

CAPÍTULO DESCRIPTIVO MODIFICADO

Campo Técnico

Esta invención se relaciona con tecnología de desarrollo de medicina bilógica, especialmente con un método de preparación de antibiótico novedoso y sistema de plataforma con base en el mismo.

Antecedentes

Actualmente, la investigación y desarrollo de la industria farmacéutica, particularmente de antibióticos enfrenta dificultades: 1. Cada vez existen más bacterias patogénicas resistentes a fármacos. Los antibióticos actuales no suponen una amenaza a las bacterias patogénicas resistentes a fármacos. Está en aumento el índice de mortalidad provocado por estas bacterias patogénicas resistentes a fármacos. 2. La velocidad del desarrollo de medicina novedosa se queda atrás al ritmo de ocurrencia de las bacterias patogénicas resistentes a fármacos. Se necesita mucho tiempo y es de mucho costo detectar antibióticos con métodos tradicionales así como también obtener logros de investigación y desarrollo. 3. Los antibióticos novedosos desarrollados por ingeniería genética o biotecnología siguen provocando fácilmente resistencia a fármaco de bacterias patogénicas.

Se muestra mediante datos estadísticos de WHO que, en millones de personas infectadas con *Staphylococcus aureus* cada año, alrededor del 30% de dichas personas finalmente mueren --- que es mayor que el índice de mortalidad por SIDA. Con el fin de curar la infección del *Staphylococcus aureus* resistente a fármaco, el costo en el mundo entero excede 20 mil millones de dólares cada año. Después que se produce el *Staphylococcus aureus* resistente a fármaco, la vancomicina se convirtió en la principal cura para la infección por *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, ha aparecido *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina en hospitales desde el 2002. Aunque el área de propagación del *Staphylococcus aureus* resistente de vancomicina es pequeño actualmente, existen pocos medicamentos que pueda inhibirlas efectivamente, de tal manera que el índice de mortalidad provocado por la infección de *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina es muy alto. En

los últimos 10 años, aparecieron otras bacterias resistentes a fármacos - bacterias gram-negativas resistentes a múltiples fármacos, y tienen mayor resistencia a fármacos. Casi ninguno de los antibióticos utilizados en la medicina clínica actual puede amenazar a dichas bacterias resistentes a fármaco.

Actualmente se producen la mayoría de los antibióticos mediante bacterias y hongos, o se derivan de antibióticos naturales mediante modificación química. El método de detección tradicional de antibióticos comprende aislar microorganismos a partir de muestras de suelo, extraer las secreciones del medio para cultivar dichos microorganismos, detectar sustancias con efectos antibacteriales o esterilizantes en dichas secreciones y separar los ingredientes de medicamento individuales con potencial valor medicinal. El método fue muy eficaz en la edad de oro del desarrollo de los antibióticos (1940-1950). Pero llega ahora al final, cuando dicho método de detección depende de las secreciones de bacterias y hongos en la naturaleza, a saber, los antibióticos novedosos se obtienen al detectar y modificar las secreciones de microorganismos descubiertos. Dicho método tradicional para desarrollar antibióticos inevitablemente requiere mucho tiempo, y tiene un resultado incierto. Así, en los últimos 50 años, las compañías farmacéuticas nunca dejaron de detectar antibióticos, pero los antibióticos novedosos detectados son cada vez menos. Está demostrado por las estadísticas de datos de la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América (IDSA) que, en recientes nuevas aplicaciones de la medicina de la FDA en EE.UU., sólo hay 16 solicitudes de antibióticos novedosos, y no existe una solicitud de patente sobre los antibióticos contra las bacterias Gram-negativas altamente resistentes a fármacos. La famosa revista científica popular "*Scientific American*", ha advertido de forma continua desde el 2009 hasta el 2012 que, las bacterias súper están amenazando la seguridad de la vida humana. El CDC en EE.UU. pronostica que, los actuales antibióticos utilizados serían totalmente inválidos dentro de 10 a 20 años. El New York Times informa que, debido al abuso de antibióticos en la agricultura, los humanos volverán a tiempos sin disponibilidad de antibióticos dentro de unos 5 años, y los genes mutantes de la súper bacteria NDM-1 han provocado el pánico en el mundo. El problema de las bacterias resistentes a fármacos y antibióticos en la ganadería también es un problema grave, y ha influido en la seguridad del producto

agrícola. Los últimos 40 años es un período de vacío de en el desarrollo de antibióticos. En una palabra, la velocidad de desarrollo e investigación de medicamentos novedosos está muy por detrás del ritmo de mutación de las bacterias resistentes a fármacos.

En el presente, existen dos métodos para desarrollar antibióticos novedosos: (1) modificar los antibióticos actuales o sintetizar nuevos tipos de antibióticos, (2) conducir la modificación genética en bacterias que sintetizan antibióticos. Sin embargo, estos dos métodos no han excedido tal tónica porque: el mecanismo antibacteriano de dichos antibióticos no es novedoso para las bacterias. Por lo tanto, sin excepción, las bacterias generarán resistencia a fármaco a dichos antibióticos “novedosos” pronto.

Con el fin de resistir los microorganismos patogénicos con variabilidad fuerte, fuerte viabilidad, fuerte patogenicidad y diversas especies, los problemas urgentes para resolver actualmente son como sigue:

1. proporcionar antibióticos con efectos antibacteriales o esterilizantes muy fuertes para bacterias patogénicas, especialmente para bacterias patogénicas resistentes a fármacos;
- 2 proporcionar métodos para preparar dichos antibióticos en el punto 1, preferiblemente métodos que puedan responder a la variabilidad de bacterias patogénicas, es decir desarrollar e investigar métodos de antibióticos con corto ciclo de desarrollo, que puedan resistir sensiblemente nuevos o variantes microorganismos patogénicos;
3. dichos antibióticos desarrollados por dicho método no llevarán a resistencia a fármaco de los microorganismos patogénicos en un corto tiempo

Sin embargo, los problemas mencionados anteriormente son solo “enigmas” que no se han resuelto por las diversas generaciones de antibióticos actuales y métodos de

desarrollo de antibióticos tradicionales.

Resumen de la Invención

En vista de las dificultades técnicas para obtener antibióticos novedosos existentes en los campos mencionados anteriormente, se proporciona un método y plataforma diferente de estrategias tradicionales para desarrollar antibióticos. A través de dicho método y plataforma, se pueden ofrecer antibióticos novedosos con reconocimiento específico y capacidad de matar cualquier microorganismo patológico, célula objetivo o tejido objetivo en un corto plazo; dichos métodos pueden resolver sensiblemente la resistencia a fármaco que surge debido a la mutación continua de microorganismos patológicos, es decir, proporciona inmediatamente antibióticos novedosos correspondientes contra las cepas variantes que surgen nuevamente. Y dichos antibióticos novedosos preparados mediante dicho método raramente conducen a la variación de microorganismos patológicos así como también resistencia a fármaco, debido a su mecanismo de esterilización novedoso. La solución técnica de esta invención es como sigue:

Un método de preparación de antibiótico novedoso, en donde las etapas son como sigue:

(1) determinar objetivos: dichos objetivos se refieren a células procarióticas, células eucarióticas, virus o productos de los mismos contra los cuales reaccionará directamente dicho antibiótico novedoso;

(2) diseñar la estructura molecular de dicho antibiótico novedoso:

dicha estructura molecular de dicho antibiótico novedoso se diseña de acuerdo con la siguiente fórmula general:



En donde, R es la región de reconocimiento, que específicamente reconoce o combina dichos objetivos; F es la región efectora, que genera efectos farmacéuticos a

los objetivos, y dichos efectos farmacéuticos son efectos para regular, reparar, etiquetar, provocar la muerte y/o hacer colapsar específicamente contra dichos objetivos;

establecer la colección de estructura molecular de región de reconocimiento;

establecer la colección de estructura molecular de región efectora;

de acuerdo con dicha fórmula general, diseñar la colección de estructura molecular recombinante sobre la base de dicha colección de estructura molecular de región de reconocimiento y colección de estructura molecular de región efectora;

dicho diseño se refiere al proceso de reajuste estructural, recombinación estructural y/o conformación estructural llevada a cabo sobre la base de estructuras moleculares de sustancias recolectadas, seleccionadas o preparadas utilizadas como región efectora o región de reconocimiento;

(3) con base en dicha colección de estructura molecular recombinante, preparar y verificar recombinantes de tal manera que se obtengan antibióticos novedosos candidatos;

(4) detectar antibióticos novedosos que cumplen los requerimientos de medicamentos de antibióticos novedosos candidatos.

Dicho establecimiento de la colección de estructura molecular de región de reconocimiento se refiere a recolectar las sustancias naturales actualmente conocidas que reconocen y/o combinan específicamente dichos objetivos al buscar y analizar; o/y preparar de forma artificial sustancias artificiales que reconocen y/o combinan específicamente dichos objetivos.

Dichas sustancias naturales se refieren a una región de reconocimiento o región molecular bioactiva natural del bacteriófago, que puede ser reconocida por el aceptor

de dichos objetivos;

dichas sustancias artificiales se refieren a imitador de anticuerpo, dicho imitador de anticuerpo se diseña de acuerdo con la secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina que específicamente pueden reconocer la sustancia única sobre dichos objetivos.

Dicho imitador de anticuerpo es un péptido corto con una estructura de $V_H\text{CDR1}$ - $V_H\text{FR2}$ - $V_L\text{CDR3}$ desde el terminal N hasta el terminal C, que se constituye por las regiones de $V_H\text{CDR1}$, $V_H\text{FR2}$, $V_L\text{CDR3}$ sobre el corto brazo Fab de dicha inmunoglobulina; o

es un mutámero de dicho péptido corto; dicho mutámero se refiere al producto obtenido mediante mutación de sitio artificial para 5 residuos de aminoácidos de $V_H\text{CDR1}$ y 9 residuos de aminoácidos de $V_L\text{CDR3}$ sobre el péptido corto, que conserva la capacidad de reconocimiento para la sustancia única sobre dichos objetivos.

Dicha inmunoglobulina puede ser múltiple. Por ejemplo, el $V_H\text{CDR1}$ de $V_H\text{CDR1}$ - $V_H\text{FR2}$ - $V_L\text{CDR3}$ es de una inmunoglobulina, y el $V_L\text{CDR3}$ es de otra inmunoglobulina.

Dicha inmunoglobulina se prepara al tomar la sustancia única sobre el objetivo como inmunógeno para inmunizar al animal.

Dicha inmunoglobulina se prepara al tomar sustancias únicas comunes en múltiples objetivos como inmunógenos para inmunizar al animal.

Dicha inmunoglobulina se prepara al tomar múltiples sustancias únicas sobre el objetivo como inmunógenos respectivamente para inmunizar al animal.

Cuando dicho objetivo se refiere a virus, célula procariótica o célula eucariótica con

membrana de bicapa de fosfolípido como la estructura básica de su membrana o envoltura celular, dicho efecto farmacéutico se refiere a provocar la muerte y/o hacer colapsar;

dicha región efectora se refiere a la sustancia bioactiva que puede formar canal de ión o ruta de poro en membranas de bicapa de fosfolípido.

Dicha región efectora se refiere a una bacteriocina piocina de *Pseudomonas aeruginosa*

Dicha región efectora se refiere a colicinas E1, Ia, Ib, A, B o N; o dominios de moléculas de colicina E1, Ia, Ib, A, B y/o N que puede formar canales de ión; o moléculas obtenidas mediante aloterismo a partir de moléculas de colicina E1, Ia, Ib, A, B o N, o a partir de dominios de moléculas de colicina E1, Ia, Ib, A, B o N que pueden formar canales de ión, que tienen la función de formar canales de ión en dichas membranas de bicapa de fosfolípido.

Dicho recombinante es polipéptido recombinante, dicha preparación de recombinante se refiere a que se transforma el gen que codifica dicho polipéptido recombinante en el sistema de expresión biológica para expresar proteína de fusión, y el antibiótico novedoso candidato se obtiene al separar y purificar la proteína de fusión.

Dicho sistema de expresión biológica se refiere a un sistema pET de *Escherichia coli* que diseña por ingeniería bacterias *E.coli* B834 (DE3).

Dicho efecto farmacéutico se refiere a etiquetar, dicha región efectora se refiere a etiqueta, dicha preparación de recombinante se refiere a ligar la región efectora y región de reconocimiento de forma operable.

El sistema de preparación de antibiótico novedoso de plataforma comprende 3 sistemas interoperables: (1) sistema que propone meta, (2) sistema de diseño, (3)

sistema de laboratorio;

dicha plataforma prepara el antibiótico novedoso de acuerdo con dicho método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14; dicho sistema que propone meta determina la meta de desarrollo, y suministra instrucciones de tarea a dicho sistema de diseño;

dicho sistema de diseño establece la colección de estructura molecular de región de reconocimiento así como también la colección de estructura molecular de región efectora, diseña la colección de estructura molecular para dicho recombinante, y proporciona dicha colección de estructura molecular a dicho sistema de laboratorio,

dicho sistema de laboratorio ofrece resultados experimentales a dicho sistema de diseño; dicho sistema de diseño reporta los productos candidato seleccionados finalmente como resultados de desarrollo al sistema de comercialización;

dicho diseño se refiere al procedimiento de ajuste estructural, recombinación estructural y/o conformación estructural con base en estructura molecular de la sustancia recolectada, seleccionada o preparada utilizadas como región efectora o región de reconocimiento.

Dicho sistema de laboratorio comprende por lo menos una institución asociada de terceros que realiza dichos experimentos.

Mediante el método para preparar antibióticos novedosos de esta invención, está disponible preparar una tanda de antibióticos novedosos candidatos contra la mayoría de objetivos, y seleccionar antibióticos novedosos específicamente contra dichos objetivos con región de reconocimiento y región efectora a partir de candidatos. En el método de esta invención, dichos objetivos pueden ser células procarióticas (por ejemplo, *Staphylococcus aureus* con resistencia a fármaco en el ejemplo 5, cianobacterias contaminantes del ambiente en el ejemplo 6, *Bacillus anthracis* en el ejemplo 3), células eucarióticas (por ejemplo, hongos agrícolas en contra del polipéptido antifúngico en el ejemplo 4, células tumorales inducidas por el virus EB en

el ejemplo 1), virus (por ejemplo, glicoproteína de envoltura única en virus EB en el ejemplo 1), productos de dichas células procarióticas o eucarióticas.

Durante la preparación, de acuerdo con la fórmula general



, establecer la colección de estructura molecular de región de reconocimiento así como también la colección de estructura molecular de región efectora, y diseñar la colección de estructura molecular para recombinantes.

Debido a que existen sustancias con reconocimiento específico para especies específicas de células en la naturaleza, tales como, feromona, ligando de aceptor sobre células de reconocimiento, la inmunoglobulina se produce en humanos o animales. Más aún, se produce inmunoglobulina contra xenobióticos de forma natural por el sistema inmune de los animales. Sobre la base de la inmunoglobulina preparada a través de inmunizar de forma artificial los animales o que existe en la naturaleza, está disponible básicamente para obtener sustancias de reconocimiento contra cualquier dicho objetivo, que hace que dicho método de esta invención tenga una amplia aplicabilidad.

