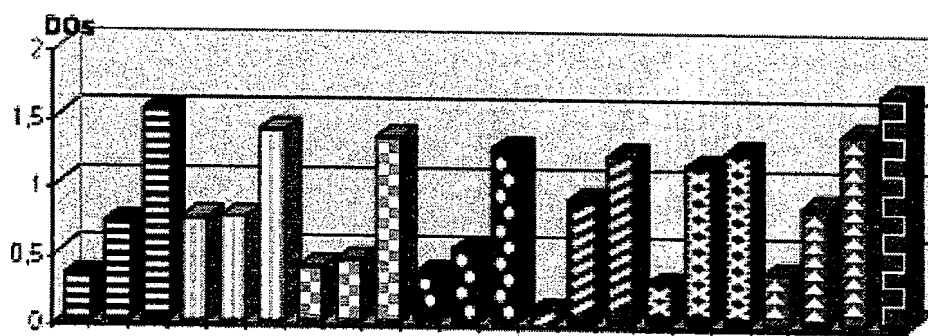


FIG. 1

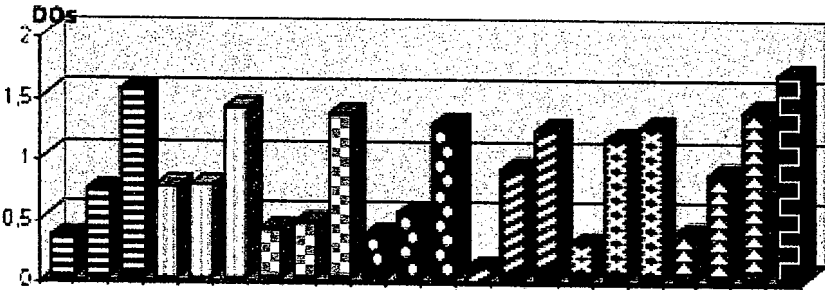


FIG. 2

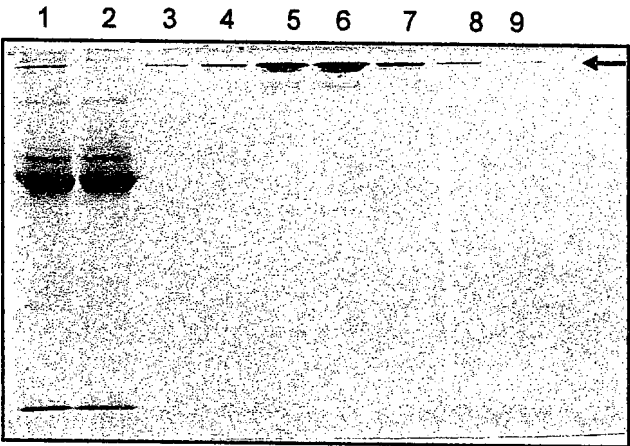


FIG. 3

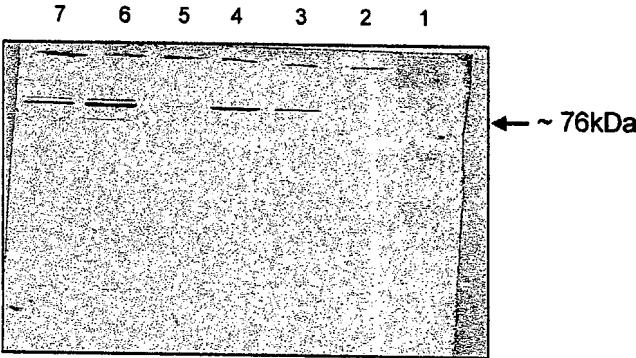


FIG. 4

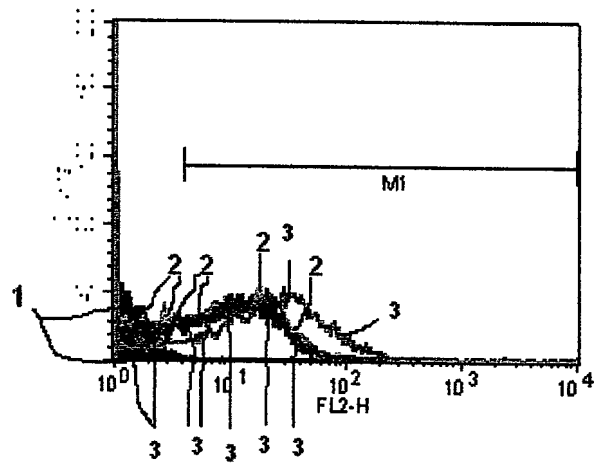


