

TRIANA, U

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-041846- -00007-0000

Fecha: 2013-05-20 15:28:40 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 17

MINISTERIO DE COMERCIO INDUSTRIA Y TURISMO
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E.

S.

D.

REFERENCIA : SOLICITUD DE REGISTRO DE LA PATENTE
"ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA
PROTEÍNA PBP2-A Y SECUENCIAS HOMÓLOGAS
PARA EL TRATAMIENTO DE INFECCIONES E
INMUNODIAGNÓSTICO EN BACTERIAS DEL
FÍLUM FIRMICUTES"

EXPEDIENTE No. : 12-041846

CODIGO : 01-01-08

JUAN CARLOS URIBE RESTREPO mayor de edad, domiciliado en la ciudad de Bogotá D.C, República de Colombia, abogado titulado e identificado como aparece al pie de mi firma, en mi calidad de apoderado de la sociedad **FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**, existente y organizada conforme a las leyes de Brasil, con domicilio en la ciudad de Rio de Janeiro, Brasil, por medio del presente escrito doy respuesta al oficio No. 2601 notificado por fijación en lista de fecha 19 de febrero de 2013, para ello me permito manifestar:

1 Argumentos contra la oposición interpuesta por **PROCAPS S.A.**

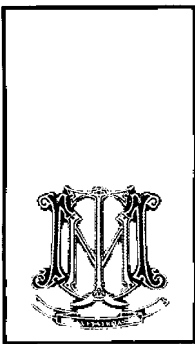
1.1 Modificación de las reivindicaciones.

En primer lugar, previo a dar respuesta a la oposición presentada por **PROCAPS S.A.**, me permito mencionar que el solicitante ha decidido presentar un nuevo capítulo reivindicatorio en el cual se han eliminado las cláusulas 5, 7 y 13 a 19, que hacían un método de diagnóstico, el uso del anticuerpo monoclonal de la invención y a un anticuerpo monoclonal, quedando el nuevo capítulo reivindicatorio conformado por un total de 10 reivindicaciones, dirigidas a un anticuerpo monoclonal y la composición farmacéutica que comprende dicho anticuerpo.

Considerando la información anterior, es evidente que el nuevo capítulo reivindicatorio no se refiere a materia exceptuada de patentabilidad ni hace mención a usos. En este orden de ideas, el nuevo capítulo reivindicatorio no cae dentro del alcance del Artículo 20 de la Decisión 486 de la Comunidad Andina, y cumple con el requisito de aplicación industrial establecido en los artículos 14 y 18 de la misma Decisión.

Adicionalmente, se incluyeron en el capítulo reivindicatorio las siguientes precisiones:

- La reivindicación 1 fue modificada para aclarar que la invención se centra en la región variable y se introduce una limitación al alcance de la invención.
- Las reivindicaciones 2 y 4 fueron enmendadas para corregir su dependencia y clarificar el objeto de dichas reivindicaciones.



- La reivindicación 3 fue cambiada para aclarar el objeto reclamado.
- La reivindicación 6 fue modificada para aclarar el objeto reclamado, el soporte para esta reivindicación está en la descripción de la solicitud, específicamente en la información encontrada bajo el numeral 4.2.2. *Ensayos de protección renal después de una infección sistémica con dosis subletales*. Adicionalmente, esta reivindicación ha sido re-enumerada y ahora es la reivindicación número 10.
- Las reivindicaciones 8 a 12, ahora reivindicaciones 5 a 9, han sido modificadas para mejorar su claridad.

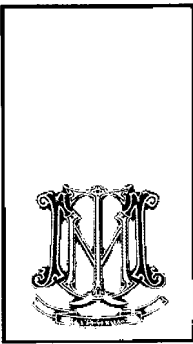
1.2 Equivocada interpretación del objeto de la invención y por ende, errada afirmación sobre la falta de novedad de la misma.

En la oposición se señala que el objeto de la solicitud son unos anticuerpos monoclonales capaces de reconocer y unirse a la proteína PBP2a y otras proteínas que presentan secuencias homólogas a PBP2, tales como proteínas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (MRSA), *Staphylococcus coagulasa negativa*, *Staphylococcus scluri*, *Enterococcus spp*, y cualquier otra bacteria que posea PBP2a o secuencias homólogas a esta proteína. La invención también se refiere a la utilización de estos anticuerpos monoclonales capaces de reconocer y unirse a la proteína PBP2 y otras proteínas que presentan secuencias homólogas a PBP2 en un inmunodiagnóstico complementario para la detección de resistencia a betalactamas.

Dentro de los fundamentos de la oposición, se señala que la presente solicitud carece de novedad toda vez que el documento D1, que corresponde al documento "*Immunological detection of penicillin-binding protein 29 of methicillin-resistant staphylococci by using monoclonal antibodies prepared from synthetic peptides*, SAITO ET AL, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Sept 1995, p. 2498-2500, ya hacía referencia a la detección inmunológica de la proteínas de unión a penicilina 2*(PBP2) del *Staphylococcus* resistente a la meticilina mediante anticuerpos monoclonales preparados a partir de péptidos sintéticos. D1 menciona que dos péptidos sintéticos 31 y 32 aminoácidos de cadena larga se prepararon deducidos de una secuencia de aminoácidos de dicha proteína de unión y que dos anticuerpos monoclonales fueron generados a partir de células fusionadas de células de mieloma y células esplénicas de ratones inmunizados con los péptidos sintéticos. Según el documento D1, el análisis Western blot (inmunotransferencia) demostró la unión específica de los anticuerpos contra PBP2 de una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y finalmente, el mismo resumen de D1 revela que un ensayo inmurradiométrico fue desarrollado a partir del uso de estos anticuerpos para la detección simple de PBP2.

Considerando la información de D1, el opositor afirma que en el estado de la técnica ya se había reportado la existencia de anticuerpos monoclonales capaces de reconocer y unirse a la proteína PBP2a y otras proteínas que presentan secuencias homólogas a PBP2, incluyendo las proteínas de patógenos de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina, para los cuales se solicita protección.

1.2.1. Argumentos de respuesta contra las afirmaciones del opositor:



En primer lugar, es necesario puntualizar que el documento D1 presentado por el opositor es el mismo D1 que aparece en el Reporte de Búsqueda Internacional de la correspondiente solicitud PCT.