Adicionalmente, también existen sustancias en la naturaleza, que pueden formar cambio letal sobre células específicas. Por ejemplo, se pueden conducir las bacteriocinas colicina y *Pseudomonas aeruginosa* como región efectora, pero la desventaja es que se limita las especies de células objetivos con las que reaccionarán.

Tomando las ventajas de las dos clases anteriormente mencionadas de sustancias y adoptando sus puntos fuertes mientras que superamos nuestras deficiencias, en cuanto a los antibióticos novedosos preparados por el método de esta invención, la región de reconocimiento lleva a todo recombinante molecular a reconocer sustancias objetivo, y la región efectora completa los efectos farmacéuticos.

El principio del método de esta invención es preparar antibióticos novedosos con base en una fórmula general, recolectar y/o diseñar una tanda de estructuras moleculares de la región de reconocimiento y región efectora contra la sustancia objetivo propuesta para establecer la colección de estructura molecular, luego diseñar la estructura molecular de los antibióticos novedosos de acuerdo con la colección de estructura molecular establecida, y obtener una tanda de colecciones de estructura molecular de recombinantes; después, preparar una tanda de antibióticos novedosos candidatos de acuerdo con la información estructural molecular de colecciones de estructura molecular de recombinantes, finalmente verificar dichos antibióticos novedosos candidatos uno por uno para seleccionar el antibiótico novedoso que cumple los estándares farmacéuticos. Las ventajas del método de preparación de esta invención son como sigue:

(1) El método de esta invención solo está dirigido contra células procarióticas, células eucarióticas, virus o productos de los mismos para preparar antibióticos novedosos, y estas sustancias mencionadas anteriormente tienen sustancias de reconocimiento naturales o tienen sustancias de superficie única o sus propias se pueden conducir como inmunógeno para inmunizar al animal para obtener inmunoglobulina que se reconoce por sí misma, que asegura que, está disponible para obtener siempre la región de reconocimiento mediante el método de preparación de esta invención, y efectivamente rompe un cuello de botella que existe actualmente en el desarrollo de antibióticos, es decir, se ha agotado gradualmente la realidad de las proteínas como objetivos de efecto de fármaco (es decir, objetivos de fármaco), y los objetivos que quedan son sin fármacos (es decir, no reaccionan con fármacos).

Más aún, también existen sustancias como región efectora en la naturaleza, pero dichas sustancias tienen selectividad en relación con diferentes efectos farmacéuticos. Por ejemplo, si la meta es preparar un antibiótico novedoso para provocar la muerte de las células objetivos, sustancias tales como colicinas son competentes para lograr dicha meta; si la meta es regular, interferir o etiquetar, esta es suficiente para seleccionar moléculas de sustancia con dichos efectos como la región efectora. Sobre la base de la fórmula general el método de esta invención como premisa, asegura que

los antibióticos novedosos se pueden preparar contra la mayoría de sustancias objetivo, es decir, el método de esta invención tiene alto índice de éxito y amplia aplicabilidad.

(2) La mejor ventaja del método de esta invención es que, contra una sustancia objetivo, se pueden preparar diversos antibióticos novedosos de una vez y están bien preparados para hacer frente a la resistencia a fármaco de microorganismos patogénicos, debido a que en esta invención, se preparan antibióticos novedosos contra alguna sustancia objetivo con base en una fórmula general; se obtiene la colección de recombinantes al establecer la colección de región efectora y la colección de región de reconocimiento respectivamente, y se seleccionan los recombinantes disponibles con buenos efectos como antibióticos novedosos a partir de la colección de recombinantes. Esto resuelve el problema que existe en el desarrollo actual de nuevos fármacos de que, es alta la velocidad para que ocurra resistencia a fármaco en microorganismos patogénicos, y no hay otro antibiótico alternativo cuando ocurre la resistencia a fármaco.

En el método de esta invención, al establecer la colección de región de reconocimiento, los anticuerpos monoclonales específicos preferiblemente se seleccionan como la región de reconocimiento diseñada, es decir, se diseñan como los anticuerpos de cadena sencilla diseñados comúnmente, anticuerpos moleculares pequeños en la técnica anterior o imitador de anticuerpo con la estructura mostrada en la Tabla 1 que fue descrita anteriormente por el inventor de esta invención. Es decir, la estructura molecular de la región de reconocimiento establecida puede ser imitador de anticuerpo en la Tabla 1 o productos de mutación de punto de dicho imitador de anticuerpo; mutación de punto se refiere a péptidos cortos obtenidos al conducir mutación de punto artificial sobre residuo de aminoácidos de dos regiones de reconocimiento que componen el imitador de anticuerpo, que tiene capacidad de reconocimiento contra dicho objetivo.

Esto hace que los miembros de la colección de estructura molecular establecida de región de reconocimiento se expandan ilimitadamente, con el fin de contrarrestar

mejor la mutación de patógenos, que amplifica la segunda ventaja anterior del método de esta invención. Por ejemplo, si no se reconoce el objetivo (célula patogénica) debido a la resistencia a fármaco que ocurre en una región de reconocimiento, pueden existir muchas estructuras moleculares de región de reconocimiento similares como candidatos.

El imitador de anticuerpo tiene más ventajas en comparación con el anticuerpo, y es más fácil de obtener así como también de operar de forma artificial. Debido a los diferentes objetivos dirigidos, las sustancias conducidas como regiones de reconocimiento pueden ser feromona, región de reconocimiento de fago o anticuerpos monoclonales específicos que se recolectan a partir de bases de datos actuales, pero están limitadas después de todo. En las sustancia bioactivas encontradas en plantas, animales o microorganismos, la sustancia bioactiva más efectiva para reconocer la molécula única es el anticuerpo. Con el fin de evitar la desventaja del anticuerpo natural con gran tamaño, la gente siempre diseña y prepara el mutámero de anticuerpo con tamaño más pequeño. Sin embargo, estos mutámeros consisten de cientos de residuos de aminoácidos, y aún tienen gran tamaño en comparación con las regiones de reconocimiento que tratamos. El corto brazo Fab de cada anticuerpo natural tiene 6 regiones de unión de antígeno, y ellas así como también su estructura principal forman estructuras espaciales complicadas. Dicha estructura espacial tiene la función de reconocer y unir el antígeno específico, mientras que en los antibióticos novedosos desarrollados por la plataforma de esta invención, es suficiente que la región de reconocimiento solo tenga función de reconocimiento, y la región de reconocimiento no necesita unirse al antígeno correspondiente. De acuerdo con Qiu et al (*Small antibody mimetic comprising two complementarity-determining regions and a framework region for tumor targeting, Nature Biotechnology* 25(8):921-929(2007)), Qiu et al. selecciona 2 regiones de unión de antígeno y una región de estructura principal sobre el corto brazo Fab del anticuerpo natural para formar un imitador de anticuerpo de péptido corto que se refiere a la estructura del anticuerpo natural; aunque su tamaño es 50 a 300 veces más pequeño que el anticuerpo natural, se conserva la actividad biológica básica del anticuerpo natural, es decir, se puede reconocer específicamente algún antígeno. Debido al sistema inmune

en humanos o animales responderá para producir específicamente inmunoglobulina contra dicho inmunógeno cuando se irrita por el inmunógeno, esta invención preferiblemente prepara anticuerpos monoclonales que reconocen objetivos y proporciona región de reconocimiento con base en los anticuerpos monoclonales y el imitador de anticuerpo que diseña la idea descrita en el artículo de Qiu *et al.*, 2007. Por lo tanto, destinada a cualquier célula de microorganismo patogénico o célula tratada pendiente, se pueden preparar teóricamente anticuerpos monoclonales específicos, y sustancias de región de reconocimiento adecuadas – se puede preparar de forma correspondiente el imitador de anticuerpo. Esto hace que el índice de éxito para preparar antibióticos novedosos contra algunos objetivos mediante el método de esta invención tenga un salto cualitativo en comparación con el método tradicional para preparar antibióticos, y se acorte el tiempo para obtener productos en un lote. Teóricamente, el tiempo para preparar un antibiótico novedoso incluso una tanda de antibióticos novedosos contra un objetivo igual al tiempo para obtener el anticuerpo monoclonal específico y el tiempo para preparar proteína recombinante método de bio-ingeniería.

Dichos objetivos son objetivos múltiples con antígeno de superficie común, y dicho imitador de anticuerpo se prepara al inmunizar al animal con dicho antígeno de superficie común como composición de antígeno. Los antibióticos novedosos preparados al tomar dicho imitador de anticuerpo como región de reconocimiento pueden reconocer varios de dichos objetivos, es decir, tienen efectos sobre un amplio espectro de antibióticos.

Con respecto a la colección de estructura molecular de región de reconocimiento establecida por el método de esta invención, si la sustancia específica en la superficie de objetivo seleccionado es común para diversas superficies de microorganismos, el imitador de anticuerpo correspondiente se convierte en una región de reconocimiento de amplio espectro, es decir, sólo si su superficie tiene sustancias similares, se puede reconocer la célula de microorganismo, y el antibiótico novedoso preparado contra esta es un antibiótico de amplio espectro. Si la sustancia específica seleccionada es única para una célula de microorganismo, el imitador de anticuerpo correspondiente

se convierte en una región de reconocimiento de espectro reducido, y sólo se puede reconocer la célula de microorganismo con sustancia similar.

Tomando diversas sustancias de superficie sobre los objetivos seleccionados como inmunógenos, que generan anticuerpos monoclonales correspondientes al tomar dichas sustancias de superficie de forma separada para inmunizar al animal para obtener muchas clases de imitadores de anticuerpos y mutámeros del mismo que pueden reconocer dicha célula de microorganismo específicamente, hay otro método para expandir la colección de región de reconocimiento. Está disponible para seleccionar en primer lugar cualquiera de estos imitadores de anticuerpo como la primera región de reconocimiento del antibiótico novedoso desarrollado por el método de esta invención. Después de ser utilizado prácticamente durante un período de tiempo, si se ha producido resistencia a fármaco en dicho microorganismo contra dicha región de reconocimiento (por ejemplo, estructura de la sustancia de superficie correspondiente (antígeno) se modifica para mantener dicha región de reconocimiento desde que se reconoce), está disponible para seleccionar otro de estos imitadores de anticuerpo como la segunda región de reconocimiento, la tercera región de reconocimiento, la cuarta región de reconocimiento del antibiótico novedoso desarrollado por el método de esta invención, de acuerdo con lo anterior ofrece diversos antibióticos novedosos opcionales, que superan efectivamente las dificultades de fallar al proporcionar inmediatamente fármacos alternativos para el tratamiento después de que se produce resistencia al fármaco contra los antibióticos de la técnica anterior. El método de esta invención es capaz de extender la vida útil de la aplicación efectiva de un antibiótico novedoso.

Cuando dicho objetivo se refiere a virus, célula procariótica o célula eucariótica con membrana de bicapa de fosfolípido como la estructura básica de su membrana o envoltura celular, dicho efecto farmacéutico se refiere a provocar la muerte y/o hacer colapsar,

dicha región efectora se refiere a la sustancia bioactiva que puede formar canal de ión o ruta de poro en membranas de bicapa de fosfolípido, tal como la colicina y la piocina bacteriocina de *Pseudomonas aeruginosa* actualmente conocidas.

Dicha región efectora se refiere a colicinas E1, Ia, Ib, A, B o N; o se refiere a dominios de moléculas de colicina E1, Ia, Ib, A, B y/o N que pueden formar canales de ión; o se refiere a moléculas obtenidas mediante aloterismo a partir de moléculas de colicina E1, Ia, Ib, A, B o N,

o a partir de dominios de moléculas de colicina E1, Ia, Ib, A, B o N que pueden formar canales de ión, que tienen la función de formar canales de ión en dichas membranas de bicapa de fosfolípido. Se ilustra de acuerdo con descripción de los antecedentes de la técnica anterior que, los principales microorganismos patogénicos confrontados actualmente y en el futuro por los humanos tiene una característica común, que sus membranas celulares tienen una estructura de membranas de bicapa de fosfolípido. En la naturaleza, existen muchas bacteriocinas que matan las bacterias directamente formando canales de iones a través de membranas celulares de las bacterias. La representación típica es una bacteriocina secretada por *Escherichia coli*-colicina, y su función es matar la *Escherichia coli* de la misma especie pero de diferente cepa, en lugar de dañar a otras especies de bacterias y anfitriones de *Escherichia coli*-humana, así como también animal. Como una muestra modelo de colicinas que forman canales de iones, después que la colicina Ia fue encontrada por Jacob en 1952, se demostró finalmente en 1996 la estructura espacial de transmembrana del canal iónico formada por colicina Ia en membranas de bicapa lipídica artificial en el estado de abertura o cierre (Qiu *et al*, Major transmembrane movement associated with colicin Ia channel gating. J. Gen. Physiology, 107:313-328 (1996)), que sentó una base teórica para diseñar y preparar nuevos antibióticos en el nivel molecular. Sin embargo, la colicina tipo natural sólo reacciona en *Escherichia coli* de la misma especie pero de diferente cepa, y es necesario alterar su objetivo para hacer que la colicina ataque otras bacterias patógenas. Por lo tanto, colicina es un candidato ideal para región efectora del antibiótico novedoso desarrollado por la plataforma de esta invención.

Cuando dicho recombinante es polipéptido recombinante, la región efectora de ligado y región de reconocimiento mencionadas anteriormente se refiere a que se transforma el gen que codifica dicho polipéptido recombinante en el sistema de expresión biológica para expresar proteína de fusión, y el antibiótico novedoso se obtiene al

separar y purificar la proteína de fusión.

Dicho efecto farmacéutico se refiere a etiquetar, dicha región efectora se refiere a etiqueta, dicha preparación de recombinante se refiere a ligar de forma operable la región efectora y la región de reconocimiento. Por ejemplo, la molécula de la región de reconocimiento se puede etiquetar con marcador radioactivo.

Con referencia al método de esta invención, después que se confirma la molécula de región de reconocimiento contra el objetivo, se selecciona la molécula de región efectora, y la selección de la molécula de región efectora se relaciona con la meta de establecer dicho antibiótico. Por ejemplo, si la meta es regular contra el objetivo, está disponible seleccionar la molécula con función de reparación; si la meta es provocar la muerte del objetivo o limitar su crecimiento y desarrollo, está disponible seleccionar la molécula de polipéptido biológica que puede formar canal de ión letal a través de la membrana celular del objetivo, como la colicina; si la meta es el objetivo de etiqueta o imagen, está disponible ligar el agente de etiqueta o formación de imagen a la región de reconocimiento para obtener el antibiótico novedoso para etiquetar, y la etiqueta se une al objetivo a través de la región de reconocimiento, con el fin de conducir una terapia o investigación continua contra las células de etiqueta.