FIG. 5

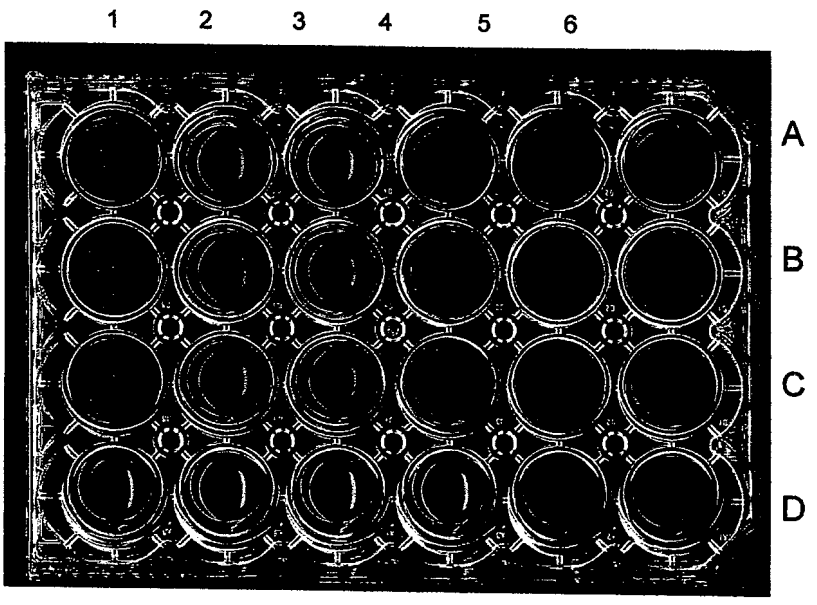


FIG. 6A



FIG. 6B

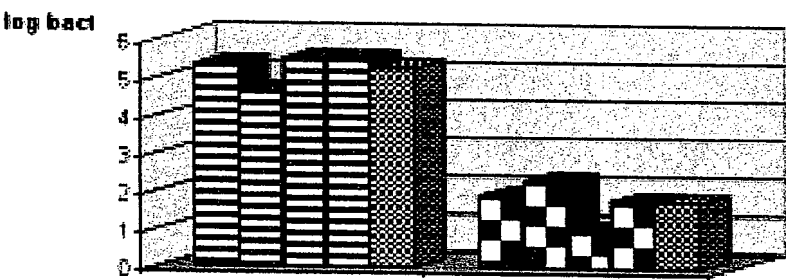


FIG. 6C

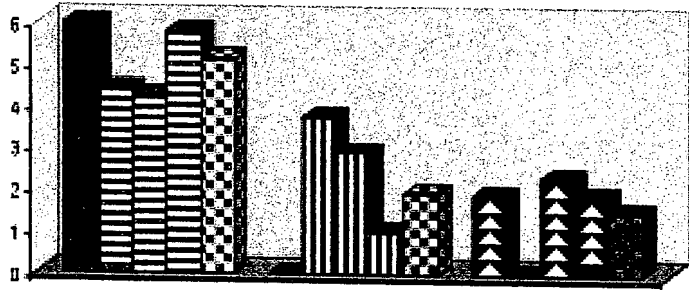


FIG. 7A

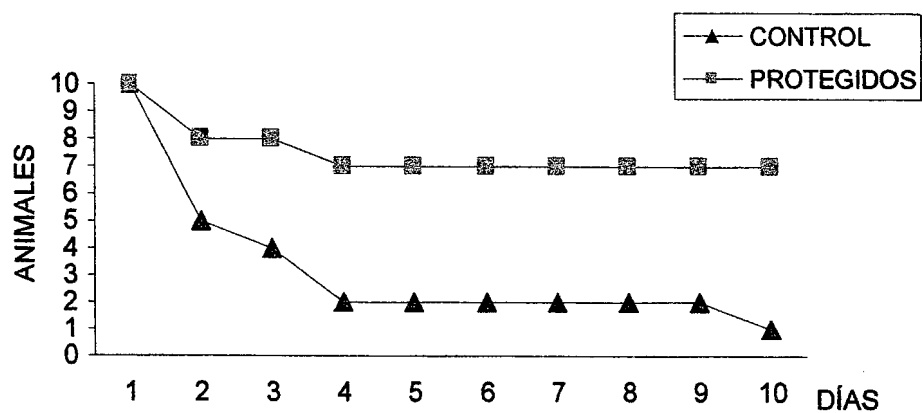


FIG. 7B