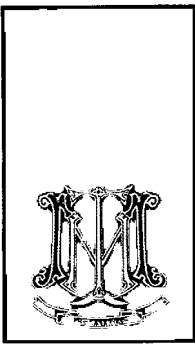
D1 reporta dos péptidos sintéticos SP1 y SP2, respectivamente, que corresponden a los residuos 382 a 412 y 414 a 443 de la secuencia de aminoácidos de la proteína PBP2'. SP1 y SP2 fueron inoculados en ratones para la producción de anticuerpo monoclonal anti-SP1 y anti-SP2. El ensayo inmunoradiométrico (IRMA) fue desarrollado utilizando estos anticuerpos para la detección de PBP2' en una muestra.

Es necesario anotar que los fragmentos SP1 y SP2 de la PBP2a proteína (que se utiliza para la producción de los anticuerpos aislados descritos en D1) están ubicados en la región interna de la molécula de PBP2a que flanquea el centro activo de la enzima y forma parte del fragmento empleado para la producción de los anticuerpos de la presente solicitud divulgados la secuencia SEC ID N °: 3. Específicamente, el fragmento SP1 es parte de la SEC ID N °: 3 de la solicitud bajo análisis e incluye el motivo conservado correspondiente a la transpeptidasa SxxK. Existen reportes de anticuerpos derivados de péptidos sintéticos obtenidos a partir de PBP2a de MRSA para la detección de dicha bacteria (MRSA). Aparte del estudio de Saito et al (D1), Sekiguchi et al (Detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) with antibodies against synthetic peptides derived from penicillin-binding protein 2'. MicrobiolImmunol, 39(8), 545-50, 1995) identificaron 10 péptidos capaces de generar anticuerpos que reconocen la PBP2a de MRSA. Estos péptidos sintéticos corresponden a varias regiones de PBP2a, incluyendo una región cerca del centro activo, tal como el fragmento usado en la invención en cuestión. Sekiguchi et al también fue citado, como documento D2, en el informe de búsqueda preliminar internacional de la solicitud internacional WO 2011/017791.

Sin embargo, en los artículos de Sekigushi en al. y Saito et al. no hay ninguna mención de la actividad bactericida de estos anticuerpos. Es decir, los estudios de Sekigushi et al. y Saito et al. no presentan una solución al problema planteado en la solicitud bajo análisis, que es la necesidad de contar con un anticuerpo capaz de mostrar actividad bactericida in vitro e in vivo, como se demuestra ampliamente y de manera consistente con los datos de la presente invención.

Se debe enfatizar que un anticuerpo generado contra una región particular, es capaz de reconocer tal región, pero esto no significa que dicho anticuerpo tiene necesariamente una actividad protectora (bactericida) in vitro e in vivo. Es más, no existen datos experimentales que soporten la hipótesis de que cualquier anticuerpo generado contra una región de PBP2a conferirá actividad protectora contra el MRSA. En este contexto resulta necesario tener en cuenta que el sistema inmune de los mamíferos es capaz de seleccionar azarosamente anticuerpos, con alta variabilidad.

Esta variabilidad se genera por la formación de inmunoglobulinas, donde ocurre el fenómeno de rearreglo o reacomodación de los genes, con intercambio de segmentos V-D-J, seguido por el fenómeno de maduración de la afinidad, donde los eventos hipermutación somática contribuyen al aumento en el repertorio de



anticuerpos (la diversidad total de $\sim 5 \times 10^{13}$). Por otra parte, los antígenos son presentados al sistema inmune por el complejo principal de histocompatibilidad de clase II, que consiste en un conjunto de loci genéticos ligados (7×10^6 pares de bases) que codifican proteínas involucradas en la presentación del antígeno a las células T, siendo altamente polimórficos (datos extraídos de Inmunobiología de Janeway, 7ª edición, 2010).

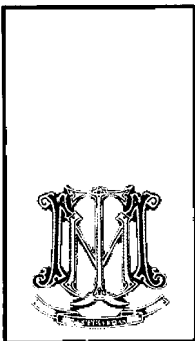
En vista de la explicación dada en los párrafos anteriores, para una persona versada en la materia es evidente que no hay garantía de que una inmunización con el mismo antígeno en un modelo animal puede generar un anticuerpo con las mismas características y las CDRs descritas en la solicitud de patente objeto de examen. Siendo así, los anticuerpos monoclonales aquí reclamados son novedosos.

Además, en ningún momento el documento D1 citado por el opositor menciona la posibilidad de que los anticuerpos reconocen PBP5 de *Enterococcus spp.* Sumado a este hecho, Saito et al también falla en la presentación de la actividad bactericida in vitro e in vivo contra estas bacteria, *Staphylococcus aureus* y/o *Enterococcus spp.*, como ocurre y se demuestra en la solicitud de patente en cuestión.

Las reivindicaciones de la presente solicitud están dirigidas a un anticuerpo monoclonal que contiene secuencias correspondientes a CDR (región determinante de complementariedad) de las cadenas ligeras y pesadas, caracterizadas por secuenciación directa del anticuerpo monoclonal producido por el clon de hibridoma 38 obtenido durante la investigación desarrollada por el solicitante. En el artículo de Saito et al D1, los anticuerpos se mencionan de una manera muy vaga, es decir, ningún anticuerpo monoclonal se describe de una manera bien definida. Adicionalmente, no hay ninguna divulgación de la caracterización de anticuerpos monoclonales de D1 y por lo tanto, no hay una descripción de la región en la que dichos anticuerpos se unen a PBP2a. En consecuencia, no es posible afirmar que los anticuerpos de D1 sean los mismos anticuerpos que se caracterizan y se reclaman en la presente solicitud de patente.

Sea esta la oportunidad para recordar que el numeral 8.3.1 “Divulgaciones genéricas y ejemplos particulares” de la GUÍA PARA EXAMEN DE SOLICITUDES DE PATENTE DE INVENCION Y MODELO DE UTILIDAD, establece “...una divulgación en términos genéricos no anula la novedad de una invención definida en términos específicos. Por ejemplo si una invención se refiere a la utilización de “cloro” y la invención que se encuentra en el estado de la técnica utiliza un “halógeno”, esta última no anula la novedad de la primera invención.” Siendo así, el documento tomado por el opositor no puede ser citado para discutir la novedad de la presente solicitud.

Ahora bien, el problema a resolver por la presente invención es proporcionar anticuerpos monoclonales capaces de reconocer y de unirse a la proteína PBP2a y a otras proteínas que presentan secuencias homólogas a tales anticuerpos monoclonales PBP2a, donde tales anticuerpos monoclonales han sido bien definidos y están representados por las secuencias SEQ ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 11, SEC ID N°: 12, SEC ID N°: 13, SEC ID N°: 14, SEC ID N°: 15, SEC ID N°: 16, y SEQ ID NO: 17.