En el método de esta invención para desarrollar antibióticos novedosos, la función importante es establecer la colección de región de reconocimiento, debido a que la mayoría de objetivos tienen bicapa de fosfolípido como la estructura básica de su membrana o envoltura celular. En el método de esta invención, la colicina, la Piocina bacteriocina *Pseudomonas aeruginosa* preferiblemente se selecciona como la región efectora. La colicina es una motivación de regulación efectiva para la competencia de supervivencia y el mantenimiento de la biodiversidad entre *Escherichia coli*, y la *Escherichia coli* varía continuamente con el fin de evitar la esterilización de colicina; la colicina ha existido desde hace miles de millones de años, y todavía está cumple una función fisiológica insustituible en el canal alimenticio de cada organismo multicelular individual. Dado que el objetivo atacante de antibióticos novedosos preparados por el método de esta invención es microorganismo o célula de otras especies, y estos

microorganismos o células nunca han sido atacados por colicina, costará mucho tiempo para estas bacterias producir proteínas inmunes similares con bacterias; de acuerdo con lo anterior, se estima que los antibióticos novedosos obtenidos por el método de esta invención tendrán vida útil de aplicación más larga que los antibióticos tradicionales. Por medio de la formación de canales de iones a través de la membrana del objetivo, la colicina tiene un fuerte efecto de esterilización, que es de forma apropiada cientos de decenas incluso de miles de veces más que el de los antibióticos tradicionales, como la penicilina, cinnematina, vancomicina, estreptomicina, carbapenem, tigeciclina, etc. La región efectora seleccionada preferiblemente por el método de esta invención dará efecto de esterilización mucho más fuerte a antibióticos novedosos preparados por el método de esta invención, en comparación con los antibióticos tradicionales.

En el caso de que la región de reconocimiento y la región efectora sean recombinantes de molécula de polipéptido, el método para unir la región de reconocimiento a la región efectora es preferiblemente sintetizar la secuencia de nucleótidos que codifica dicho recombinante, luego construir un vector de expresión recombinante que carga dicha secuencia de nucleótidos, finalmente transformar dicho vector de expresión recombinante en el sistema de expresión biológica, por ejemplo, dicho recombinante se expresa en cepa diseñada por ingeniería de *Escherichia coli* y separada. Adicionalmente, la cepa diseñada por ingeniería del sistema pET de *Escherichia coli*, es decir, *E.coli* B834 (DE3) se selecciona preferiblemente como el sistema de expresión biológica en el método de esta invención, y el índice de expresión de dicha proteína recombinante en este sistema es superior a través de verificación.

Con respecto a los antibióticos novedosos preparados por el método de esta invención, una tanda de recombinantes se ganan en etapas para obtener recombinante, y los recombinantes que tienen efectos de reconocimiento y farmacológicos por lo menos contra objetivos, es decir, antibióticos novedosos finalmente se seleccionan a través de verificación de función convencional, es decir, la verificación de efectos de reconocimiento y farmacológicos de los recombinantes al

utilizar sus objetivos y no objetivos. Para algunos recombinantes sin efecto sobre el objetivos pero con efectos sobre no objetivos, está disponible confirmar su espectro de efecto mediante verificación adicional.

Esta invención también proporciona el sistema de plataforma para operar el método mencionado anteriormente para desarrollar antibióticos novedosos, que hacen que la operación del método desarrolle antibióticos novedosos estandarizados de modelo para mejorar la eficiencia del desarrollo de antibióticos novedosos. Dicha plataforma comprende 3 grupos de sistemas coordinados: (1) sistema que propone meta, (2) sistema de diseño y (3) sistema de laboratorio;

Dicho sistema que propone meta determina la meta de desarrollo y da instrucción de tarea al sistema de diseño; la tarea de dicho sistema que propone meta es confirmar que objetivos se deben direccionar a para desarrollar antibióticos novedosos, qué efectos farmacológicos de los antibióticos novedosos se llevan a cabo contra dichos objetivos; por ejemplo, a través de búsqueda, se analiza la demanda del campo de medicina, estado de resistencia a fármaco de los antibióticos, y nuevos patógenos así como también la información de los mismos y se recolectan datos experimentales o proyectos de contratación externalizados así como también se cuenta para confirmar la meta de desarrollo. En esta invención, dichos efectos farmacéuticos son efectos para regular, reparar, marcar, provocar la muerte y/o hacer colapsar. Dicho sistema que propone meta puede incluir miembros de núcleo del equipo R&D, equipo de comercialización; la meta fija puede ser proyectos de contratación externalizados, que se diseñan para desarrollar antibióticos novedosos contra algunos microorganismos patogénicos;

El sistema de diseño diseña la región de reconocimiento, región efectora y estructura molecular de dichos recombinantes y propone la tarea experimental deseada al sistema de laboratorio de acuerdo con la instrucción de tarea del sistema que propone meta y dicha fórmula general; se requiere que el sistema de diseño de antibióticos novedosos establezca la colección de región de reconocimiento y colección de región efectora de acuerdo con las instrucciones de tarea desde el sistema que propone

meta. Con base en las instrucciones del sistema que propone meta, se recolectan las sustancias que reconocen específicamente dichos objetivos, se seleccionan y preparan, como la región de reconocimiento; dicha preparación de sustancias que reconocen específicamente dichos objetivos se refiere a preparar y detectar para obtener el anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente dichos objetivos a través de inmunizar animales al utilizar sustancia únicas separadas de dichos objetivos o dichos objetivos como inmunógeno;

Dicho sistema de laboratorio ofrece resultados experimentales al sistema de diseño de antibióticos novedosos, y el sistema de diseño de antibióticos novedosos reporta productos candidatos de logros de desarrollo seleccionados finalmente al sistema que propone meta;

dicho diseño se refiere al procedimiento de ajuste estructural, recombinación estructural y/o conformación estructural con base en estructura molecular de la sustancia recolectada, seleccionada o preparada.

En el sistema de plataforma de esta invención, dicho sistema de laboratorio completa el trabajo experimental de acuerdo con la instrucción del sistema de diseño de antibióticos novedosos, por ejemplo, preparar el anticuerpo monoclonal de candidatos como región de reconocimiento, preparar polipéptido como región efectora y preparar dichos recombinantes así como también llevar a cabo una serie de trabajo de verificación. Básicamente, el trabajo de dicho sistema de laboratorio incluye preparar el anticuerpo monoclonal contra el objetivo, obtener secuencia de aminoácidos de anticuerpo monoclonal al secuenciar, sintetizar el gen del imitador de anticuerpo diseñado, sintetizar el gen que codifica el recombinante, preparar así como también purificar el recombinante o preparar el recombinante, verificar recombinante, generar el informe experimental y dar retroalimentación al sistema de diseño.

En la plataforma de desarrollo de esta invención, el sistema de diseño es el núcleo de la tecnología, y se pueden completar todos los trabajos en el sistema de laboratorio por la técnica anterior, por lo tanto, está disponible para construir un equipo de trabajo

del laboratorio completo propio, y también está disponible para sólo disponer del administrador del equipo de trabajo de laboratorio, y externalizar el trabajo de laboratorio por el administrador del sistema de laboratorio de los institutos asociados de terceros que se enfocan en trabajos de experimentación de las etapas correspondientes. A través del proceso mencionado anteriormente, el trabajo de desarrollo se puede completar con alta calidad de manera eficiente; los recursos de investigación y desarrollo se integran de manera efectiva en costos. La plataforma de desarrollo establecida por esta invención es igual a una fábrica de I & D de antibióticos novedosos.

Cada sistema de dicho sistema de plataforma de esta invención realiza su propia función, coordina para hacer que el sistema funcione de manera eficiente en la plataforma, lo que hace disponible que sólo cueste alrededor de la mitad de un año generar un antibiótico objetivo novedoso. De hecho, se produce una tanda de nuevos antibióticos contra un objetivo durante esta mitad del año, y la eficiencia de preparación del antibiótico es mucho más alta que la preparación tradicional. Adicionalmente, el trabajo de cada sistema se lleva a cabo con intención, de acuerdo con lo anterior el fondo de corporación o institución de investigación se asigna con objetivo definido, en lugar de invertirse ciegamente en proyectos sin importancia aplicables en la práctica o demanda del mercado. En particular, en la plataforma de esta invención, algunos trabajos del sistema se pueden subcontratar a un tercero socio especializado en el campo correspondiente. De acuerdo con lo anterior, no sólo se puede realizar la integración con alta eficiencia y utilización de equipos y recursos de I & D, sino también se reduce el costo de I & D se reduce y se acorta el tiempo consumido.

Se muestra el diagrama de flujo de trabajo de dicho sistema de plataforma de esta invención como la Figura 5, y se evita el desgaste y repetición en el trabajo de desarrollo a un grado máximo.

En resumen, el método y sistema de plataforma de esta invención proporcionan un nuevo método para preparar medicina, y las ventajas superiores a los métodos de

preparación tradicionales son como sigue:

(1) no sujeto a limitación de método tradicional para detectar antibióticos: los antibióticos novedosos preparados por el método de esta invención tienen constitución estructural común, es decir, consiste de la región efectora y región de reconocimiento. En proyectos de desarrollo contra los objetivos con membranas celulares de bicapa de fosfolípido, está disponible para seleccionar la colicina actual como la región efectora; bajo la introducción de la región de reconocimiento, la colicina de los antibióticos novedosos puede formar el canal de ión letal a través de casi todas las membranas celulares con estructura de membrana celular de bicapa de fosfolípido.

En la medida en que existen sustancias de único género o de única especie o de cepa de superficie única sobre las superficies de las membranas celulares en la mayoría de los microorganismos, preparar el anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente el objetivo al utilizar dichas sustancias o células de superficie que contienen dichas sustancias de superficie como inmunógenos es una tecnología muy madura en el presente, y después de obtener dicho anticuerpo a la luz de la idea de diseñar el imitador de anticuerpo en las invenciones anteriores por el inventor. De esta manera, el método de desarrollo de esta invención no se someterá a limitación de que las proteínas como objetivos del efecto de fármaco (es decir, objetivos de fármaco) descubiertos en la actualidad se han agotado gradualmente, y los objetivos dejados tienen importancia farmacológico (no fármacos es decir, no reaccionan con fármacos), y es capaz de desarrollar los antibióticos novedosos específicamente contra la mayoría de microorganismos patogénicos.

(2) la capacidad de sensiblemente luchar contra la resistencia a fármaco del microorganismo patogénico: debido a que no solo existe una sustancia de antígeno de superficie en el microorganismo patogénico, está disponible para seleccionar varias sustancias de superficie sobre la superficie del microorganismo objetivo para inmunizar al animal para generar el anticuerpo monoclonal correspondiente, de acuerdo con lo anterior se ganan muchas clases de imitador de anticuerpo y

mutámero de los mismos que pueden reconocer dicha célula de microorganismo específicamente. Como se muestra en la Figura 3, está disponible para seleccionar en primer lugar cualquiera de estos imitadores de anticuerpo como la primera región de reconocimiento del antibiótico novedoso desarrollado por el método de esta invención. Después de ser utilizado prácticamente durante un periodo de tiempo, si se ha producido en dicho resistencia a fármaco contra dicha región de reconocimiento (por ejemplo, estructura de la sustancia de superficie de reconocimiento (antígeno) se modifica para que se mantenga dicha región de reconocimiento reconocida), está disponible para seleccionar otro de estos imitadores de anticuerpo como la segunda región de reconocimiento, la tercera región de reconocimiento, la cuarta región de reconocimiento..... del antibiótico novedoso desarrollado por el método de esta invención, de acuerdo con lo anterior ofrecer varios antibióticos novedosos opcionales, que superan de forma efectiva la dificultad de fallar para inmediatamente proporcionar el fármaco alternativo para el tratamiento después de la resistencia a fármaco que ocurre contra los antibióticos en la técnica anterior. El método de esta invención es capaz de extender la vida útil de aplicación efectiva de un antibiótico novedoso.

(3) las sustancias de región de reconocimiento proporcionadas en dicha plataforma o método de esta invención comprenden, preferiblemente comprenden el imitador de anticuerpo, y mutámero mediante mutación de punto sobre el péptido corto de dicho imitador de anticuerpo. Por lo tanto, cuando ocurre la mutación sobre el antígeno de superficie del microorganismo patógeno objetivo, ha existido no solo un imitador de anticuerpo candidato que espera reconocer dicho antígeno de superficie, que hace que la capacidad del método de desarrollo de esta invención contrarreste la resistencia a fármaco mejorada adicionalmente, como se muestra en la Figura 4.

(4) Es difícil para el objetivo producir resistencia a fármaco. En el método de esta invención, es preferible seleccionar colicinas como sustancias de región efectora de antibióticos novedosos; el mecanismo bactericida de la colicina es diferente de aquel de la mayoría de los antibióticos actuales, y es bien conocido por los microorganismos patógenos; costará mucho tiempo para que se produzca resistencia a fármaco en los microorganismos patógenos, lo que proporciona mucho tiempo para desarrollar

la siguiente generación de antibióticos.

(5) Por medio de la formación de canal de ión a través de la membrana del objetivo, la colicina tiene fuerte efecto de esterilización que es de forma apropiada cientos de decenas incluso de miles de veces más que el de los antibióticos tradicionales, como la penicilina, cinnematina, vancomicina, estreptomicina, carbapenem, tigeciclina, etc. Como una región efectora del método de esta invención preferida, dará mucho mayor efecto de esterilización a los antibióticos novedosos preparados por el método de esta invención, en comparación con los antibióticos tradicionales.

(6) Diferentes a los métodos tradicionales para detectar antibióticos que consumen mucho tiempo, solo requiere costear 4 a 6 meses para producir una tanda de antibióticos novedosos contra diversos microorganismos patogénicos a través del método de esta invención. Este procedimiento es que, se inmuniza el animal (ratón) utilizando diferentes antígenos; el anticuerpo monoclonal correspondiente se detectará mediante hemostasia después de 2 a 3 semanas del periodo de producción de anticuerpo; las secuencias de nucleótidos que codifican la región variable y estructura principal de la cadena pesada y cadena ligera sobre el segmento de Fab del anticuerpo monoclonal se obtienen al utilizar la secuenciación de proteína y tecnología de traducción de gen; de acuerdo con las secuencias de nucleótidos obtenidas, el gen que codifica la región de reconocimiento – se diseña el imitador de anticuerpo, y se une a la región efectora – el gen que codifica la colicina construye el plásmido recombinante; las bacterias diseñadas por ingeniería se transfectan mediante dicho plásmido recombinante para expresar un antibiótico novedoso mediante proliferación. Después, se verifican la especificidad y sensibilidad de la antibiosis y efecto citocida del antibiótico novedoso separado y purificado. Solo se requiere aproximadamente la mitad de un año para detectar una tanda de antibióticos novedosos por el procedimiento completo. Dicha alta eficiencia de construcción y producción traerá los cambios revolucionarios a la construcción y producción tradicional de antibióticos.

(7) La plataforma de esta invención proporciona el método de trabajo de equipo y el

método de utilización de recursos para desarrollar de forma eficiente antibióticos novedosos. En razón a que los antibióticos desarrollados tienen características estructurales comunes, a través de dicha plataforma de esta invención, los recursos de investigación desarrollo se integran de forma efectiva, y el trabajo de desarrollo se puede realizar como producción de línea de flujo, que iguala a una fábrica de I & D de antibióticos novedosos.