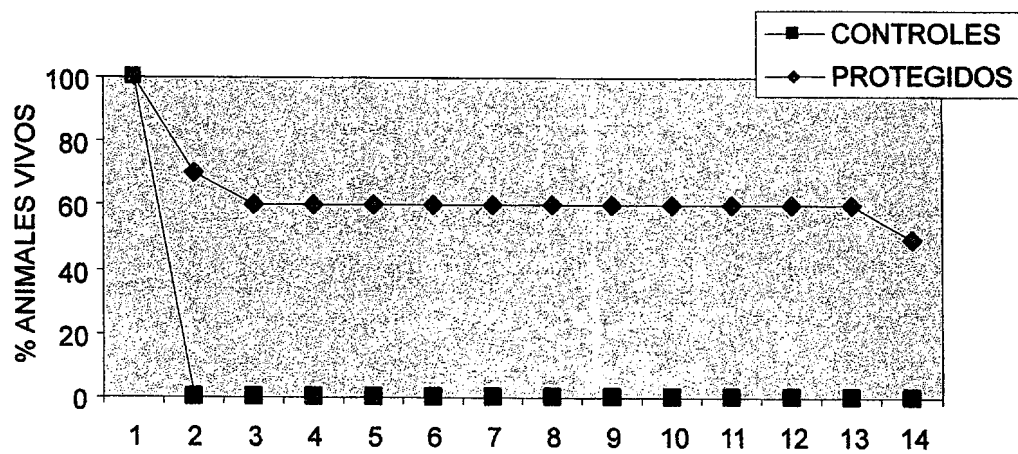


FIG. 7C

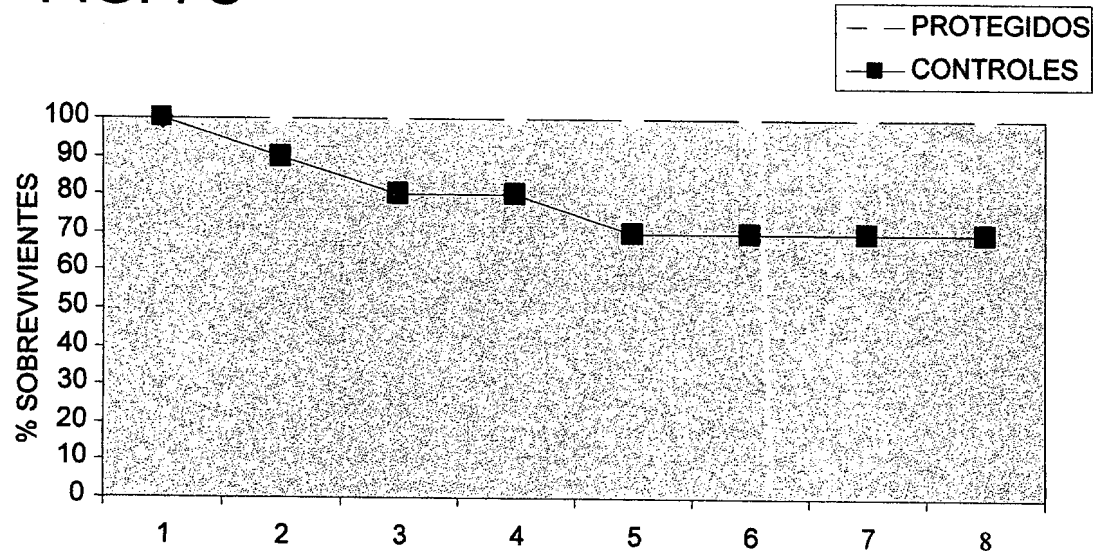


FIG. 8A

Log bact

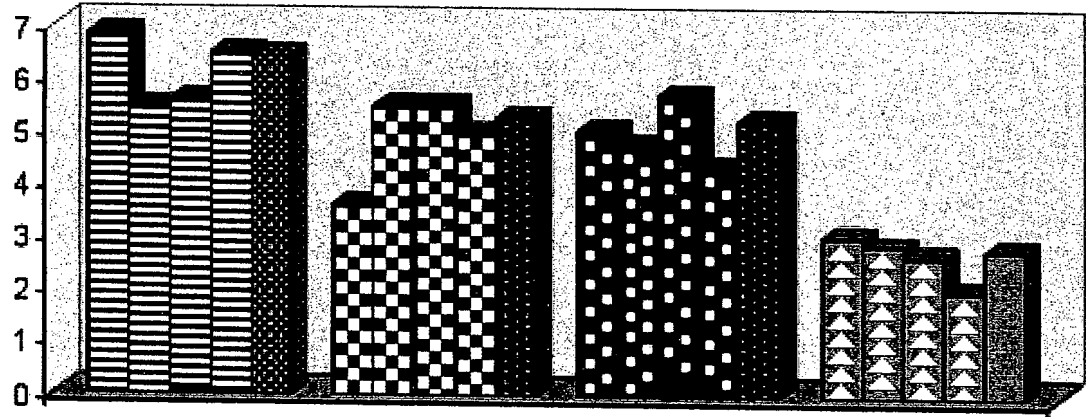


FIG. 8B

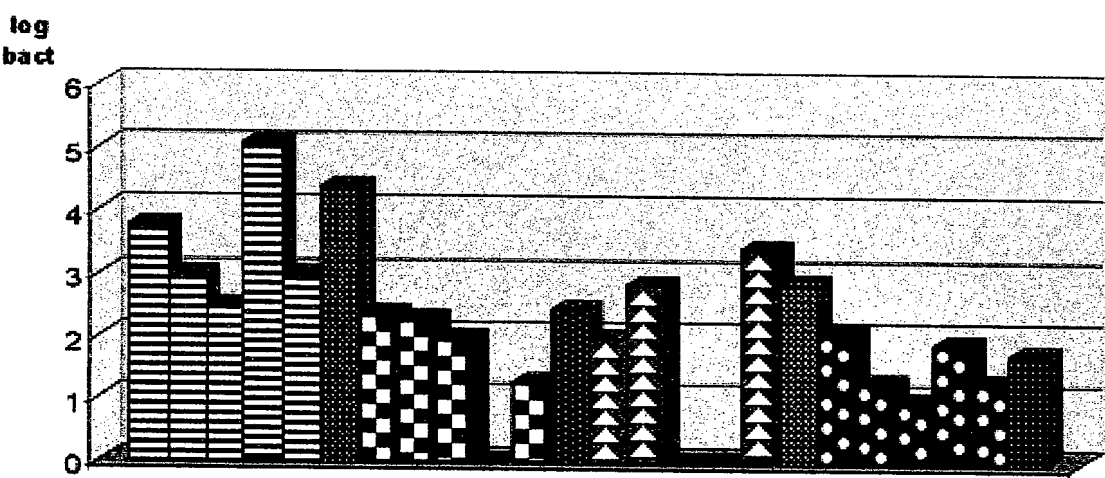


FIG. 9A

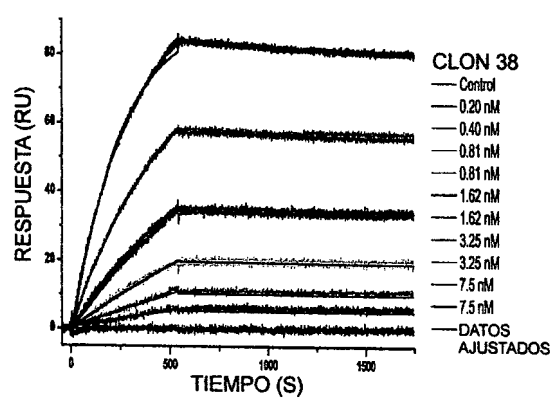