A diferencia de otras aproximaciones, los inventores de esta solicitud trabajaron con una región interna de la molécula, con 76 aminoácidos que flanquean el núcleo activo de la enzima (SxxK), en el dominio transpeptidasa. Los análisis de identificación de epítomos fueron realizados a la molécula y a su presentación por los diferentes alelos del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase II, con la posterior verificación de su ubicación en la molécula.

Las enseñanzas de D1 se limitan a la caracterización de los anticuerpos monoclonales y en él no hay ninguna sugerencia en cuanto a la posibilidad de que los anticuerpos monoclonales de D1 podrían tener actividad bactericida *in vitro* e *in vivo*.

Sumado a lo anterior, D1 no aborda el problema de proporcionar un anticuerpo monoclonal anti-PBP2a capaz de unirse específicamente a PBP2a y a secuencias homólogas con aplicabilidad en el tratamiento y detección de las infecciones causadas por bacterias que presentan esta proteína o sustancias similares (MRSA, MRSE, *Enterococcus spp.*, y cualquier otro patógeno que tenga una proteína homóloga a PBP2a).

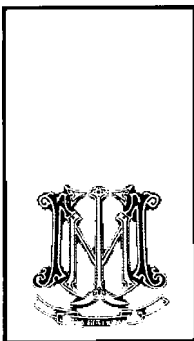
En procura de analizar el nivel inventivo la pregunta a responder es si una persona versada en la materia podría haber llegado a la invención mediante el uso de las enseñanzas de la D1. La respuesta es solo una, no hay ninguna enseñanza en D1 que hubiera conducido a la persona experta a lograr la invención que se reclama mediante la solicitud en estudio.

Además, en respuesta a la pregunta anterior, el solicitante se permite copiar a continuación un aparte de la conclusión del informe preliminar internacional emitido por IPEA/BR sobre la patentabilidad de la solicitud bajo análisis. Es importante tener en cuenta que el documento D1 mencionado en el IPRP es el mismo D1 citado por el oponente.

"Los documentos D1 y D2, sin embargo, no incluyen ensayos que demuestren el efecto bactericida de los anticuerpos descritos. Por lo tanto, aunque D1 y D2 describen anticuerpos monoclonales anti-PBP2a, y D2 describe anticuerpos con alta afinidad por PBP2a, esto no garantiza que estos anticuerpos tengan un efecto bactericida, como el del anticuerpo descrito en la presente solicitud".

1.3 Conclusión

En resumen, el documento citado por el oponente, es decir, D1, no puede hacer que el objeto reivindicado carezca de novedad o resulte obvio. El nuevo set de reivindicaciones de la presente solicitud se dirige a un producto tangible, a diferencia de lo que se presentó en el documento D1, que se limita al desarrollo de un ensayo inmunoradiométrico para la detección de anticuerpos monoclonales, que se unen a PBP2a, y la comparación con test usuales (test de susceptibilidad a medicamentos y gen mec A), que no son objeto de esta invención. En



consecuencia, el objeto de la presente invención es patentable, conforme con los artículos 14 y 20 de la Decisión 486 de la Comunidad Andina.

En conclusión, tanto los anticuerpos monoclonales como la composición farmacéutica reivindicados en la presente solicitud de patente son susceptible de protección ya que cumplen con los tres requisitos de patentabilidad de acuerdo con el Artículo 14 de la Decisión 486 de la Comunidad Andina de Naciones, que señala: “*Los Países Miembros otorgan patentes para las invenciones, sean de producto o procedimiento, en todos los campos de la tecnología, siempre que sean nuevas, tengan nivel inventivo y sean susceptibles de aplicación industrial*”. Por lo tanto, consideramos que no existe impedimento alguno para que proceda el registro de la solicitud.

2. Anexo

- 2.1 Me permito anexar el **nuevo capítulo reivindicatorio**, por medio del cual se evidencian los ajustes realizados, conforme a los argumentos expuestos en la actual respuesta.
- 2.2 Adicionalmente, se incluye copia del artículo “*Detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) with antibodies against synthetic peptides derived from penicillin-binding protein 2'.*” MicrobiolImmunol, 39(8), 545-50, 1995, mencionada en el Informe de Examen Preliminar como documento D2.

3. Petición

De acuerdo a lo manifestado en el numeral 1 del presente escrito, así como el nuevo capítulo reivindicatorio que se anuncia en el numeral 2, hemos cumplido con los requerimientos exigidos por su Despacho, por lo que me permito elevar mi respetuosa petición de practicar el examen de fondo, en concordancia con el Artículo 45 de la Decisión 486 de la Comunidad Andina, reconocer el cumplimiento de la totalidad de los requisitos de patentabilidad y en consecuencia, otorgar el privilegio de patente para la presente invención, de acuerdo al nuevo capítulo reivindicatorio.

Del Señor Jefe,


JUAN CARLOS URIBE RESTREPO
C.C. No. 79.159.313 de Bogotá
T.P.A. 54.493 de Min. Justicia

Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) with Antibodies against Synthetic Peptides Derived from Penicillin-Binding Protein 2'

Kiyoshi Sekiguchi, Michihiro Saito*, and Ryuichi Yajima

Dainabot Co., Ltd., Research Center, Matsudo, Chiba 271, Japan

Received December 19, 1994; in revised form, May 1, 1995. Accepted May 9, 1995

Abstract: Ten kinds of peptides (21 to 32 amino acids in length) were synthesized based on the reported amino acid sequences of the penicillin-binding protein 2' (PBP2') of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Antibodies against these synthetic peptides (SPs) were generated by immunizing rabbits. The antibodies raised against all the peptides except for one reacted to PBP2' of MRSA and to SPs used for immunization but not to any other protein of MRSA or methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) tested by ELISA and Western blotting. A sandwich immunoradiometric assay (IRMA) for the detection of PBP2' was developed using these antibodies. The method could detect PBP2' extracted from as few as 3×10^4 cells of a clinical MRSA isolate, and a good correlation between cell number and signal radio-count was observed. IRMA was positive for all 51 methicillin-resistant staphylococci isolated from patients, and was negative for all the 28 methicillin-susceptible ones and 19 strains of other bacterial species. IRMA could be a simple and reliable method for MRSA detection in the clinical bacterial laboratory.