En resumen, el método y sistema de plataforma para desarrollar antibióticos novedosos de esta invención pueden ofrecer antibióticos novedosos con región de reconocimiento específica y región efectora contra la mayoría de los microorganismos patogénicos y objetivos. Para la mayoría de los objetivos, las bacteriocinas conocidas actualmente son competentes como la función de la región efectora, con el fin de que el ciclo de desarrollo de un antibiótico novedoso depende del tiempo para diseñar la estructura molecular y el tiempo para preparar así como también verificar los recombinantes. Debido a que la región de reconocimiento depende no solo de las sustancias naturales seleccionadas sino principalmente depende del imitador de anticuerpo preparado artificialmente como región de reconocimiento, mientras que obtiene el anticuerpo monoclonal a través de inmunizar animales al utilizar un inmunógeno y luego conseguir la secuencia de aminoácidos de dicho anticuerpo monoclonal es una tecnología madura actual, con base en el nivel biotecnológico actual, el tiempo para desarrollar un antibiótico novedoso puede ser controlado básicamente en un corto periodo. La plataforma para operar dicho método de desarrollo de esta invención completamente optimiza, utiliza e integra los recursos humanos y recursos de tecnología, para asegurar el conducto eficiente del proceso de desarrollo y realizar el desarrollo del antibiótico novedoso que opera la producción de línea de flujo.

Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la fórmula general del antibiótico novedoso desarrollado por el método de esta invención:

en donde F es la región efectora; R es la región de reconocimiento.

La Figura 2 muestra la estructura de imitador de anticuerpo.

La Figura 3 muestra la estrategia 1 para construir la región de reconocimiento.

La Figura 4 muestra la estrategia 2 para construir la región de reconocimiento.

La Figura 5 muestra el diagrama de flujo de trabajo de la plataforma, en donde M representa el sistema que propone meta; D representa el sistema de diseño; L representa el sistema de laboratorio; la flecha de doble cabeza representa las formas de intercambio de información durante la preparación de antibióticos novedosos.

La Figura 6 muestra la comparación del efecto de muerte in vitro de los antibióticos novedosos contra el linfoma de Burkitt's inducido por el virus EB.

(A) Grupo de control, (B) grupo tratado por el grupo de antibióticos novedosos 1

La Figura 7 muestra la comparación de las curvas de supervivencia alrededor de la inhibición de antibióticos novedosos preparados por esta invención, la colicina tipo natural y el polipéptido de anti-*Staphylococcus aureus* (ZL 01128836.1) sobre el *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (ATCC BAA-42), *Enterococcus* resistente a vancomicina (ATCC 700802), *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos (cepa aislada clínica 13578 en West China Hospital);

La ordenada representa la concentración inhibidora inmune (nMol);

en donde A es el *Enterococcus* resistente a vancomicina, (1) polipéptido de anti-*Staphylococcus aureus*, MIC = 0.91 nMol, (2) colicina tipo natural Ia, MIC = 0.91 nMol, (3) PMC-AM1, MIC = 0.23 nMol; B es *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, (1) polipéptido de anti-*Staphylococcus aureus*, MIC = 0.06 nMol, (2) colicina tipo natural Ia, MIC = 0.23 nMol, (3) PMC-AM1, MIC = 0.06 nMol; C es *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos, (1) polipéptido de anti-*Staphylococcus aureus*, MIC = 0.91 nMol, (2) colicina tipo natural Ia, MIC = 0.91 nMol, (3) PMC-AM1, MIC = 0.23 nMol.

La Figura 8A muestra los resultados de prueba de la inhibición del polipéptido de anti-cianobacteria contra crecimiento de *Microcystis aeruginosa* en medio líquido; el matraz de la izquierda es el control, y el matraz de la derecha es el polipéptido de anti-cianobacteria de 35 µg/ml.

La Figura 8B muestra resultados de prueba de la inhibición de polipéptido de anti-cianobacteria contra crecimiento de anabaena en medio líquido; el matraz de la izquierda es el control, y el matraz de la derecha es el polipéptido de anti-cianobacteria de 35 µg/ml.

La Figura 8C muestra resultados de prueba de la inhibición de polipéptido de anti-cianobacteria contra crecimiento de *Chlorella* en medio líquido; el matraz de la izquierda es el control, y el matraz de la derecha es el polipéptido de anti-cianobacteria de 35 µg/ml.

La Figura 8D muestra resultados de prueba de la inhibición de polipéptido de anti-cianobacteria contra el crecimiento de *scenedesmus* en medio líquido; el matraz de la izquierda es el control, y el matraz de la derecha es el polipéptido de anti-cianobacteria de 35 µg/ml.

REALIZACIONES

El método y plataforma de esta invención se describirá por los ejemplos de desarrollo completados actualmente.

Ejemplo 1 preparación de antibióticos novedosos contra tumor inducido por virus

(1) determinar objetivos: para determinar los antibióticos novedosos letales contra células tumorales inducidas por el virus EB.

(2) diseñar la estructura molecular de antibióticos novedosos:

se realiza el siguiente trabajo de diseño de acuerdo con la fórmula general



, en donde F es la región efectora; R es la región de reconocimiento.

Establecer la colección de estructura molecular de región de reconocimiento: virus EB que reconoce específicamente anticuerpos monoclonales – anticuerpos de glicoproteína de envoltura de virus EB gp320, es decir, los anticuerpos monoclonales secretados por células de hibridoma ATCC HB-168 y la información de secuencias de aminoácidos de los mismos que han existido en la técnica anterior se encuentra por la investigación en la base de datos.

Con base en dicho anticuerpo monoclonal, los inventores diseñan una serie de imitador de estructuras de anticuerpo como se muestra en la Tabla 1, y obtienen una serie de mutámeros a través de mutación de punto aleatoria en los primeros 5 y los últimos 9 aminoácidos de imitadores de anticuerpo con estructuras enumeradas en la Tabla 1,

Tabla 1 el imitador de estructuras de anticuerpo diseñadas

V _H CDR1-V _H FR2-V _H CDR3
V _L CDR1-V _H FR2-V _L CDR3
V _H CDR1-V _H FR2-V _L CDR3
V _H CDR2-V _H FR2-V _L CDR3
V _L CDR1-V _H FR2-V _H CDR3
V _L CDR2-V _H FR2-V _H CDR3

Establecer la colección de estructura molecular de región efectora: en razón a que la meta de preparación es el antibiótico novedoso letal contra células de tumores inducidas por el virus EB, la colicina pueden formar el canal de ión letal a través de la membrana celular de *Escherichia coli* de la misma especie pero diferentes cepas para por si misma provocar la muerte de la *Escherichia coli* de la misma especie pero

cepas diferentes, y es una sustancia candidata competente para la región efectora. Por lo tanto, las colicinas Ia, Ib, A, B y N o secuencia mutante se seleccionan como sustancias de colección de región efectora y se ofrece al sistema de laboratorio.

Obtener preliminarmente la colección de estructura molecular diseñada de los recombinantes: desde el terminal amino hasta el terminal carboxilo: la colicina o mutámeros de la misma + 28 péptidos imitadores que reconocen la glicoproteína que envuelve el virus EB, y estructuras moleculares de algunos recombinantes se muestran en la Tabla 2:

No.	Molécula de región de reconocimiento	molécula de región efectora	Molécula recombinante (terminal amino - terminal carboxilo)
1	V _H CDR1-V _H FR2-V _H CDR3	Ia	Ia-V _H CDR1-V _H FR2-V _H CDR3
2	V _L CDR1-V _H FR2-V _L CDR3	Ia	Ia-V _L CDR1-V _H FR2-V _L CDR3
3	V _H CDR1-V _H FR2-V _L CDR3	Ia	Ia-V _H CDR1-V _H FR2-V _L CDR3
4	V _H CDR2-V _H FR2-V _L CDR3	Ia	Ia-V _H CDR2-V _H FR2-V _L CDR3
5	V _L CDR1-V _H FR2-V _H CDR3	Ia	Ia-V _L CDR1-V _H FR2-V _H CDR3
6	V _L CDR2-V _H FR2-V _H CDR3	Ia	Ia-V _L CDR2-V _H FR2-V _H CDR3
7	V _H CDR1-V _H FR2-V _H CDR3	mIa (Seq ID No.1)	mIa-V _H CDR1-V _H FR2-V _H CDR3
8	V _L CDR1-V _H FR2-V _L CDR3	mIa	mIa-V _L CDR1-V _H FR2-V _L CDR3
9	V _H CDR1-V _H FR2-V _L CDR3	mIa	mIa-V _H CDR1-V _H FR2-V _L CDR3
10	V _H CDR2-V _H FR2-V _L CDR3	mIa	mIa-V _H CDR2-V _H FR2-V _L CDR3
11	V _L CDR1-V _H FR2-V _H CDR3	mIa	mIa-V _L CDR1-V _H FR2-V _H CDR3
12	V _L CDR2-V _H FR2-V _H CDR3	mIa	mIa-V _L CDR2-V _H FR2-V _H CDR3

Nota* Se conocen los anticuerpos monoclonales secretados por células de hibridoma ATCC HB-168, V_LCDR1, V_LCDR2, V_HCDR1, V_HCDR2 V_HFR2, V_LCDR3, V_HCDR3, colicina Ia y secuencia de aminoácidos de la misma así como también secuencia de nucleótidos de la misma, de acuerdo con lo anterior se puede deducir la secuencia de aminoácidos y secuencia de nucleótidos de los recombinantes, y tomarán demasiado espacio. Por lo cual, dicha información de secuencia no se enumerará en esta descripción.

(3) Sistema de laboratorio: se obtiene la colección recombinante al unir la región efectora proporcionada y la región de reconocimiento; se inserta el gen que codifica dicho recombinante en vector de expresión para obtener el vector de expresión recombinante; una tanda de polipéptidos recombinantes se obtienen al transformar dicho vector de expresión recombinante en bacterias diseñadas por ingeniería.

Se conduce el experimento de verificación anti-objetivo en los recombinantes obtenidos (el método de verificación y diseño experimental son los mismos como se registra en ZL200410081446.8). Los recombinante 3 y 9 en la Tabla 2 tienen el mejor efecto de muerte contra las células de tumores inducidas por el virus EB, y los resultados del experimento de muerte in vitro en linfoma de Burkitt inducido por virus EB se muestran en la Figura 6; otras 9 clases de recombinantes tienen diferentes efectos de muerte contra tumor inducido por virus EB, que son más débiles que los recombinante 3 y 9; no todos los recombinantes tienen efectos secundarios y tóxicos sobre células normales. El proceso experimental de verificación es el mismo como se registra en el ejemplo 2 a 5 del ZL200410081446.8.

Se verifican los recombinantes preparados al tomar los mutantes de imitadores de anticuerpo en los recombinantes 3 y 9 como región de reconocimiento que, en la Tabla 3, los recombinantes con Seq ID No.2~6 como región de reconocimiento tiene básicamente equivalentes de muerte contra las células de tumor inducidas por el virus EB como aquellas del recombinante 3 o 9.

Tabla 3 secuencias de aminoácidos de 28 péptidos imitadores de tumor inducido por virus anti-EB V_HCDR1-V_HFR2-V_LCDR3 y mutámeros de los mismos

NO.	V _H CDR1-V _H FR2-V _L CDR3 y mutantes de péptido de los mismos
Seq ID No.2	SFGMHWVRQAPEKGLEWVAGQGYSYPYT

Seq ID No.3	SYGMHWVRQAPEKGLEWVAGQGYSYPYT
Seq ID No.4	SFGMHWVRQAPEKGLEWVAQQWSSNPYT
Seq ID No.5	SFGMHWVRQAPEKGLEWVALQGTHQPYT
Seq ID No.6	SFGMHWVRQAPEKGLEWVAQQLHFYPHT
Seq ID No.7	RQGMHWVRQAPEKGLEWVAGQGYSYPYT

Toma menos de 6 meses para esta preparación, y se obtiene una tanda de antibióticos novedosos candidatos con efecto de muerte específico contra objetivos de forma exitosa

Los métodos experimentales y materiales adoptados para obtener cada recombinante en este ejemplo son exactamente los mismos como se registra en la Patente No. ZL200410081446.8, excepto para las secuencias de gen insertadas al construir vectores, de tal manera que no se repiten aquí.,

Ejemplo 2 preparaciones de antibióticos novedosos contra diplococcus intracellularis

(1) determinar objetivos: *Diplococcus intracellularis*.

(2) diseñar la estructura molecular de los antibióticos novedosos:
 se realiza el siguiente trabajo de diseño de acuerdo con la fórmula general

F

R

, en donde F es la región efectora; R es la región de reconocimiento.

Establecer la colección de estructura molecular de región de reconocimiento:
 La porina es una proteína de membrana externa que es común en bacterias gram-positivas, como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, bacterias gram-negativas, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Bacillus breslaviensis*,

Serratia marcescens, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Myxococcus*, y *Mycobacterium tuberculosis*; es una proteína de antígeno ideal, y PorA es una clase de porina.

La porina que reconoce específicamente el anticuerpo monoclonal PorA que ha existido en la técnica anterior se encuentra al investigar en base de datos; PUBMED ID de su péptido de cadena pesada es 2MPA_H, y PUBMED ID de su péptido de cadena ligera es 2MPA_L. con base en dicho anticuerpo monoclonal, los inventores diseñan una serie de imitador de anticuerpo estructuras moleculares como se muestra en la Tabla 1 del ejemplo 1.

Establecer la colección de estructura molecular de región efectora: debido a que la meta de preparación es el antibiótico novedoso letal contra *Diplococcus intracellularis*, la colicina es una sustancia candidata competente para la región efectora. Por lo tanto, las colicinas Ia, Ib, A, B y N se seleccionan como sustancias de colección de región efectora, y colicinas Ia, Ib, A, B y N, moléculas de dominio de canal de ión de la misma y las moléculas mutantes de esta constituyen la colección de estructura molecular de región efectora.

La estructura molecular diseñada preliminarmente de la colección recombinante es: desde el terminal amino hasta el terminal carboxilo: la colicina o dominio de canal de ión de la misma o mutámeros de la misma + imitador de anticuerpo anti-PorA y estructuras moleculares de lgunos recombinantes se muestran en la Tabla 4:

NO.	Molécula de región de reconocimiento	molécula de región efectora	Molécula recombinante (terminal amino hasta el terminal carboxilo)
1	V _H CDR1-V _H FR2-V _H CDR3	Ia	Ia-V _H CDR1-V _H FR2-V _H CDR3
2	V _L CDR1-V _H FR2-V _L CDR3	Ia	Ia-V _L CDR1-V _H FR2-V _L CDR3
3	V _H CDR1-V _H FR2-V _L CDR3	Ia	Ia-V _H CDR1-V _H FR2-V _L CDR3
4	V _H CDR2-V _H FR2-V _L CDR3	Ia	Ia-V _H CDR2-V _H FR2-V _L CDR3
5	V _L CDR1-V _H FR2-V _H CDR3	Ia	Ia-V _L CDR1-V _H FR2-V _H CDR3

6	V _L CDR2-V _H FR2-V _H CDR3	Ia	Ia-V _L CDR2-V _H FR2-V _H CDR3
---	--	----	---

Nota* la porina que reconoce específicamente anticuerpos monoclonales PorA, y PUBMED ID de su péptido de cadena pesada es 2MPA_H; PUBMED ID de su péptido de cadena ligera es 2MPA_L, que son todas bien conocidas. Por lo tanto, se conocen el V_LCDR1, V_LCDR2, V_HCDR1, V_HCDR2 V_HFR2, V_LCDR3, V_HCDR3, de acuerdo con la anterior secuencia de aminoácidos y se puede deducir exactamente la secuencia de nucleótidos de moléculas recombinantes. Por lo cual, dicha información de secuencia no se enumerará en esta descripción.