FIG. 9B

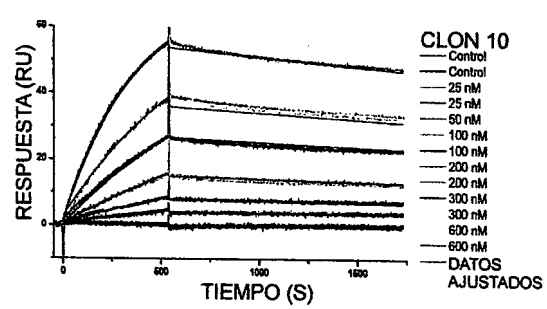


FIG. 10

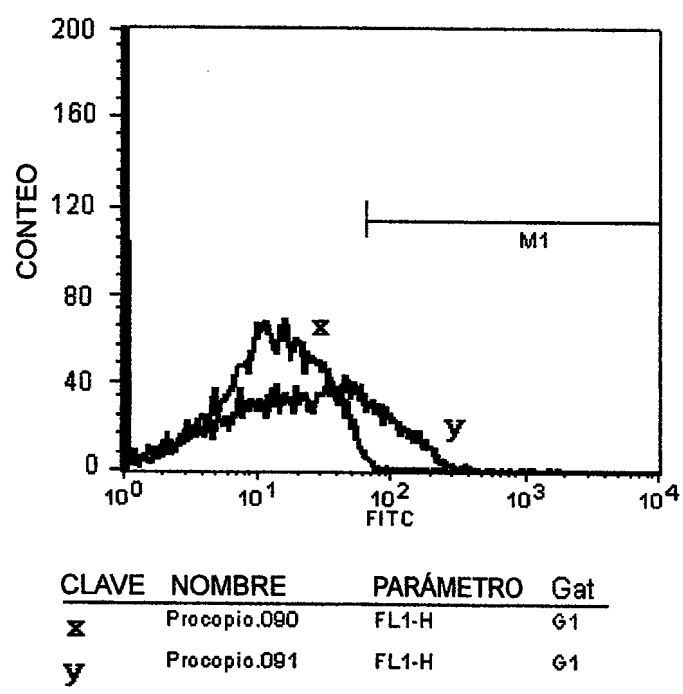


FIG. 11

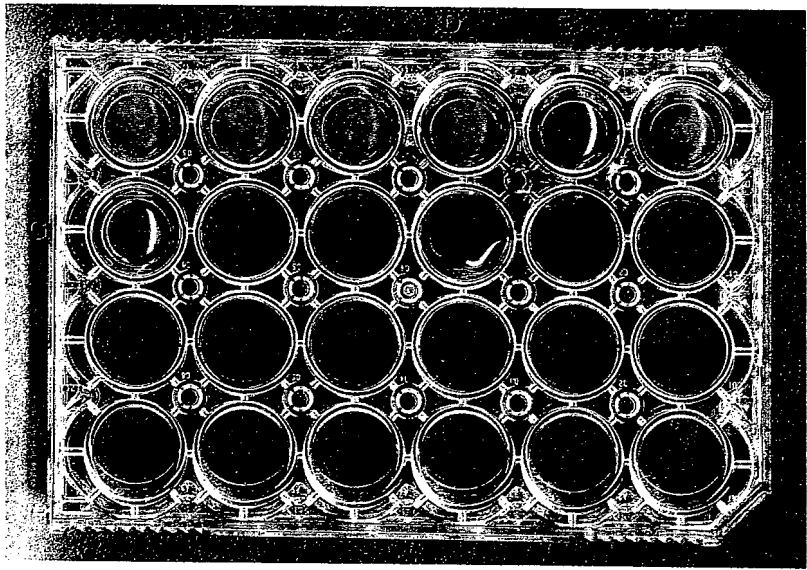


FIG. 12

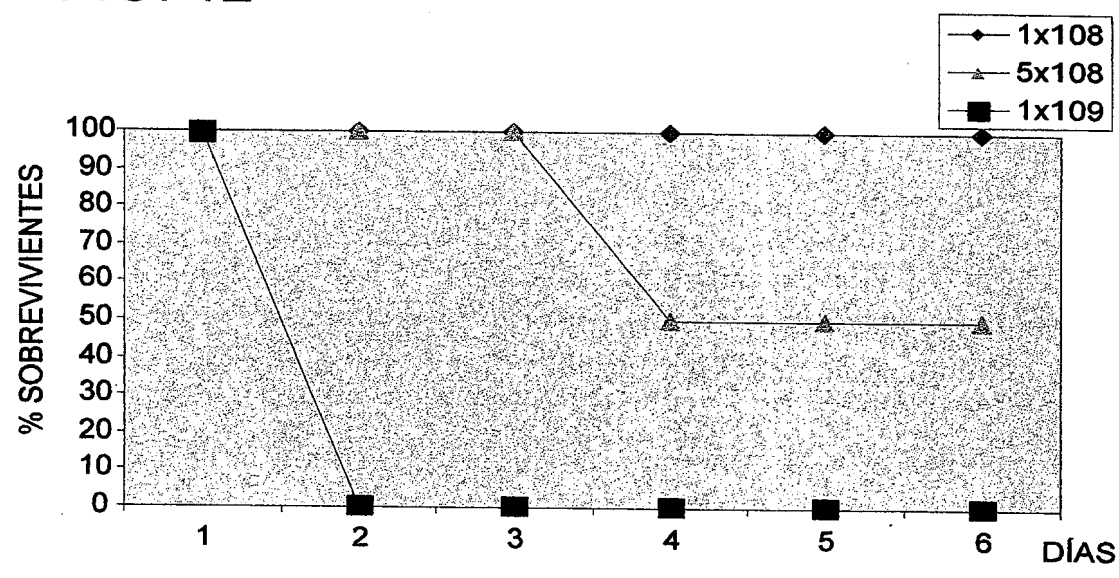


FIG. 13