Key words: MRSA, PBP2', Antigen-antibody reaction

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) has become a worldwide concern as a nosocomial pathogen (23). Intrinsic resistance in MRSA is known to be attributable to the presence of an additional penicillin-binding protein, penicillin-binding protein 2' (PBP2'), which has a reduced affinity for beta-lactam antibiotics (24, 28). Methicillin resistance caused by PBP2' has been found not only in *S. aureus* but also in coagulase-negative staphylococci (CNS), *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. simulans*, *S. saprophyticus*, *S. horminis*, *S. sciuri*, *S. caprae* and *S. warneri* (6, 11, 16, 20, 21, 25). Practically all the methicillin-resistant *S. aureus* as well as CNS (MR-CNS) carry the *mecA* gene which encodes PBP2' (11, 18), however strains which carry the *mecA* gene but are susceptible to methicillin have been described (2, 11, 15, 22, 26). Regardless, relatively good agreement between *mecA* detection by DNA hybridization or polymerase chain reaction (PCR) and methicillin resistance has been documented (5, 8, 11, 18, 27). Therefore, PCR detection of the *mecA* gene does not necessarily guarantee expression of methicillin resistance of the strain.

The resistance expression critically depends on the test conditions (e.g., incubation time and temperature, pH and

salt concentration of the medium, inoculum size and antibiotics used), making the routine susceptibility tests unreliable (4, 8, 18, 28). Some strains with low-level or borderline resistance are also found which produce no PBP2' (3, 5, 9, 10).

In the present study, we prepared ten synthetic peptides (SPs) representing various regions of the amino acid sequence of PBP2'. Specific antibodies against PBP2' were generated by immunizing rabbits with these SPs. We further developed an immunoradiometric assay (IRMA) for the detection of PBP2', and examined for the presence of PBP2' in clinical isolates.

Materials and Methods

Bacterial strains. Tested bacteria were isolated from patients at Clinical Laboratory Medicine, Chiba University Hospital from 1990 to 1992. A methicillin-

Abbreviations: BGG, bovine gamma globulin; BSA, bovine serum albumin; CNS, coagulase-negative staphylococci; IRMA, immunoradiometric assay; MR-CNS, methicillin-resistant CNS; MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MRSA1115, methicillin-resistant *S. aureus* 1115; MSSA, methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*; MSSA209P, methicillin-susceptible *S. aureus* 209P; PBS, 0.05 M phosphate-buffered saline, pH 7.4; PCR, polymerase chain reaction; PBP, penicillin-binding protein; PBP2', penicillin-binding protein 2'; S.D., standard deviation; SP, synthetic peptide.

*Address correspondence to Dr. Michihiro Saito, Dainabot Co., Ltd., Research Center, 344 Minoridai, Matsudo, Chiba 271, Japan.

resistant isolate, *S. aureus* 1115 (MRSA1115) and a methicillin-susceptible *S. aureus* 209P (MSSA209P) were used as in-house controls. Species identification of staphylococci was based on their biochemical characterization by using the N-ID test SP-18 kit (Nissui, Tokyo). For the detection of methicillin resistance, all staphylococci were inoculated at a final concentration of 10^6 CFU/ml in a cation-adjusted Mueller-Hinton medium (Difco, Detroit, Mich., U.S.A.) containing 2% NaCl, and 16 µg/ml of methicillin or 4 µg/ml of oxacillin at 35 °C for 24 hr (Antibiotics: Sigma, St. Louis, Mo., U.S.A.) (12).

Preparation of membrane fraction containing PBP2'. MRSA1115 and MSSA209P were lysed by lysostaphin (Sigma) and centrifuged as described (3). After SDS-PAGE of cell membrane pellets, the gel strip which contained 76-kDa proteins was cut and the proteins were electroeluted from the gel. These cell membrane proteins were dialyzed against 0.05 M phosphate-buffered saline, pH 7.4 (PBS) and stored at -80 °C.

SPs. Ten peptides consisting of 21 to 32 amino acid residues were chosen based on the amino acid sequence as well as the hydropathy profile of the PBP2' (7, 19). They were synthesized with the peptide synthesizer Model 431A (Applied Biosystems, Foster City, Calif., U.S.A.). A cysteine residue was added at the NH₂ or COOH terminus of each peptide.

Immunization. Each SP was chemically conjugated with bovine serum albumin (BSA: Sigma) using succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate (Pierce, Rockford, Ill., U.S.A.) as a crosslinker.

Japanese White rabbits (8 weeks old, female) were injected subcutaneously with either 50 µg of each SP-BSA conjugate or with 100 µg of the cell membrane fraction of MRSA1115 or MSSA209P emulsified in Freund's complete adjuvant (Difco). After a total of four injections at two-week intervals, the rabbits were

bled and sera were collected.

ELISA. The amount of 0.5 µg of each SP or 1 µg of the semi-purified membrane fraction was immobilized in a well of a 96-well polystyrene microtiter plate (Flow, Irvine, Scotland). The sera were diluted 100-fold with PBS containing 5% BSA and 5% bovine gamma globulin (BGG: Sigma). The antibodies bound to the well were detected with horseradish peroxidase-labeled goat anti-rabbit IgG (Organon Teknika, West Chester, Pa., U.S.A.) followed by detection of enzyme activity using o-phenylenediamine (Sigma) as a chromogen.

Affinity purification of antibody. Ten milligrams of SP was coupled with 10 ml of CNBr-activated Sepharose 4B gel (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Thirty milliliters of antiserum was passed through the gel in a column. After washing the gel with PBS, 3.5 M sodium isothiocyanate solution was used to elute peptide-specific antibodies. The antibody fractions were extensively dialyzed against PBS.

Preparation of antibody-immobilized beads and ¹²⁵I-labeled antibodies. Polystyrene beads, 0.25 inches in diameter (Precision System Science, Tokyo) were soaked in 0.2 ml of PBS containing 2 µg of the purified anti-SP2 antibody for physical adsorption of the antibody to the bead surface. The purified anti-SP1 antibody was tagged with ¹²⁵I (Amersham, Buckinghamshire, England) by the chloramine-T method to yield the ¹²⁵I-conjugated antibody (specific activity; 10 µCi/µg) (1).

IRMA for the detection of PBP2'. Bacteria were grown on a 5% sheep-blood agar prior to the test. Grown colonies were suspended in 1 ml of 8 M urea solution at the McFarland #2. For MRSA1115 and MSSA209P, three preparations, the cell lysate with lysostaphin (3), the cell suspension in 8 M urea, and the cell suspension in PBS, were made and adjusted to 1×10^5 to 3×10^5 CFU/ml.

One hundred microliters of the cell suspension and 200 µl of PBS containing 0.5% BGG and 1% BSA were dispensed into a well of the reaction trays and the anti-SP2 antibody-coated beads were added. After shaking at 25 °C for 18 hr, the beads were washed three times with 0.9% NaCl. Thereafter, 200k cpm of ¹²⁵I-labeled anti-SP1 antibody in 200 µl of PBS containing 15% bovine serum (Gibco, Tokyo) was added. After shaking for 4 hr, the beads were washed three times with 0.9% NaCl, and the radioactivity of the beads was measured using a gamma-ray counter (Amersham).