(3) Sistema de laboratorio: se inserta el gen que codifica dicho recombinante en vector de expresión para obtener el vector de expresión recombinante; una tanda de polipéptidos recombinantes se obtienen al transformar dicho vector de expresión recombinante en bacterias diseñadas por ingeniería.

Se lleva a cabo Experimento de verificación anti-objetivo de los recombinantes obtenidos. El experimento de verificación se conduce sobre los efectos de muerte de los recombinantes obtenidos contra la *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos, *Enterococcus* resistente a vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* y *Mycobacterium tuberculosis* (el método de verificación y el diseño experimental son los mismos como se registra en ZL200910092128.4). El Recombinante 3 en la Tabla 4 tiene el mejor efecto de muerte contra dichas bacterias patogénicas; la comparación de curvas de supervivencia acerca de la inhibición de antibióticos novedosos preparados por esta invención sobre *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (ATCC BAA-42), enterococo resistente a vancomicina (ATCC 700802), *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos (cepa aislada clínica 13578 en West China Hospital) se muestra en la Figura 7; otras 5 clases de recombinantes tienen diferentes efectos de muerte contra dichas bacterias resistentes a fármaco, que son más débiles que el recombinante 3; no todos los recombinantes tienen efectos secundarios y tóxicos sobre células normales. El proceso experimental de verificación es el mismo como se registra en el ejemplo 2 a 6 de ZL200910092128.4.

Se verifican los recombinantes preparados al tomar los mutantes de imitadores de anticuerpo en el recombinante 3 como región de reconocimiento y tomando la colicina la como región efectora que, en la Tabla 5, los recombinantes con Seq ID No.9~13 como región de reconocimiento tienen básicamente equivalentes de muerte contra las bacterias patogénicas mencionadas anteriormente como aquellos del recombinante 3.

Tabla 5 secuencias de aminoácidos de imitador de anticuerpo de anti-diplococcus intracellularis V_HCDR1-V_HFR2-V_LCDR3 y mutámeros del mismo

No.	V _H CDR1-V _H FR2-V _L CDR3 y mutantes de péptido de los mismos
Seq ID No.8	SYWLHWIKQRPQGQLWIGSQSTHVPRT
Seq ID No.9	SYGMHWIKQRPQGQLWIGSQSTHVPRT
Seq ID No.10	SYWIEWIKQRPQGQLWIGSQSTHVPRT
Seq ID No.11	NYWMHWIKQRPQGQLWIGSQSTHVPRT
Seq ID No.12	SYWLHWIKQRPQGQLWIGMQNIGLPWT
Seq ID No.13	SYWLHWIKQRPQGQLWIGQQFTSSPYT

Toma menos de 6 meses para esta preparación, y se obtiene con éxito una tanda de antibióticos novedosos candidatos con efecto antibacteriano de amplio espectro.

Los métodos experimentales y materiales adoptados para obtener cada recombinante en este ejemplo son exactamente los mismos como se registra en la Patente No. ZL200910092128.4, excepto para las secuencias de gen insertadas al construir vectores, de tal manera que no se repiten aquí.

Ejemplo 3 Preparación de antibióticos novedosos contra Bacillus anthracis

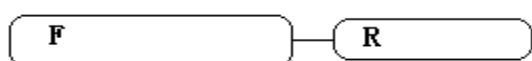
(1) El sistema que propone meta determina la toxina ántrax o *Bacillus anthracis* como objetivos; las enfermedades por infección letal provocadas por toxina ántrax o *Bacillus anthracis* han planteado una gran amenaza contra la salud humana; en los ataques

terroristas, la toxina ántrax también es la toxina o patógeno más horrible como arma.

La meta de esta preparación es proporcionar un antibiótico novedoso para destruir la toxicidad del *Bacillus anthracis* o toxina ántrax, es decir, inhibir o interferir en el antígeno P de toxina ántrax a partir de la formación del heptámero PA activo.

(2) Diseñar antibióticos novedosos:

Se realiza el siguiente trabajo de diseño de acuerdo con la fórmula general



, en donde F es la región efectora; R es la región de reconocimiento.

La característica general de la toxina ántrax es que, toxina ántrax es una toxina binaria con alta nocividad para los organismos, y consiste de antígeno PA de proteína, necrosina y factor de edema (LF/EF); antígeno PA de proteína es una estructura de transporte y puede reconocer células objetivos, y transporta la necrosina y el factor de edema (LF/EF) en células objetivos. Se ilustra mediante experimentos con animales que, una combinación de antígeno de proteína y necrosina inmediatamente pueden llevar a muerte celular, aunque no se provocará ninguna reacción como al aplicar dichos dos componentes de forma separada. El antibiótico novedoso se diseña antes que la región de reconocimiento de dicho antibiótico novedoso pueda reconocer el antígeno PA de ántrax, y la región efectora de dicho antibiótico novedoso pueda inhibir o interferir en el antígeno PA de toxina ántrax a partir de la formación del heptámero PA activo.

Establecer la colección de estructura molecular de región de reconocimiento: antígeno de proteína de anti-*bacillus anthracis* – se encuentran el anticuerpo de complejo de factor letal (NCBI CAL58671) generado en cinomólogo y el anticuerpo de proteína de anti-*bacillus anthracis* (NCBIABF69350) generado en ratón doméstico al investigar la base de datos, y son competentes para reconocer específicamente el antígeno PA de proteína de toxina ántrax. De acuerdo con la información de aminoácido de dichos

anticuerpos, una serie de imitador de estructuras de anticuerpo y mutantes del mismo con una estructura de V_HCDR1-V_HFR2-V_LCDR3 que puede reconocer la toxina ántrax de tipo natural se diseñan para construir la colección de estructura molecular de región de reconocimiento, y proporcionarla al sistema de laboratorio.

Establecer la colección de estructura molecular de región efectora: debido a que la meta de preparación es inhibir al antígeno PA de toxina ántrax a partir de la formación de heptámero PA, de acuerdo con el mecanismo de infección de la toxina ántrax, en este experimento, algunos antígenos PA de toxina ántrax mutantes (véase Seq ID No.10 registrada en ZL200810045212.6) obtenidos mediante mutación artificial en el antígeno PA de toxina ántrax se conducen como miembro de colección de estructura molecular de región efectora, y la capacidad de reconocimiento de pérdida d el receptor correspondiente sobre las células objetivos; dicho antígeno PA mutante de toxina ántrax y antígeno PA de toxina ántrax tipo natural constituyen el heptámero PA heterocigoto, cuya pérdida de actividad de transmembrana completamente o parcialmente, de acuerdo con lo anterior interfiere con la capacidad de infección de la toxina ántrax.

(3) Sistema de laboratorio: se obtiene la colección recombinante al unir la región efectora proporcionada y la región de reconocimiento; se inserta el gen que codifica dicho recombinante en el vector de expresión para obtener el vector de expresión recombinante; una tanda de polipéptidos recombinantes se obtiene al transformar dicho vector de expresión recombinante en bacterias diseñadas por ingeniería.

Una tanda de recombinantes con secuencia de aminoácidos enumerada en la Tabla 6 como región de reconocimiento y antígenos PA de toxina ántrax mutantes (véase Seq ID No.10 registrados en ZL200810045212.6) como región efectora se obtienen a través de verificación, y pueden proteger a los ratones infectados por *Bacillus anthracis*. El experimento de verificación y los resultados del mismo son similares a los efectos del pCHCA-PA1 registrados en ZL200810045212.6.

Tabla 6 secuencias de aminoácidos de imitadores de anticuerpo y mutámeros de los

mismos que reconocen toxina ántrax de tipo natural PA

NO.	V _H CDR1-V _H FR2-V _L CDR3 y sus mutantes de punto
Seq ID No.14	STALHWRQAPGKGLEWVPRYDEFPYT
Seq ID No.15	SFGMHWRQAPGKGLEWVPRYDEFPYT
Seq ID No.16	NYWMHWRQAPGKGLEWVPRYDEFPYT
Seq ID No.17	STALHWRQAPGKGLEWVFQGSHPFT
Seq ID No.18	STALHWRQAPGKGLEWVYCHQWSMYT
Seq ID No.19	STALHWRQAPGKGLEWVQQWSSNPYT
Seq ID No.20	STALHWRQAPGKGLEWVQQFTSSPYT

Toma menos de 6 meses para esta preparación, y se obtiene de forma exitosa una tanda de antibióticos novedosos que tienen efectos de protección contra la infección por bacillus anthracis.

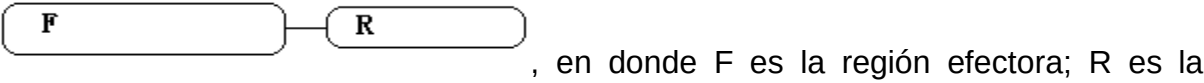
Los métodos experimentales (por ejemplo, construcción de vector, transformación, experimento de verificación, etc.) y materiales adoptados para obtener cada recombinante en este ejemplo son exactamente los mismos como los ejemplos registrados en la Patente No. ZL200810045212.6, excepto para el gen insertado de los antibióticos novedosos, de tal manera que no se repiten aquí.

Ejemplo 4 Preparación de antibióticos novedosos contra hongos

(1) El sistema que propone meta determina la *Candida albicans* como objetivo, Y se determina la meta para preparar antibióticos novedosos que matan hongos agrícolas - *Candida albicans*.

(2) Diseñar antibióticos novedosos:

Se realiza el siguiente trabajo de diseño de acuerdo con la fórmula general



región de reconocimiento.

Establecer la colección de estructura molecular de región de reconocimiento: se ha alcanzado el gran progreso en la investigación básica de hongos en años recientes; la secuencia de aminoácidos (Seq ID No.21) de la feromona de *Candida albicans* consiste de 14 residuos de aminoácidos. Se pueden mover alrededor libremente en medios biológicos, y tiene actividad biológica para investigar automáticamente el receptor correspondiente en membranas celulares de la misma especie de células de hongos. Por lo tanto, con base en dicha actividad de búsqueda automática, está disponible utilizar la feromona fúngica como la región de reconocimiento para inducir a la región efectora como exotoxina bacteriana tal como colicina para matar estos hongos al formar el canal de ión a través de membranas celulares, y se construye una tanda de biocidas biológicos novedosos de acuerdo con lo anterior.

Por lo tanto, la feromona de *Candida albicans* representada por la Seq ID No.21 se selecciona como región de reconocimiento.

Establecer la colección de estructura molecular de región efectora: debido a que la meta de preparación es el antibiótico novedoso letal contra el objetivo de hongos agrícolas- *Candida albicans*, la colicina es una sustancia candidata competente para la región efectora debido a sus características. Por lo tanto, las colicinas Ia, Ib, A, B y N, y dominios de canal de ión de la misma se seleccionan como miembros de colección de estructura molecular de región efectora, y se proporcionan al sistema de laboratorio.

La estructura molecular diseñada preliminarmente del antibiótico novedoso es: desde el terminal amino hasta el terminal carboxilo: la colicina o dominio de canal de ión de la misma o mutámeros de la misma + feromona de *Candida albicans*.

(3) Sistema de laboratorio: se obtiene la colección recombinante al unir la región efectora y región de reconocimiento; se inserta el gen que codifica dicho recombinante en vector de expresión para obtener el vector de expresión

recombinante; los polipéptidos recombinantes se expresan al transformar dicho vector de expresión recombinante en bacterias diseñadas por ingeniería, que realizan unión operable entre la región efectora y la región de reconocimiento.

Se verifica que todos los recombinantes obtenidos, tengan efectos de protección en arroz (*Oryza sativa*) infectado por hongos como *Pyricularia oryzae*, *Aspergillus flavus*, y su efecto de protección en infección del tizón del arroz es miles de veces mayor que aquella del antifúngico agrícola actual.

Los experimentos y datos (por ejemplo, construcción de vector, transformación) relacionados con obtener cada recombinante en esta preparación se registran en los ejemplos de la Patente No. ZL200710050926.1 o con base en el registro en la técnica anterior, el experto en la técnica puede obtener los métodos experimentales requeridos para la preparación de esta invención mediante un número limitado de experimentos, de tal manera que no se repiten aquí.

Se toma 6 meses para esta preparación, y cuesta solo 1.5 a 2 años incluir los experimentos de campo, cuyo índice de éxito y eficiencia son muy superiores que aquellos de la preparación actual para un nuevo fármaco.

Ejemplo 5 Preparación de antibióticos novedosos contra *Staphylococcus aureus* resistente a fármaco

(1) El sistema que propone meta determina el *Staphylococcus aureus* como objetivo: en razón a que los antibióticos como penicilina fueron aplicados en 1944, las bacterias, especialmente las bacterias patógenas que amenazan la vida humana, como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis*, etc., han generado resistencia a fármaco, y para los humanos es urgente desarrollar antibióticos novedosos contra bacterias resistentes a fármaco.

(2) Diseñar antibióticos novedosos:

Se realiza el siguiente trabajo de diseño de acuerdo con la fórmula

general , en donde F es la región efectora; R es la región de reconocimiento.

Establecer la colección de estructura molecular de región de reconocimiento: muchas células secretan polipéptidos de transducción de señal al exterior de las células; estos polipéptidos pueden investigar automáticamente los receptores correspondientes en las membranas celulares de la misma especie de bacterias, y unirse a dichos receptores para transportar información en dichas bacterias; el *Staphylococcus* secreta polipéptidos de transducción de señal al exterior de las células; estos polipéptidos pueden investigar automáticamente los receptores correspondientes en membranas celulares de la misma especie de bacterias, y unirse a dichos receptores para transportar información en dichas bacterias. Estos polipéptidos de transducción de señal consisten de varios a más de 10 aminoácidos, y son regiones de reconocimiento ideales contra *Staphylococcus*. Se recolectan las secuencias de feromona como la Seq ID No.22 a 26 como los miembros de colección de región de reconocimiento a través de búsqueda.

Proporcionar región efectora: debido a que la meta de preparación es el antibiótico novedoso letal contra el objetivo de *Staphylococcus aureus* resistente a fármaco - *Candida albicans*, la colicina es una sustancia candidata competente para la región efectora debido a sus características. Por lo tanto, las colicinas Ia, Ib, A, B y N, y dominios de canal de ión de las mismas se seleccionan como regiones efectoras, y se proporcionan al sistema de laboratorio.

La estructura molecular diseñada preliminarmente del antibiótico novedoso es: desde el terminal amino hasta el terminal carboxilo:

la colicina o dominio de canal de ión de la misma o mutámeros de la misma + feromona, y feromona + colicina o dominio de canal de ión de la misma o mutámeros de la misma.

(3) Sistema de laboratorio: se obtiene la colección recombinante al unir la región efectora y la región de reconocimiento; se inserta el gen que codifica dicho recombinante sintético en el vector de expresión para obtener el vector de expresión recombinante; los polipéptidos recombinantes se expresan al transformar dicho vector de expresión recombinante en bacterias diseñadas por ingeniería, que realizan unión operable entre la región efectora y región de reconocimiento.

Se obtiene una tanda de recombinantes, tal como polipéptido recombinante expresado por los plásmidos recombinantes pBHC-SA1, pBHC-SA2, pBHC-SA3 pBHC-SA4, pBHC-SE y pBHC-PA (según se registra en la Patente No. ZL200910157564.5). todos tienen efectos de muerte significativos contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Staphylococcus aureus* resistente a penicilina, *Enterococcus* resistente a vancomicina, *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos.