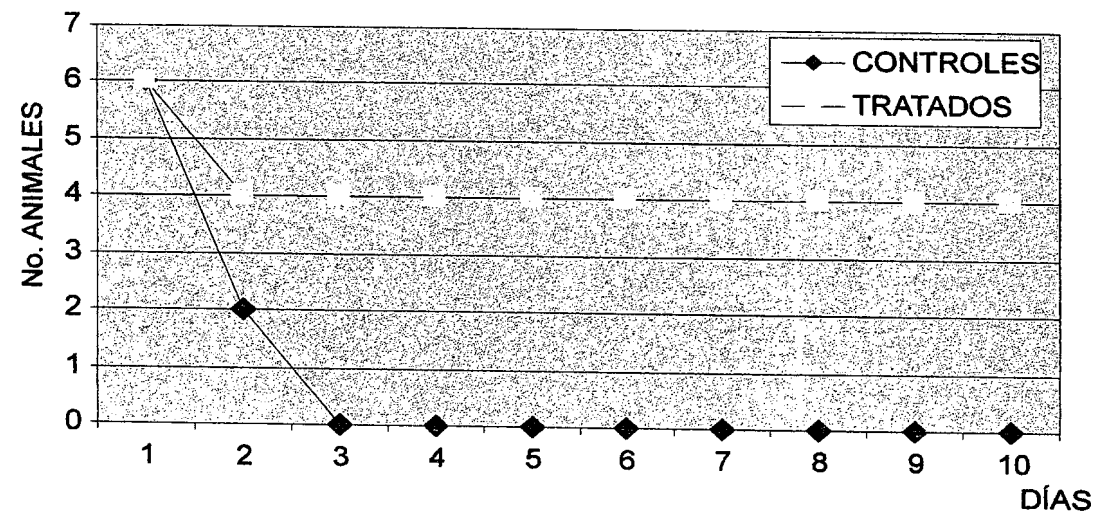
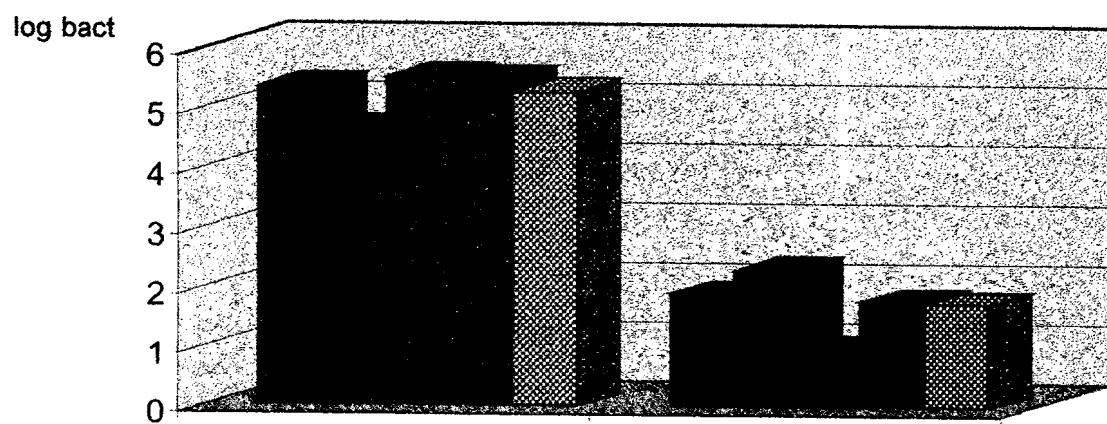


FIG. 14





No. 12-041846- -00000-0000

Fecha: 2012-03-09 16:34:24 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 113

Act. 411 PRESENTACION Folios: 112

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO D

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☒ Indicación que se solicita una PCT
- ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☒ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