The cut-off cpm was set as the mean plus 5 times the standard deviation (S.D.) of ten urea solutions containing no bacteria.

Detection of PBP2' by penicillin-binding assay. The PBP-binding assay was performed according to the method described by Gerberding et al (3). A total of 50 nCi of [phenyl-4(n)-³H] benzylpenicillin (Amersham) was

SP1: 32 amino acids	¹⁹² YNKLTEDKKREPLLKFKQTTSFGSTQKILTAC ⁴¹²
SP2: 31 amino acids	¹¹⁴ CIGLNKNTLDDKTSYKIDGKGWQKDSWGGY ⁴³⁵
SP3: 27 amino acids	²⁷¹ CDYLSDFAKKPHLTNETSRNYPLG ³⁶⁶
SP4: 24 amino acids	²⁵⁴ CPINSEELKQKEYKGYKDDAVIGK ³²³
SP5: 21 amino acids	¹¹⁵ HTLIEKKKKDKDQIQLTIDAC ²¹²
SP6: 25 amino acids	⁴⁷ CGSEKRFEGMKKLGVEDIPSQYPP ⁵²⁹
SP7: 22 amino acids	⁴⁶ CIQDRKIKRVSEKSKRVDAQYK ¹²⁶
SP8: 22 amino acids	¹²⁷ CQDQSIHLENLSEKCKILOR ¹⁷⁷
SP9: 21 amino acids	²⁵⁷ CPHLLDTRNKVWKENITSEE ³⁰⁴
SP10: 22 amino acids	¹⁷⁴ CQGVVNRTHKEDIYRSYANLIG ²⁴⁸

Fig. 1. Amino acid sequences of ten synthetic peptides. The numbers over the sequences indicate the position on the PBP2' amino acid sequence.

used for the detection of PBPs, and 4 µg of non-radio-labeled cloxacillin (Sigma) was used for competitive binding inhibition of PBPs 1-4 per 250 µg of wet cell weight.

PCR detection of *mecA* gene. PCR was performed as described by Ubukata et al (26) with a modification, i.e. the PCR products were detected by electrophoresis in 1.5% agarose, instead of by enzymic detection.

Results

Preparation of Rabbit Antisera

The results of ELISA are shown in Table 1. Each of

all the anti-SP sera except for anti-SP3 serum specifically reacted to the immunized SPs and to the cell membrane fractions from MRSA1115 (>0.2 of absorbance at 492 nm). The anti-MRSA serum strongly bound to SP1, SP2, SP5, SP6, and SP9 (absorbance of >1.0), weakly to SP4, SP7, SP8 and SP10, but not to SP3 (absorbance of <0.2). The anti-MRSA serum reacted not only to MRSA1115 membrane but also to MSSA209P. On the other hand, the anti-MSSA serum reacted to both the MRSA1115 and MSSA209P membrane fractions, but did not react to any of the SPs.

Figure 2 shows fluorography (lanes 2-3) and Western blot (lanes 4-13) of penicillin-binding proteins of

Table 1. ELISA of rabbit anti-SP sera and antisera against MRSA1115 and MSSA209P membrane fractions

Coated antigen	Rabbit antiserum (Absorbance at 492 nm) ^a										
	a-SP1 ^b	a-SP2	a-SP3	a-SP4	a-SP5	a-SP6	a-SP7	a-SP8	a-SP9	a-SP10	a-MRSA
SP1	>2.0	— ^c	—	—	—	—	—	—	—	—	1.2
SP2	—	1.9	—	—	—	—	—	—	—	—	1.1
SP3	—	—	1.4	—	—	—	—	—	—	—	—
SP4	—	—	—	1.7	—	—	—	—	—	—	0.8
SP5	—	—	—	—	1.7	—	—	—	—	—	1.8
SP6	—	—	—	—	—	1.8	—	—	—	—	1.8
SP7	—	—	—	—	—	—	1.8	—	—	—	0.3
SP8	—	—	—	—	—	—	—	1.8	—	—	0.2
SP9	—	—	—	—	—	—	—	—	1.7	—	1.1
SP10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.6	0.4
MRSA ^d	1.8	1.4	—	1.5	1.2	1.6	0.7	0.5	1.4	1.1	>2.0
MSSA ^d	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.9

^a Sera were diluted 100 times with PBS containing 5% BSA and 5% BGG.

^b a-SP1 stands for anti-SP1 rabbit serum.

^c Absorbance of less than 0.2.

^d Cell membrane fraction purified by SDS-PAGE from MRSA1115 and MSSA209P.

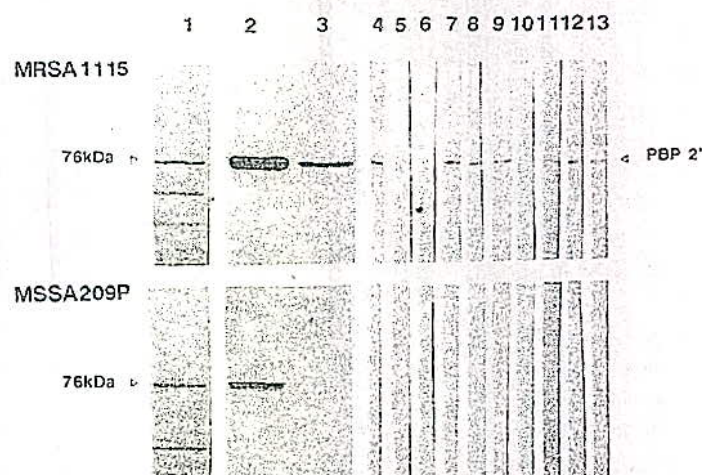


Fig. 2. Detection of PBP2' by penicillin-binding. Coomassie brilliant blue staining of SDS-PAGE-separated bands of MRSA1115 and MSSA209P (lane 1). Fluorography of PBPs by [³H]benzylpenicillin (lane 2). Fluorography of PBP2' by [³H]benzylpenicillin, in which all PBPs except for PBP2' were inhibited from binding to the penicillin by the non-radiolabeled cloxacillin (lane 3). Western blot of rabbit antibodies against SP1 to SP10 on MRSA1115 and MSSA209P cells (lanes 4 to 13).