Los experimentos y datos (por ejemplo, construcción de vector, transformación) relacionados para obtener cada recombinante es esta preparación se registran en los ejemplos de la Patente No. ZL200910157564.5 o con base en el registro en la técnica anterior, el experto en la técnica puede obtener los métodos experimentales requeridos para la preparación de esta invención mediante un número limitado de experimentos, de tal manera que no se repiten aquí.

Se toma 5 meses preparar una tanda de antibióticos novedosos contra bacterias resistentes a fármaco, cuyo índice de éxito y eficiencia son muy superiores que aquellos de la preparación actual para un nuevo fármaco.

Ejemplo 6. Preparación de antibióticos novedosos contra cianobacterias

(1) el Sistema que propone meta determina las cianobacterias como objetivos: la proliferación de cianobacterias provocadas por eutrofización del agua, contaminación del agua son el daño más severo que amenaza el ambiente acuático en el mundo, y

que resulta en enormes pérdidas económicas al humano, así como provocar daños no reparados a la biosfera de la tierra. A medida que la industrialización y urbanización se acelera provocada por el desarrollo económico de China, la contaminación y la degeneración del medio ambiente ecológico se agravan gradualmente, y el control ecológico del medio acuático ha sido el mayor problema que debemos enfrentar y resolver. Los fármacos antimicrobianos actuales casi tienen pocos efectos en contra de las cianobacterias; la cianobacteria es una célula procariota perteneciente a las cianobacteria, las cuales son un filo del dominio de las bacterias, y sólo las sustancias químicas de los metales pesados pueden controlar las cianobacterias en la actualidad, por ejemplo, el sulfato de cobre. Sin embargo, en la aplicación práctica, debido a los efectos limitados, se requiere utilizar productos químicos con sobredosis de forma repetida, y se destruyen otras algas beneficiosas, plantas acuáticas y organismos acuáticos al matar las cianobacterias, lo que resulta en un daño permanente irreversible al medio ambiente.

El propósito es preparar antibióticos novedosos que maten o inhiban as cianobacterias.}

(2) Diseñar antibióticos novedosos:

Se realiza el siguiente trabajo de diseño de acuerdo con la fórmula general



, en donde F es la región efectora; R es la región de reconocimiento.

Establecer la colección de estructura molecular de región de reconocimiento: una tanda de células de hibridoma que secretan anticuerpos monoclonales de anti-cianobacterias se obtienen al inmunizar ratones con cianobacterias como antígeno, y el depósito No. de una cepa de dichas células de hibridoma es CGMCC No.4783.

Con base en secuencias de aminoácidos de dicho anticuerpos monoclonales

obtenidos al secuenciar, se diseña una tanda de imitadores de anticuerpo, que se muestran en la Tabla 1, y los mutámeros de imitadores de anticuerpo se obtienen a través de mutación de punto aleatoria en los primeros 5 y los últimos 9 aminoácidos de los imitadores de anticuerpo; se construye la colección de estructura molecular de región de reconocimiento al tomar dichas moléculas de imitador de anticuerpo y mutámeros de las mismas como miembros. En donde, la secuencia de aminoácidos de imitador de anticuerpo con una estructura de V_HCDR1-V_HFR2-V_LCDR3 el anticuerpo monoclonal secretado por las células de hibridoma (CGMCC No.4783) se muestran como la Seq ID No.27.

Establecer la colección de estructura molecular de región efectora: debido a que la meta de preparación es antibióticos novedosos que maten o inhiban cianobacterias, la colicina puede formar canal de ión letal a través de la membrana celular de *Escherichia coli* de la misma especie pero cepas diferentes para por si misma provocar la muerte de *Escherichia coli* de la misma especie pero de cepas diferentes, y es una sustancia candidata competente para la región efectora. Por lo tanto, las colicinas Ia, Ib, A, B y N o secuencias mutantes de las mismas se seleccionan como miembros de colección de estructura molecular de región efectora.

Obtener preliminarmente la estructura molecular diseñada de antibióticos novedosos: desde el terminal amino hasta el terminal carboxilo: colicina o mutámeros de la misma + anti-cianobacterias imitador de anticuerpo/mutámeros:

(3) Sistema de laboratorio: se obtiene la estructura molecular de los recombinantes al unir la región efectora y la región de reconocimiento; se inserta el gen que codifica dicho recombinante en vector de expresión para obtener el vector de expresión recombinante; los recombinantes se expresan al transformar dicho vector de expresión recombinante en bacterias diseñadas por ingeniería y aislarlas.

Se revela mediante verificación sobre el efecto de inhibición de los recombinantes obtenidos contra las cianobacterias (el diseño y operación de experimentos de verificación es el mismo como el registrado en los ejemplos 3 a 5 de

ZL201110155221.2), ya que dichos recombinantes tienen efectos de inhibición significativos sobre *Microcystis aeruginosa* y *Anabaena* pero no inhibición sobre otras algas benéficas como *Chlorella*, *Diatomea* y *Scenedesmus*. Algunos resultados experimentales se muestran como la Figura 8A a 8D. Las estructuras moleculares de algunos recombinantes seleccionados se enumeran en la Tabla 7.

Tabla 7 secuencias de aminoácidos de imitadores de anticuerpo y mutámeros contra antígenos de superficie de *Microcystis aeruginosa*

NO.	V _H CDR1-V _H FR2-V _L CDR3 y mutantes de péptido de los mismos
Seq ID No.27	SYWMQWVKQRPGQGLEWIGQQYWSTPPWT
Seq ID No.28	SYGMHWVKQRPGQGLEWIGQQYWSTPPWT
Seq ID No.29	DHYMHWVKQRPGQGLEWIGQQYWSTPPWT
Seq ID No.30	SYWIEWVKQRPGQGLEWIGQQYWSTPPWT
Seq ID No.31	SYWMQWVKQRPGQGLEWIGQQQFTSSPWT
Seq ID No.32	SYWMQWVKQRPGQGLEWIGQQQSREYPYT
Seq ID No.33	SYWMQWVKQRPGQGLEWIGQLQGTHQPYT

Toma menos de 11 meses para esta preparación, y se obtiene de forma exitosa una tanda de antibióticos novedosos verificados que tienen efectos de muerte contra objetivos.

Los métodos experimentales y materiales adoptados para obtener recombinantes en esta preparación son exactamente los mismos como se registra en la Patente No.ZL201110155221.2, excepto para el gen insertado de antibióticos novedosos en la construcción de vector, de tal manera que no se repiten aquí.

Ejemplo 7. Experimentos para detectar sistemas de expresión biológica adecuados para el método de esta invención.

Se obtienen plásmidos recombinantes durante la preparación de antibióticos novedosos registrados en los ejemplos 5 a 6: pBHC-SA1, pBHC-SA2, pBHC-SA3,

pBHC-SA4, pBHC-SE, pBHC-PA y pBHC-PorA1

.

Etapa 1. Transformar células competentes

4040 μ l de varias bacterias diseñadas por ingeniería del sistema pET como BL-21(DE3), B834(DE3), Nova Blue(DE3) y 618 (Novagen) se transfectan por 100 ng de plásmidos mutantes recombinantes respectivamente; se incuban en hielo durante 5 minutos, choque térmico a 42° C durante 30 segundos, bañar en hielo durante 2 minutos, agregar 160 μ l de medio SOC, 220 rpm, se incuba a 37° C al agitar durante 1 hora, y luego se esparce sobre placa (medio LB con 1% de agar y 50 μ g/ml de ampicilina) para incubar a 37° C durante la noche. La colonia monoclonal se selecciona mediante proliferación para conseguir la cepa, y la cepa se conserva a baja temperatura.

Etapa 2. Recuperación de cepa

1. Recuperación de cepa

Dicha cepa conservada se descongela a 4° C; e agrega 1.5 ml de cepa en 10 ml de medio LB (que contiene AMP 50 μ g/ml), 220 rpm, y se incuba a 37° C durante 5 a 8 horas.

2. Inoculación de cepa monoclonal

El líquido de cultivo de la cepa recuperada se diluye a 10⁴ o 10⁵ veces; 10 μ l del líquido de cultivo de cepa diluido se coloca sobre placa de medio sólido LB preparado (AMP 50 μ g/ml) y se esparce. Las placas se colocan en caja húmeda para incubación a 37° C durante 10 a 12 horas hasta que las colonias individuales redondas se elevan sobre la superficie de la placa.

Etapa 3. Selección y proliferación de cepa

(1) La colonia individual redonda regular con borde liso se selecciona por el palillo de dientes esterilizado o bucle de inoculación desde la placa incubada, y se coloca en 1.5 ml de medio LB para cultivo al agitar a 220 rpm y 37° C durante 5 a 8

horas.

(2) 1.5 ml de medio LB se agrega en 100 ml de medio LB para cultivo al agitar a 220 rpm y 37° C durante 5 a 8 horas.

(3) cultivo de amplificación de 1er grado: 100 ml de líquido de cultivo de cepa obtenido de la última etapa se agrega en 700 ml de medio complejo FB-M9 mejorado para cultivo al agitar a 220 rpm y 37° C durante 5 a 8 horas.

(4) cultivo de amplificación de 2do grado: 700 ml de líquido de cultivo de cepa obtenido de la última etapa se agrega en 6×700 ml de medio complejo FB-M9 mejorado para cultivo al agitar a 220 rpm y 37° C durante 5 a 8 horas.

(5) cultivo de amplificación de 3er grado: 6×700 ml de líquido de cultivo de cepa obtenido de la última etapa se agrega en 20 L de medio complejo FB-M9 mejorado para cultivo en fermentador con velocidad de agitación a 220 rpm y contenido de oxígeno máximo, a 37° C durante 3-5 horas.

(6) Fermentación de bacterias diseñadas por ingeniería e inducción de expresión de proteína: 20 L de líquido de cultivo de cepa obtenido de la última etapa se agrega en 200 L de medio complejo FB-M9 mejorado para cultivo y expresión de proteína en fermentador, con velocidad de agitación a 220 rpm y contenido de oxígeno máximo, a 30° C durante 2 a 4 horas; luego a 42° C durante 0.5 horas; finalmente a 37° C durante 1 a 2 horas. Nota: se agrega IPTG con concentración final de 0.5 mM al alcanzar 42° C.

Etapa 4. Colección de cepas por centrifugación

El líquido de cultivo de cepa se centrifuga a 6000 g, 4° C durante 20 minutos. El precipitado se recoge después de centrifugación, y se resuspende en regulador de borato 50 mM (pH 9.0). Nota: 2 mM de PMSF (inhibidor de serina proteasas bencilo de fluoruro de sulfurilo) se agrega en regulador de borato, y se debe conducir la operación después de resuspender el talo a 4° C.

Etapas 5. Fragmentación del talo

Después de que el talo se suspenden en regulador de borato pH 9.0 totalmente, los talos se fragmentan por homogeneizador de alta presión a 500 a 600 bar; la fragmentación se repite durante 7 veces, y se dan 3 a 5 minutos de intervalo entre dos fragmentaciones.

Etapas 6. Precipitación de ADN del talo

El líquido de cultivo de cepa fragmentado se centrifuga a 55000 g, 4° C durante 40 min. Se aísla el sobrenadante, se agrega con sulfato de estreptomicina (16 botellas de sulfato de estreptomicina con 1 millón de unidades se agregan en cada líquido 200 ml), y se agita en un agitador magnético durante 1 h.

Etapas 7. Diálisis

El líquido de cultivo de cepa obtenido por la última etapa se centrifuga a 55000 g, 4° C durante 20 minutos. Se aísla el sobrenadante, se coloca en la bolsa de diálisis, colocada en regulador de borato para la diálisis durante 8 a 12 horas, y el líquido de diálisis se cambia una vez cada 4 horas.

Etapas 8. Medicamentos de polipéptido diseñados por ingeniería antibacterianos obtenido por purificación de proteínas

El líquido de cultivo de cepa después de la diálisis se centrifuga a 55000 g, 4° C durante 20 minutos. El sobrenadante se coloca en un vaso de precipitados para llevar a cabo la purificación de proteínas por el método de intercambio iónico. El sobrenadante se carga en la columna de intercambio iónico CM, y se detecta la concentración de proteína para conteo del contenido de proteína por unidad de volumen; la relación del volumen de carga y de partículas de gel iónicas CM se fija de acuerdo con el manual de operación. Después de que surge a fondo, se obtiene el polipéptido diseñado por ingeniería antibacteriano novedoso a través de elución por regulador de borato 50 mM que contiene NaCl 0.2 M.

Se describe por los resultados que se muestran en la Tabla 8 que, el índice de expresión de PMC-SA en *E. coli* B834 (DE3) es el más alta.

Tabla 8 Comparación de índices de expresión en diferentes cepas (el campo promedio por unidad = producción total del PMC-SA1 extraído/el volumen del líquido de cultivo de cepa)

Cepa diseñada por ingenierías	TG1	BL-21	618	NavaBlue	B834
el campo promedio por unidad (mg/L)	0.8	10	5.8	8.1	24.4

Se conducen la misma operación y comparación en otras 6 clases de plásmidos mutantes recombinantes, y los resultados muestran la misma tendencia como se muestra en la Tabla, es decir, se compara con otras bacterias diseñadas por ingeniería, los índices de expresión de las 7 clases de plásmidos mutantes recombinantes en *E.coli* B834(DE3) son todos los más altos.

Sobre la base de este experimento de detección, es preferible pero no se limita a seleccionar la *E.coli* B834(DE3) como sistema de expresión en el método de esta invención, con el fin de expresar y preparar de forma eficiente para obtener antibióticos novedosos.

En resumen, el método de preparación de antibiótico novedoso y sistema de plataforma de esta invención son capaces de proporcionar antibióticos novedosos con región de reconocimiento y región efectora específicamente contra la mayoría de microorganismos patogénicos y objetivos. Para la mayoría de los objetivos, la colicina actualmente conocida es competente para cumplir la función de región efectora, de tal manera que el tiempo del ciclo para preparar un antibiótico novedoso depende del tiempo para diseñar la estructura molecular, el tiempo para proporcionar información molecular de la región de reconocimiento, así como también el tiempo para preparar y verificar recombinantes. Debido a que la región de reconocimiento depende no solo de las sustancias naturales seleccionadas sino que depende principalmente del imitador de anticuerpo preparado de forma artificial como región de reconocimiento, en vista del nivel biotecnológico actual, el tiempo para preparar un antibiótico novedoso básicamente se puede controlar en un muy corto periodo. La plataforma para operar dicho método de preparación de esta invención optimiza, utiliza e integra

completamente los recursos humanos y los recursos tecnológicos, para asegurar el conducto eficiente del proceso de desarrollo y realizar el desarrollo del antibiótico novedoso que opera como producción de línea de flujo.

Traducción efectuada por HCB
COLO 21271 841 002 1 -Id. 268143

Señor Director

DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES

Superintendencia de Industria y Comercio

E. S. D.

Referencia: Expediente No. 14146333

Asunto: Solicitud de patente para “UN MÉTODO PARA LA
PREPARACIÓN DE UN POLIPÉPTIDO RECOMBINANTE CON
ACTIVIDAD ANTI-BACTERIAL, ANTI-VIRAL Y ANTI-FÚNGICA”

Solicitante: PROTEIN DESIGN LAB, LTD

Fecha de solicitud: 8 Julio del 2014

RESPUESTA A SEGUNDO EXAMEN DE PATENTABILIDAD

ANDRES RINCON USCATEGUI, identificado como aparece al pie de mi firma, en mi condición de apoderado de la sociedad solicitante de la patente de la referencia, doy respuesta al Oficio 4129, notificado por fijación en lista el 23 de Marzo del 2017.