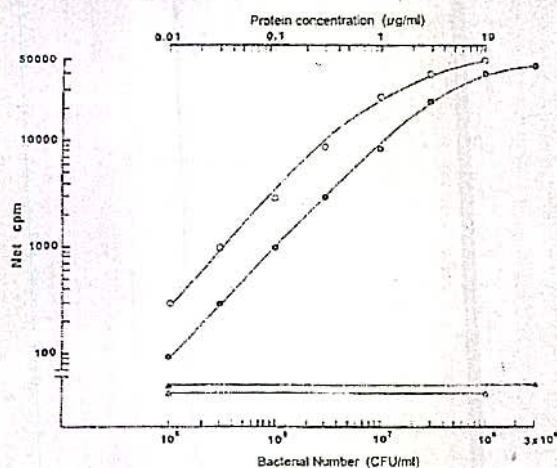


Fig. 3. PBP2' IRMA standard curves. Curves of lysostaphin-lysed MRSA1115 (●) and MSSA209P (▲), and SDS-PAGE-purified cell membrane fractions from MRSA1115 (○) and MSSA209P (△). The upper scale is for the membrane fractions and the lower one for the lysed bacteria.

MRSA1115 and MSSA209P. All antibodies except for anti-SP3 antibody (lane 6) specifically colored the 76-kDa band of MRSA1115 in the Western blot analysis. No band was observed with the MSSA209P lysate. The same 76-kDa band of MRSA1115 was also detected with [³H]benzylpenicillin, and the signal was not inhibited by preincubation with an excess amount of cloxacillin.

IRMA of PBP2'

Figure 3 shows two standard curves of the IRMA using either cell membrane proteins purified with SDS-PAGE or the cell lysates by lysostaphin of MRSA1115 and MSSA209P. From 10^{-2} to $10 \mu\text{g/ml}$ of the membrane proteins of MRSA1115, the radioactivity increased more than 50k cpm. The given cpm from $1 \mu\text{g}$ of membrane fraction was equivalent to that from 4×10^7 CFU of MRSA1115 lysates. The shapes of the two curves were almost the same. Neither the cell lysates nor the membrane fraction of MSSA209P showed an increase of cpm up to 3×10^8 CFU/ml or $10 \mu\text{g/ml}$ of the membrane protein concentration.

In Fig. 4, the standard curves are shown with samples prepared by suspending cells in lysostaphin solution, in 8 M urea solution, or in PBS. In the assay ranging from 1×10^5 to 1×10^8 CFU/ml, the observed increase of cpm was proportional to the cell number. MSSA209P did not show any increase in cpm up to 3×10^8 CFU/ml (data not shown). The use of lysostaphin and urea gave almost the same efficacy in the detection of PBP2'. Membrane preparation in PBS gave only a tenfold lower

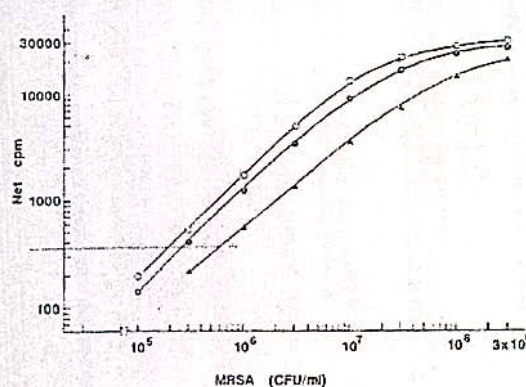


Fig. 4. Standard curves of IRMA of variously prepared MRSA1115 samples. Samples from lysostaphin-lysed MRSA1115 solution (○), the cell suspension in urea solution (●) and the cell suspension in PBS (△). Cut-off cpm (dotted line) was 370 as the net cpm and 920 as the gross cpm calculated from mean + 5 S.D. of 10 urea solutions which did not contain any bacteria.

standard curve.

The cut-off value of the PBP2' IRMA was calculated to be 370 net cpm or 920 gross cpm. The IRMA could detect PBP2' from down to 3×10^5 CFU/ml MRSA1115 in urea solution and $10^{-2} \mu\text{g/ml}$ SDS-PAGE-purified MRSA1115 cell membrane protein.

Correlation between PBP2' IRMA and mecA PCR

Colonies were suspended in urea solution at the McFarland #2, and applied to the IRMA for PBP2' (Table 2). All 33 methicillin- and oxacillin-resistant *S. aureus* and 18 resistant *S. epidermidis* strains, which showed MICs of $>16 \mu\text{g}$ for methicillin and $>4 \mu\text{g}$ for oxacillin, were judged to be positive for PBP2' production. On the other hand, methicillin- and oxacillin-susceptible isolates (23 *S. aureus* and 5 *S. epidermidis* strains) were all negative on IRMA. The *mecA* gene was positive for all the strains positive by IRMA, and was negative for all the IRMA-negative strains.

Nineteen isolates of *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Morganella morganii*, *Providencia rettgeri* and *Proteus mirabilis* were all negative on IRMA and PCR.

Discussion

In this study, we showed that the SPs derived from the reported amino acid sequence of PBP2' (19) possessed both the antigenicity (reactive with antibodies raised against MRSA), and the immunogenicity to elicit antibodies specific for PBP2'. We also demonstrated the successful detection of PBP2' using IRMA directly with bac-

Table 2. Comparison of PBP2' detection from bacteria by IRMA, *mecA* PCR and drug susceptibility test

Species	Broth micro-dilution test ^a		No. of strains	No. of strains PBP2' IRMA ^b		No. of strains <i>mecA</i> PCR	
	Methicillin	Oxacillin		Negative	Positive	Negative	Positive
<i>Staphylococcus aureus</i>	<16	<4	23	23	0	23	0
	>16	>4	33	0	33	0	33
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<16	<4	5	5	0	5	0
	>16	>4	18	0	18	0	18
<i>Enterococcus faecalis</i>			3	3	0	3	0
<i>Enterococcus faecium</i>			3	3	0	3	0
<i>Escherichia coli</i>			4	4	0	4	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>			3	3	0	3	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			3	3	0	3	0
<i>Morganella morganii</i>			1	1	0	1	0
<i>Providencia rettgeri</i>			1	1	0	1	0
<i>Proteus mirabilis</i>			1	1	0	1	0

^a No staphylococci which showed an MIC of >16 µg/ml for methicillin and <4 µg/ml for oxacillin MIC were found, and vice versa.

^b Strains that showed values higher than the cut-off cpm by IRMA were classified as positive.

terial lysates.

Preparations of polyclonal antibodies against PBP2' have been reported previously (3, 13, 14). However, because PBP2' purified by SDS-PAGE was contaminated with other bacterial proteins, generated antibodies did not bind to PBP2' specifically as shown in this study. These polyclonal antibodies would be applicable to specific detection of PBP2' only after absorption with MSSA cells (13). Gerberding et al prepared antisera by immunizing rabbits with affinity- and SDS-PAGE-purified PBP2' (3). The raised antiserum, however, detected excessive amounts of other proteins besides the 76-kDa PBP2'.

Synthetic peptides can be prepared in a large amount and with a very high purity. Presumptive antigenic epitope regions could be selected based on hydrophathy profile, temperature factor and some other supplemental analysis on the amino acid sequence of the protein. The preparation of SP, nowadays, is an easy and almost an automatized task. Therefore, the utilization of synthetic peptides is one of the promising methods for the production of specific antibodies.

Ryffel et al (17) and Wu et al (29) observed some differences in the deduced amino acid sequences of PBP2' among MRSA strains. Of our 10 SPs, which we selected based on the amino acid sequence determined by Song et al (19), SP3 has a glycine in its C-terminus which is substituted with a glutamic acid in the sequence reported by Ryffel et al (17). This difference may explain the non-reactivity of SP3 and anti-SP3 antibody with anti-PBP2' antibodies and PBP2', respectively.

Our study also agreed with the observation that PBP2's of both MRSA and MR-CNS are indistinguishable as reported based on deduced amino acid sequences (17) and mobility on SDS-PAGE (15).

Low- or borderline-resistant staphylococci sometimes show an unconvincing result which makes it necessary to repeat the drug susceptibility tests (3, 9, 17). Furthermore, some authors reported a group of strains which carry the *mecA* gene and which are still susceptible to methicillin (11, 20, 26).

However, it is well established that PBP2' is a main determinant for the intrinsic resistance of MRSA and MR-CNS (28). Therefore, detection of this protein will be of great importance for the basic study of bacterial resistance as well as for the definitive identification of methicillin-resistant staphylococci in hospitals.

Because the antibodies against SPs bound neither to MSSA nor to other bacterial species such as enterococci, their usage can be advantageous in carrying out specific detection of PBP2' from any MRSA clinical isolates. Improving the method of immunological detection of PBP2' with a faster and easier protocol will be a realistic goal in the future.

We thank Dr. H. Kanno, University of Chiba, for helpful discussions and critical comments on the manuscript and for supplying precious bacterial strains and clinical isolates for our study.

References

- 1) Bolton, A.E., and Hunter, W.M. 1973. The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a ¹²⁵I-containing acylating agent. *Biochem. J.* 133: 529-538.
- 2) Boyce, J.M., Medeiros, A.A., Papa, E.F., and O'Gara, C.J. 1990. Induction of beta-lactamase and methicillin resistance in unusual strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 25: 73-81.
- 3) Gerberding, J.L., Miick, C., Liu, H.L., and Chambers, H.F. 1991. Comparison of conventional susceptibility test with

- direct detection of penicillin-binding protein 2a in border line oxacillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 2574-2579.
- 4) Hartman, B.J., and Tomasz, A. 1984. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 158: 513-516.
 - 5) Hiramatsu, K., Kihara, H., and Yokota, T. 1992. Analysis of borderline-resistant *Staphylococcus aureus* using polymerase chain reaction. *Microbiol. Immunol.* 36: 445-453.
 - 6) Kanda, K., Suzuki, E., Hiramatsu, K., Oguri, T., Miura, H., Ezaki, T., and Yokota, T. 1991. Identification of a methicillin-resistant strain of *Staphylococcus caprae* from a human clinical specimen. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 174-176.
 - 7) Kyte, J., and Doolittle, R.F. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157: 105-132.
 - 8) Ligozzi, M., Rossolini, G.M., Tonin, E.A., and Fontana, R. 1991. Nonradioactive DNA probe for detection of gene for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 575-578.
 - 9) McDougal, L.K., and Thornberry, C. 1986. The role of beta-lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. *J. Clin. Microbiol.* 23: 832-839.
 - 10) Murakami, K., Nomura, K., Doi, M., and Yoshida, T. 1987. Production of low-affinity penicillin-binding protein by low- and high-resistance groups of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 1307-1311.
 - 11) Murakami, K., Minamide, W., Wada, K., Nakamura, E., Teraoka, H., and Watanabe, S. 1991. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 29: 2240-2244.
 - 12) National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 1990. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 2nd ed. Approved Standard, M7-A2.
 - 13) O'Hara, D.M., and Reynolds, P.E. 1987. Antibody used to identify penicillin-binding protein 2' in methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* (MRSA). *FEBS Lett.* 212: 237-241.
 - 14) O'Hara, D.M., Harrington, C.R., and Reynolds, P.E. 1989. Immunological detection of penicillin-binding protein 2' in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 57: 97-104.
 - 15) Okonogi, K., Noji, Y., Kondo, M., Imada, A., and Yokota, T. 1989. Emergence of methicillin-resistant clones from cephamycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 24: 637-645.
 - 16) Pierre, J., Williamson, R., Bornet, M., and Gutmann, L. 1990. Presence of an additional penicillin-binding protein in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus simulans* with low affinity for methicillin, cephalothin, and cefamandole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 1691-1694.
 - 17) Ryffel, C., Tesch, W., Birch-Machin, I., Reynolds, P.E., Barberis-Maino, L., Kayser, F.H., and Berger-Baechli, B. 1990. Sequence comparison of *mecA* genes isolated from methicillin-resistant *S. aureus* and *S. epidermidis*. *Gene* 94: 137-138.
 - 18) Skulnick, M., Simor, A.E., Gregson, D., Patel, M., Small, G.W., Kreiswirth, B., Hathoway, D., and Low, D.E. 1992. Evaluation of clinical and standard methodology for determination of oxacillin susceptibility in *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 30: 1985-1988.
 - 19) Song, M.D., Wachi, M., Doi, M., Ishino, F., and Matsuhashi, M. 1987. Evolution of an inducible penicillin-target protein in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by gene fusion. *FEBS Lett.* 221: 167-171.
 - 20) Suzuki, E., Hiramatsu, K., and Yokota, T. 1992. Survey of methicillin-resistant clinical strains of coagulase-negative staphylococci for *mecA* gene distribution. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 429-434.
 - 21) Tesch, W., Straessle, A., Berger-Baechli, B., O'Hara, D., Reynolds, P., and Kayser, F.H. 1988. Cloning and expression of methicillin resistance from *Staphylococcus epidermidis* in *Staphylococcus carnosus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 1491-1499.
 - 22) Tokue, Y., Shoji, S., Satoh, K., Watanabe, A., and Motomiya, M. 1992. Comparison of a polymerase chain reaction assay and a conventional microbiologic method for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 6-9.
 - 23) Townsend, D.E., Ashdown, N., Bolton, S., Bradley, J., Duckworth, G., Moorhouse, E.C., and Grubb, W.B. 1987. The international spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Hospital Infection* 9: 60-71.
 - 24) Ubukata, K., Yamashita, N., and Konno, M. 1985. Occurrence of a beta-lactam-inducible penicillin-binding protein in methicillin-resistant staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27: 851-857.
 - 25) Ubukata, K., Nonoguchi, R., Song, M.D., Matsuhashi, M., and Konno, M. 1990. Homology of *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus simulans* to that of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 170-172.
 - 26) Ubukata, K., Nakagami, S., Nitta, A., Yamane, A., Kawakami, S., Sugiura, M., and Konno, M. 1992. Rapid detection of *mecA* gene in methicillin-resistant staphylococci by enzymatic detection of polymerase chain reaction products. *J. Clin. Microbiol.* 30: 1728-1733.
 - 27) Uenal, S., Hoskins, J., Flokowitsch, J.E., Wu, C.Y.E., Preston, D.A., and Skatrud, P.L. 1992. Detection of methicillin-resistant staphylococci by using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30: 1685-1691.
 - 28) Utsui, Y., and Yokota, T. 1985. Role of an altered penicillin-binding proteins in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28: 397-403.
 - 29) Wu, C.Y.E., Hoskins, J., Blaszcak, L.C., Preston, D.A., and Skatrud, P. 1992. Construction of a water-soluble form of penicillin-binding protein 2a from a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 533-539.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une a una proteína, dicho anticuerpo monoclonal, caracterizado porque comprende en la región variable de las cadenas liviana y pesada secuencias de aminoácidos seleccionadas de los 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 aminoácidos correspondientes que son al menos 80% idénticos a ellas.
2. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo a la reivindicación 1, caracterizado porque las regiones variables de la cadena liviana y de la cadena pesada están codificadas por secuencias de ADN seleccionadas a partir de las secuencias 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 que son al menos 80% idénticas a ellas.
3. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une a la proteína PBP5 de *Enterococcus spp.*, caracterizado porque comprende en las regiones variables de la cadena liviana y de la cadena pesada secuencias de aminoácidos, seleccionadas de las secuencias 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 que son al menos 80% idénticas a ellas.
4. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo a la reivindicación 3, caracterizado porque la región variable de la cadena liviana y de la cadena pesada está codificada por secuencias de ADN, seleccionadas de las secuencias 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 que son al menos 80% idénticas a ellas.