I. MODIFICACIONES AL PLIEGO REIVINDICATORIO Y LA DESCRIPCIÓN

1.1 En respuesta al examen de patentabilidad el solicitante decide aportar un nuevo capítulo reivindicatorio conformado por 06 reivindicaciones en las que se han incluido las siguientes modificaciones:

- Se modificó el preámbulo de la Reivindicación 1 para recitar *“Un método para la preparación de un polipéptido recombinante con actividad anti-bacterial, anti-viral, o anti-fúngica”*
- El término *“imitador de anticuerpo”* se ha modificado por *“anticuerpos mimético”* en la Reivindicación 1
- Se modificó el término *“colección”* por *“librería”*
- Se eliminó el término *“novedoso”* de la Reivindicación 1.

“EXCELENCIA LEGAL EN UN MUNDO SIN FRONTERAS”

BOGOTÁ - Edificio Siski - Carrera 4 No. 72 - 35 - Código Postal 110221 - Tel. (57-1) 347 3611 - Fax (57-1) 211 8650 - Fax in U.S.A: (1-305) 675 7743 - COLOMBIA
MEDELLÍN - San Fernando Plaza - Carrera 42 A No. 1 - 25 - Torre 4 - Oficina 303 - Código Postal 050021 - Tel: (57-4) 520 4760 - COLOMBIA
BARRANQUILLA - Calle 64 No. 50-22 - Código Postal 080002 - Barrio El Prado - Tel. (57-5) 3 51 64 40 - COLOMBIA

- Se eliminaron las Reivindicaciones 2 y 3 en el nuevo Capítulo Reivindicatorio.
- Se reemplazó el término “*piosina*” por el término “*Piocina*” en la nueva Reivindicación 3.
- Se incluyó la siguiente expresión de la Reivindicación 2 “*Cada uno de dichos anticuerpos miméticos es un péptido corto con una estructura de V_HCDR1-V_HFR2-V_LCDR3 del N-terminal al C-terminal el cual está constituido por las regiones de V_HCDR1, V_HFR2, V_LCDR3 sobre el corto brazo Fab de dicha inmunoglobulina*” en la Reivindicación independiente 1
- Se hizo modificación de la expresión “*bacteriocina of Pseudomonas aeruginosa*” por “*Bacteriocina (...) de Pseudomonas aeruginosa*” en la nueva Reivindicación 3.

1.2 En respuesta al examen de patentabilidad el solicitante decide aportar un nuevo capítulo descriptivo en dónde se han incluido las siguientes modificaciones:

- Se hicieron las correcciones respectivas a los términos como “*piosina*” (página 7), los nombres científicos erróneos como “*Acinetobacter bowman*” y sin cursiva ni mayúscula como “*Candida albicans*”, “*Microcystis aeruginosa*”, “*Escherichia coli*”, “*Enterococcus*”, “*Streptococcus pneumonia*”, “*Pyricularia oryzae*”, “*Aspergillus flavus*”, “*Bacillus anthracis*” entre otros (página 1, 2, 7-9, 1-17, 25-41, 45-47) al igual que errores tipográficos como “*eromonas*” o “*phylo*”.
-

Estas modificaciones se ajustan al artículo 34 de la Decisión 486 de 2000 y no constituyen una ampliación de la protección que correspondería a la divulgación contenida en la solicitud inicial.

II. EN CUANTO AL TÍTULO

En vista a la objeción del Examinador, el título cambio de tal forma que sea consistente con la materia divulgada en la solicitud internacional wo2013/083095 con fecha de publicación el 13 de Junio del 2013. A saber, el título fue modificado y ahora lee:

**“UN MÉTODO PARA LA PREPARACIÓN DE UN POLIPÉPTIDO RECOMBINANTE CON ACTIVIDAD
ANTI-BACTERIAL, ANTI-VIRAL Y ANTI-FÚNGICA”**

Por consiguiente considero superada toda objeción referente al título.

III. EN CUANTO A LA SUPUESTA FALTA DE CLARIDAD

3.1 El Examinador argumenta que el Capítulo Reivindicatorio no es claro ni conciso por las siguientes razones:

- La reivindicación 1 no es clara, no es concisa y no está soportada en la descripción porque no se especifican las características de la secuencia lógica de etapas que conforman dicho método, sino que se limita a describir una serie de pasos mediante expresiones ambiguas y resultados a alcanzar, de forma que no es posible comprender la naturaleza del método reclamado ni sus alcances sin remitirse a la descripción. De esta forma se encuentran las siguientes insuficiencias que impiden comprender la materia reclamada y sus límites:

a. El término “*antibiótico*” se reconoce en el estado de la técnica como un agente antibacteriano¹, de forma que se considera que no se encabeza adecuadamente el objeto reclamado. Se sugiere modificar el encabezado por “*polipéptido recombinante con actividad anti-bacterial, anti-viral, o anti-fúngica*”, y caracterizar dicho péptido de acuerdo a su estructura, por ejemplo, incluyendo las características de la reivindicación 2 (VHCDR1-VHFR2-VLCDR3) y las secuencias que lo conforman mediante su SEQ ID No.

b. No se establece la forma en que se lleva a cabo cada etapa del proceso, toda vez que se mencionan únicamente el objetivo de cada uno de los pasos mediante expresiones ambiguas como “*determinar objetivos*”, “*diseñar la estructura molecular*”, “*establecer la colección de estructura molecular de región de reconocimiento*”, “*establecer la colección de estructura molecular de región efectora*”, “*diseñar la colección de estructura molecular*”. Se sugiere establecer de forma concreta la forma en la que se llevan a cabo dichas etapas, por ejemplo, incluyendo las características técnicas de la reivindicación 7.

c. Los términos “*células procarióticas, células eucarióticas, virus o productos de los mismos*”, empleados para determinar el objetivo al que se dirige la molécula producida, son generales y se refieren a una gran variedad de objetivos que no se

encuentran soportados por la descripción, en donde se enseña información concerniente con el desarrollo de proteínas quiméricas con actividad sobre virus EB (Ej. 1), *Diplococcus intracellularis* (Ej. 2), *Bacillus anthracis* (Ej. 3), *Candida albicans* (Ej. 4), *Staphylococcus aureus* resistente a medicamentos (Ej. 5) y cianobacterias (Ej. 6), y se presentan datos relacionados con el efecto obtenido únicamente en los ejemplos 1, 2 y 6. De esta forma, se considera que la reivindicación 1 no se encuentra soportada, toda vez que no es posible extrapolar el resultado obtenido a todas las posibilidades que se encuentran al alcance del método reclamado. Se sugiere limitar la materia reclamada a una razonable generalización del método que ha sido probado, es decir, que se encuentra debidamente sustentado.

d. Las expresiones *“contra los cuales reaccionará directamente”*, *“que genera efectos farmacéuticos a los objetivos”*, *“regular, reparar, etiquetar, provocar la muerte y/o hacer colapsar específicamente contra dichos objetivos”*, *“de tal manera que se obtengan antibióticos novedosos candidatos”*, y *“que reconocen y/o combinan específicamente dichos objetivos”* se refieren a la funcionalidad de cada uno de los elementos estructurales presentes en la molécula recombinante reclamada, los cuales, en ausencia de elementos técnicos estructurales que los definan y limiten de manera concreta, no pueden ser considerados características técnicas esenciales que permitan diferenciar la materia reclamada de aquella que se encuentra en el estado de la técnica.

e. No se definen las características técnicas esenciales de la región efectora, dado que se define únicamente en términos relativos a su funcionalidad. Se sugiere caracterizar estructuralmente dicha región, la cual a la luz de los ejemplos presentados en el capítulo descriptivo corresponde a una colicina (Ej. 1, 2, 4, 5 y 6).

f. No se comprenden las expresiones *“obtener la estructura molecular”*, *“establecer la colección de estructura molecular de región de reconocimiento”*, *“establecer la colección de estructura molecular de región efectora”*, *“que cumplan los requerimientos como la medicina de antibióticos novedosos”*, ya que no se define o establece la forma en la que dichas etapas se llevan a cabo, de esta manera no es posible determinar cómo contribuyen dichas etapas al método que se reclama.

g. El término *“imitador de anticuerpo”* no define en sí mismo las características técnicas esenciales de la región de reconocimiento ya que es un

término ambiguo que no define las características técnicas estructurales de esta región, ya que se refiere a un resultado a alcanzar, este es imitar un anticuerpo. Se sugiere definir la estructura del mismo, de acuerdo a la estructura mencionada en la reivindicación 2, o mediante la secuencia de aminoácidos del mismo (SEQ ID No.) para dar claridad al objeto reclamado.

h. La expresión *“dicho imitador de anticuerpo se diseña de acuerdo con la secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina que específicamente puede reconocer la sustancia única sobre dichos objetivos”* se refiere al anticuerpo o su imitador únicamente en términos de su capacidad de reconocimiento de una serie de objetivos abstractos y por lo tanto no define la estructura de los mismos. Se sugiere definir la estructura del imitador de anticuerpo, de acuerdo a la estructura mencionada en la reivindicación 2, o mediante la secuencia de aminoácidos del mismo (SEQ ID No.).

i. La expresión *“dicha inmunoglobulina se prepara al tomar múltiples sustancias únicas sobre el objetivo como inmunógeno respectivamente para inmunizar al animal”* no es adecuada, en primer lugar, porque hace referencia a un método de tratamiento en animales, en segundo lugar porque de acuerdo al capítulo descriptivo esta no es una etapa del método que se reclama, ya que para la producción de los imitadores de anticuerpo se emplean secuencias de aminoácidos de anticuerpos conocidos previamente en el estado de la técnica, y en tercer lugar, porque no es claro a que se refiere el solicitante al mencionar *“múltiples sustancias”* ya que de acuerdo al capítulo descriptivo los anticuerpos se dirigen a un único antígeno. De esta forma se sugiere la eliminación de dicha expresión del pliego reivindicatorio.

j. Se sugiere eliminar el uso de atributos tales como *“novedosos”*, los cuales, solo por el hecho de ser mencionados no son considerados características técnicas esenciales de la materia reclamada.

k. Se emplean una serie de expresiones de manera repetitiva, las cuales impiden la comprensión de la materia reclamada. Se sugiere eliminar las expresiones repetidas de las etapas que conforman el método y definir las etapas de acuerdo a sus características técnicas esenciales.

- La Reivindicación 2 no es clara porque:

- a. No se definen las características estructurales del imitador de anticuerpo, toda vez que no se mencionan las secuencias de los elementos VHCDR1, VHFR2, VLCDR3, es decir las secuencias de las mismas (SEQ ID No.).
- b. Se hace referencia al brazo Fab de una inmunoglobulina, sin embargo, la mismo no se define previamente, ni se caracteriza estructuralmente. Se sugiere incluir la secuencia de aminoácidos de dicho elemento estructural.
- c. La expresión “*que mantienen la capacidad de reconocimiento para la sustancia única sobre dichos objetivos*” hace referencia a un resultado a alcanzar que no es considerado una característica técnica esencial, puesto que se refiere a un resultado a alcanzar. Se sugiere eliminar las referencias a resultados a alcanzar.

- La Reivindicación 3 no es clara porque:

- a. Se limita a repetir información ya mencionada en la reivindicación 1, de forma que se considera redundante y se sugiere su eliminación del pliegoreivindicatorio.
- b. Por otra parte, como se mencionó previamente, la expresión “para inmunizar al animal” hace referencia a un método de tratamiento en animales, por lo que se encuentra exceptuado de patentabilidad.
- c. Adicionalmente es importante aclarar que, tal como se mencionó en la reivindicación 1, de acuerdo a la descripción la preparación o producción de las inmunoglobulinas (empleadas como base para el diseño de los imitadores de anticuerpo) se encuentra fuera del alcance del método reclamado, toda vez que los anticuerpos se conocen previamente en estado de la técnica (Ej. 1-6). De esta manera se considera que la reivindicación 3 reclama características que no hacen parte del método reclamado y se sugiere una vez más su eliminación.

- La Reivindicación 4 no es concisa porque:

- a. Se refiere a una gran variedad de organismos, para los que no hay sustento en el capítulo descriptivo, en donde se enseña información concerniente con el desarrollo de proteínas quiméricas con actividad sobre virus EB (Ej. 1), *Diplococcus intracellularis* (Ej. 2), *Bacillus anthracis* (Ej. 3), *Candida albicans* (Ej. 4), *Staphylococcus aureus* resistente a medicamentos (Ej. 5) y cianobacterias (Ej. 6), y se presentan datos relacionados con el efecto obtenido únicamente en los ejemplos 1, 2 y 6. Se sugiere limitar la materia reclamada a una razonable

generalización del método que ha sido probado, es decir, que se encuentra debidamente sustentado.

b. Las expresiones “*provocar la muerte*”, “*hacer colapsar*” y “*que puede formar canal de ión o ruta de poro en membranas de bicapa de fosfolípido*” son insuficientes para definir la región efectora, toda vez que se refieren a resultados a alcanzar y no definen las características técnicas estructurales. Se sugiere caracterizar estructuralmente dicha región, la cual a la luz de los ejemplos presentados en el capítulo descriptivo corresponde a una colicina la (Ej. 1, 2, 4, 5 y 6).

- La Reivindicación 5 no es concisa porque:

a. Se encuentra un error en la traducción del término “*pyocin*” puesto que se emplea el término “*piosina*” que es incorrecto, se sugiere reemplazarlo por “*piocina*”.

b. Se encuentra un error de traducción ya que se menciona “*(...) bacteriocina of Pseudomonas aeruginosa*”, se sugiere el reemplazo por “*(...) bacteriocina de Pseudomonas aeruginosa*”.

c. La descripción no soporta la producción de proteínas quiméricas comprendan una piocina de *Pseudomonas aeruginosa*, toda vez ejemplos presentados únicamente evidencian la producción de proteínas quiméricas en las que la región efectora corresponde a una colicina.

- La Reivindicación 6 no es clara porque:

a. No define las características estructurales de las colicinas mencionadas, es decir, las secuencias de aminoácidos de las mismas. Se sugiere incluir dichas características técnicas.

b. La expresión “*que tienen la función de formar canales de ion en dichas membranas de bicapa de fosfolípido*” se refiere a un resultado a alcanzar, que no es considerado una característica técnica esencial. Se sugiere eliminar la referencia a este tipo de resultados.

- La reivindicación 9 no es clara porque los términos “*etiquetar*”, “*etiqueta*”,

“ligar” y *“de forma operable”* no permiten comprender los alcances de la materia reclamada. Se sugiere definir dichos términos empleando para ello características técnicas esenciales correspondientes.

3.2 En primer lugar, respetuosamente llamo la atención del Examinador sobre el capítulo Reivindicatorio modificado adjunto en donde se hicieron las modificaciones necesarias, incluyendo la eliminación de la antigua Reivindicación 2 y 3, para superar las objeciones de claridad y concisión en el capítulo reivindicatorio presentado. Pongo de presente que es necesario revisar las modificaciones hechas en el numeral 1.1 del presente memorial conjunto con el nuevo capítulo reivindicatorio modificado.