- m
5. El anticuerpo monoclonal de conformidad con la reivindicación 1 o 3, caracterizado porque exhibe en la región variable de la cadena pesada una región CDR1 que contiene la secuencia SEQ ID NO.: 12, una región CDR2 que contiene la secuencia SEQ ID NO.: 13 y una región CDR3 que contiene la secuencia SEQ ID NO.: 14 o secuencias de aminoácidos correspondientes que son al menos 80% idénticas a ellas.
 6. El anticuerpo monoclonal de conformidad con la reivindicación 2 o 4, caracterizado porque la región variable de la cadena liviana está codificada por una secuencia de ADN seleccionada de las secuencias SEQ ID NO.: 9, SEQ ID NO.: 10, SEQ ID NO.: 11 o secuencias de ADN correspondientes que son al menos 80% idénticas a ellas.
 7. El anticuerpo monoclonal de conformidad con la reivindicación 2 o 4, caracterizado porque la región variable de la cadena pesada está codificada por una secuencia de ADN seleccionada de las secuencias SEQ ID NO.: 15, SEQ ID NO.: 16, SEQ ID NO.: 17 o secuencias de ADN correspondientes que son al menos 80% idénticas a ellas.
 8. El anticuerpo monoclonal de conformidad con la reivindicación 2 o 4, caracterizado porque la región variable de la cadena liviana incluye una región CDR1 que contiene la secuencia SEQ ID NO.: 9, una región CDR2 que contiene la secuencia SEQ ID NO.: 10 y una región CDR3 que contiene la secuencia SEQ ID NO.: 11 o las secuencias de aminoácidos correspondientes que son al menos 80% idénticas a ellas.
 9. El anticuerpo monoclonal de conformidad con la reivindicación 2 o 4, caracterizado porque la región variable de la cadena pesada incluye una región

15

CDR1 que contiene la secuencia SEQ ID NO.: 15, una región CDR2 que contiene la secuencia SEQ ID NO.: 16 y una región CDR3 que contiene la secuencia SEQ ID NO.: 17 o las secuencias de aminoácidos correspondientes que son al menos 80% idénticas a ellas.

10. Una composición farmacéutica útil para el tratamiento o prevención de la infección por bacterias de *Filo firmicutes*, caracterizada porque comprende una cantidad de anticuerpo monoclonal aislado o sus fracciones funcionalmente equivalentes de acuerdo con lo que se define en las reivindicaciones 1 a 9 y un vehículo farmacéutico, portador o excipiente.



No. 12-041846- -00006-0000

Fecha: 2013-05-20 15:24:02 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 329 CTOINFORMACION Folios: 6

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
MODIFICACIONES Y/O CORRECCIONES

1. Identificación del Trámite

☐ Error material

☒ Modificación a una Solicitud en trámite

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Registro de Diseño Industrial

☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante

Persona Natural ☐

Persona Jurídica ☒

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Nombre o denominación / Nombre o razón social completa

Nombre representante legal

Tipo de empresa

Micro ☐

Pequeña ☐

Mediana ☐

Otra ☒

Documento de identificación:

☐ C.C.

☐ C.E.

☐ NIT

☐ Otro Número

Nacionalidad/País de constitución	Dirección y domicilio del titular	Ciudad
BRASIL	AVENIDA BRASIL 4365, MANGUINHOS 21045-900, RIO DE JANEIRO	RIO DE JANEIRO
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico



Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del apoderado:

URIBE RESTREPO JUAN CARLOS

79.159.313

54.493

Apellidos y Nombre

Documento de identificación

Tarjeta profesional

Dirección y domicilio		Ciudad
CALLE 93B No. 12-48, Piso 4o. BOGOTA, D.C., COLOMBIA		BOGOTA
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
tum@tumnet.com	6-114209	6-019660

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general

4. Datos del trámite

Corrección:

Expediente No 12-041846

Aparece

Debe ser

Modificación:

☒ Modificación al capítulo reivindicatorio.
VER HOJAS ANEXAS

☐ Modificación al capítulo descriptivo.

☐ Modificación al resumen.

☐ Modificación a los dibujos.

☐ Modificación al solicitante.

5. Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación
- ☒ Poder, si fuere el caso. Se encuentra anexo al expediente Se encuentra anexo al expediente
- ☒ Documento que contiene las modificaciones o correcciones.
- ☐ Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético.

6. Firma	
JUAN CARLOS URIBE RESTREPO	
Nombre y apellidos	Firma
C.C 79.159.313	Tarjeta Profesional 54.493