3.3 Con respecto a la objeción por parte de la Examinadora sobre los términos *“células procarióticas”, “células eucarióticas”, “virus o productos de los mismos”* (Reivindicación 1) empleados para determinar el objetivo al que se dirige la molécula producida, por ser de carácter general e imprecisos, manifiesto que estoy en desacuerdo con el Examinador debido a que una persona normalmente versada en la materia estaría en capacidad de entender el alcance de dichos términos y no encuentro necesario especificar otros elementos de la invención.

3.4 En relación con los resultados a *“contra los cuales reaccionará directamente”* (Reivindicación 1), *“que genera efectos farmacéuticos a los objetivos”* (Reivindicación 1), *“regular, reparar, etiquetar, provocar la muerte y/o hacer colapsar específicamente contra dichos objetivos”* (Reivindicación antigua 1), *“de tal manera que se obtengan antibióticos novedosos candidatos”,* y *“que reconocen y/o combinan específicamente dichos objetivos”* (Reivindicación 1), *“que mantienen la capacidad de reconocimiento para la sustancia única sobre dichos objetivos”* (Reivindicación antigua 2), *“provocar la muerte”, “hacer colapsar”* y *“que puede formar canal de ión o ruta de poro en membranas de bicapa de fosfolípido”* (antigua Reivindicación 4), *“que tienen la función de formar canales de ion en dichas membranas de bicapa de fosfolípido”* (antigua Reivindicación 6), deseo aclarar que éstos son permitidos de acuerdo con la Guía para Examen de Solicitudes de Patente de Invención y Modelo de Utilidad (Guía de la SIC) siempre y cuando la invención se encuentre debidamente definida por sus características estructurales esenciales.¹ Así las cosas, el método está caracterizado estructuralmente y por consiguiente estas

¹ Guía de la SIC, 2014, Sección 2.6.5.8

características son aceptables de acuerdo con la misma Guía de la SIC. Por lo tanto, las expresiones a las que se refiere el Examinador no solo son aceptables sino que permiten entender con mayor claridad la invención. Adicionalmente, pongo de presente que la antigua Reivindicación 2 se ha eliminado por lo cual toda objeción respecto a esta se encuentra superada.

3.5 En cuanto a la objeción por la gran variedad de organismos en los cuales no hay sustento en el capítulo descriptivo, pongo de presente que el Nuevo Capítulo Reivindicatorio modificado está limitado a por ejemplo, al sistema de expresión de *Escherichia Coli* y la bacteriocina piocina de *Pseudomonas aeruginosa*. Sin embargo, es importante mencionar que en los ejemplos de la descripción se menciona como aunque el ejemplo sea hecho con el objetivo *Diplococcus intracellularis* (ejemplo 2) se menciona como puede ser aplicado en otras bacterias gram negativas como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Bacillus breslaviensis*, *Serratia marcescens*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Myxococcus*, y *Mycobacterium tuberculosis*. Por ende considero superada toda objeción al respecto.

3.6 En cuanto a la objeción sobre la descripción no soporta la producción de proteínas quiméricas comprendan una piocina de *Pseudomonas aeruginosa*, manifiesto que estoy en desacuerdo ya que la descripción soporta como tanto la colicina y las bacteriocinas de *Pseudomonas aeruginosa* pueden ser regiones efectoras (Párrafo 0045).

Con base en todo lo anterior, considero que el Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto cumple con todos los requisitos de claridad y concisión, ajustándose así a los lineamientos del Artículo 30 de la Decisión 486, ya que cualquier persona medianamente versada en la materia está en completa capacidad de reproducir la invención sin ambigüedad alguna.

IV. ESTADO DE LA TÉCNICA

El Examinador determinó tres documentos como relevantes para realizar el análisis de patentabilidad de la presente patente de invención:

El documento D1, cuyo título *“Small antibody mimetics comprising two complementaritydetermining regions and a framework region for tumor targeting”* divulga la producción de una proteína de fusión formada por un anticuerpo mimético, que comprende dos regiones de determinación de complementariedad (CDRs) unidos entre sí por medio de una región marco, y una toxina bacteriana colicina la (Resumen).

El documento D2, cuyo título *“The pyocins of Pseudomonas aeruginosa”*, enseña la relación existente entre las piocinas de *Pseudomonas aeruginosa* y las colicinas (Resumen).

El documento D3, cuyo título *“An interesting design of fusión protein to kill glioma cell line of U-87 MG cells”* la producción de una proteína de fusión formada por un mimético de anticuerpo fusionado con una toxina diftérica, dirigida a la línea celular de glioma U87MG (Resumen).

V. EN CUANTO A LA NOVEDAD

5.1 El Examinador argumenta que la presente invención carece de novedad a la luz de D1 en tanto éste supuestamente presenta todas las características técnicas de la presente invención de acuerdo con la siguiente tabla comparativa que menciona la Reivindicación 1:

Características esenciales	D1
Método para preparar antibiótico	Producción de un péptido de fusión: (Pág. 921, Resumen)
(1) Determinar objetivos: dichos objetivos se refieren a células procarióticas, células eucarióticas, virus o productos de los mismos contra los cuales reaccionará dicho antibiótico	Contra el antígeno de superficie gp350/220 del virus Epstein-Barr (EBV) (Pág. 921, Col. 1, segundo párrafo)

(2) diseñar la estructura molecular de dicho antibiótico: dicha estructura molecular de dicho antibiótico se diseña de acuerdo con la siguiente formula general: F R En donde, R es la región de reconocimiento F es la región efectora Establecer la colección de estructura molecular de región de reconocimiento; Establecer la colección de estructura molecular de región de efectora De acuerdo con dicha fórmula general, diseñar la colección de estructura molecular de región de reconocimiento y colección de estructura molecular de región efectora; El diseño se refiere al proceso de reajuste estructural, recombinación estructural y/o confirmación estructural llevada a cabo sobre la base de estructuras moleculares de sustancias recolectadas, seleccionadas o preparadas utilizadas como región efectora o región de reconocimiento; El establecimiento de la colección de estructura molecular de región de reconocimiento (R) se refiere a preparar de forma artificial sustancias artificiales y obtener la estructura molecular de la misma; Dichas sustancias artificiales se refieren a <u>imitador de anticuerpo</u>, diseñado de acuerdo con la secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina que reconoce la sustancia única sobre los objetivos Dicha inmunoglobulina se prepara al tomar múltiples sustancias únicas del objetivo como inmunógeno para inmunizar al animal	Diseño de moléculas de fusión miméticas a partir de IgG monoclonal contra el antígeno gp350/220 del virus Epstein-Barr (EBV) (Pág. 921, Col. 1, segundo párrafo) Los miméticos tienen la estructura: V_HCDR1-V_HFR2-V_LCDR3 (Pág. 921, Col. 2, segundo párrafo) Union del mimético a un indicador (citotoxina) (Pág. 921, Col. 2, tercer párrafo) Fusion del péptido mimético al extremo C-terminal de la colicina Ia, que mata las células objetivo por medio de la formación de un canal en la membrana celular (Pág. 922, Col. 1, "Results") V_HCDR1-V_HFR2-V_LCDR3 Mimetic peptide (~3 kDa) 1451826 H₂NTranslocationReceptorChannel formingMimeticCOOH 70 kDa conjugate (Pág. 922, Fig. 1a) (Pág. 922, Fig. 1g)
(3) con base en dicha colección de la estructura molecular recombinante, preparar y verificar recombinantes	Preparación de proteínas de fusión que comprenden un mimético de anticuerpo y una colicina (Pág. 927, Col. 1-2, "Methods: Preparation of mimetics and fusion molecules")
(4) detectar antibióticos que cumplan los requisitos como la medicina de antibióticos	Ensayos de toxicidad <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> (Pág. 922, Figura 1f)

De acuerdo con lo anterior y según lo divulgado en D1, El Examinador argumenta que la Reivindicación 1 no es nueva.

Las reivindicaciones dependientes 2-4, 6 y 7 no mencionan alguna característica que haga nuevo el método de la reivindicación 1, por lo cual se considera que no son nuevas.

Adicionalmente, el Examinador argumenta que la presente invención carece de novedad a la luz de D3 en tanto éste supuestamente presenta todas las características técnicas de la presente invención de acuerdo con la siguiente tabla comparativa que menciona la Reivindicación 1:

Características esenciales	D3
Método para preparar antibiótico	Producción de un péptido de fusión: (Pág. 5153, Resumen)
(1) Determinar objetivos: dichos objetivos se refieren a células procarióticas, células eucarióticas, virus o productos de los mismos contra los cuales reaccionará dicho antibiótico	Contra la línea celular de glioma U87MG (Pág. 5153, Resumen)
(2) diseñar la estructura molecular de dicho antibiótico: dicha estructura molecular de dicho antibiótico se diseña de acuerdo con la siguiente fórmula general:  En donde, R es la región de reconocimiento F es la región efectora Establecer la colección de estructura molecular de región de reconocimiento; Establecer la colección de estructura molecular de región de efectora De acuerdo con dicha fórmula general, diseñar la colección de estructura molecular de región de reconocimiento y colección de estructura molecular de región efectora; El diseño se refiere al proceso de reajuste estructural, recombinación estructural y/o confirmación estructural llevada a cabo sobre la base de estructuras moleculares de sustancias recolectadas, seleccionadas o preparadas utilizadas como región efectora o región de reconocimiento; El establecimiento de la colección de estructura molecular de región de reconocimiento (R) se refiere a preparar de forma artificial sustancias artificiales y obtener la estructura molecular de la misma; Dichas sustancias artificiales se refieren a <u>imitador de anticuerpo</u>, diseñado de acuerdo con la secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina que reconoce la sustancia única sobre los objetivos Dicha inmunoglobulina se prepara al tomar múltiples sustancias únicas del objetivo como inmunógeno para inmunizar al animal	Diseño de miméticos a partir de anticuerpo monoclonal humano contra antígeno de superficie de gliomas independiente del ciclo celular de BT32 / A6 (Pág. 5154, Col. 1, tercer párrafo) Los miméticos tienen la estructura: 5aaV_HCDR1-5aa V_HFR2-5aa V_LCDR3₅aa (Pág. 5154, Col. 1, tercer párrafo) Fusión del péptido mimético a los primeros 388 aminoácidos de la toxina diftérica a través de un enlazador GGGS (Pág. 5154, Col. 1, primer párrafo)
(3) con base en dicha colección de la estructura molecular recombinante, preparar y verificar recombinantes	Preparación de proteínas de fusión que comprenden un mimético de anticuerpo y los primeros 388 aminoácidos de la toxina diftérica (Pág. 5154, Col. 1-2, "Preparing the toxin-mimetic fusion peptides DTLMG")
(4) detectar antibióticos que cumplan los requisitos como la medicina de antibióticos	Ensayos de muerte celular (Pág. 5154, Col. 2, "In vitro killing activity of DTLMG fusion peptides")

De acuerdo con lo anterior y según lo divulgado en D3, el Examinador argumenta que la Reivindicación 1 no es nueva.

Las reivindicaciones dependientes 2, 3 y 7 no mencionan alguna característica que haga nuevo el método de la reivindicación 1, por lo cual se considera que no son nuevas.

5.2 En primera instancia, pongo de presente que la referencia citada como D1, todos los anticuerpos miméticos en dicha *“pluralidad de candidatos de anticuerpos miméticos”* están diseñados en base a la misma inmunoglobulina (HB-168 mAB) y puede reconocer una misma sustancia (EB virus) en la célula objetivo. Pero la Reivindicación 1 comprende los pasos de:

Preparar una librería de estructura molecular para dicho polipéptido recombinante, establecer una librería de estructura molecular para la región de reconocimiento y establecer una librería de estructura molecular de una región efectora. *“En donde se establece la librería de estructura molecular y por medio de la preparación de una pluralidad de sustancias artificiales las cuales específicamente reconocen, combinan, o ambas, a dicho objetivo, y obtienen estructuras moleculares del mismo, en donde dichas sustancias artificiales son una pluralidad de anticuerpos miméticos; cada uno de dichos anticuerpos miméticos están diseñados de acuerdo a una secuencia amino acídica de una inmunoglobulina la cual puede reconocer específicamente una única sustancia en dicho objetivo; dicha región de reconocimiento de la librería de estructura molecular comprende una pluralidad de anticuerpos miméticos que son derivados de múltiples inmunoglobulinas que pueden reconocer respectivamente múltiples sustancias únicas sobre dicho objetivo.”*

En la región de reconocimiento de la librería estructural molecular, los anticuerpos miméticos están diseñados en base a la inmunoglobulina que está preparada por medio de tomar múltiples sustancias únicas sobre el objetivo como inmunógenos para inmunizar el animal respectivamente. En otras palabras, la librería de estructural molécula de la región de reconocimiento comprende diferentes tipos de anticuerpos miméticos que fueron diseñados en base a diferentes inmunoglobulinas y pueden reconocer diferentes sustancias en la célula objetivo (referirse al paso (2) y los últimos 2 párrafos de la Reivindicación 1).

El examinador no ha demostrado como D1 enseña o sugiere cada paso reivindicado en la Reivindicación 1. Por ejemplo, el Examinador no ha identificado ninguna enseñanza o sugerencia en el arte previo citado para preparar o establecer librerías de la forma como esta citado en la Reivindicación 1 de la presente invención. De hecho, el Examinador no ha identificado ninguna enseñanza o sugerencia sobre las siguientes líneas del párrafo de la Reivindicación 1 anteriormente mencionado: *“una pluralidad de sustancias artificiales”* y

“dicha región de reconocimiento de la librería de estructura molecular comprende una pluralidad de anticuerpos miméticos que son derivados de múltiples inmunoglobulinas que pueden reconocer respectivamente múltiples sustancias únicas sobre dicho objetivo”. Por consiguiente, para presentar una objeción de novedad, el arte previo citado debe presentar clara y explícitamente todas y cada una de las características esenciales de la invención, las cuales en el presente caso difieren de las divulgaciones de D1 y D3. Así las cosas y por todo lo anterior, considero que la materia reclamada, en la Reivindicación 1 y sus dependientes en la presente invención, es novedosa.

VI. EN CUANTO AL NIVEL INVENTIVO

6.1 La Examinadora considera D1 como el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la Reivindicación 1 porque divulga la producción de polipéptidos de fusión formados por la unión entre un imitador de anticuerpo de estructura VHCDR1-VHFR2- VLCDR3 (dirigido contra el antígeno de superficie gp350/220 del virus Epstein-Barr) y una colicina la (toxina formadora de canal iónico dependiente de voltaje) (Pág. 922, Fig. 1a-1f).

La diferencia entre el diluyente reclamado de acuerdo a la reivindicación 5 y el método divulgado por el documento D1, consiste en que el método de la solicitud menciona la piocina de *Pseudomonas aeruginosa*, mientras que en el documento D1 emplea la colicina la.

No se evidencia un efecto técnico asociado al remplazo del colicina la por piocina de *Pseudomonas aeruginosa* en el método reclamado, dado que los datos mostrados se refieren únicamente a la preparación de proteínas de fusión en los que la región efectora es una colicina la (Ej. 1-6).

Por lo tanto, el problema técnico objetivo que pretende resolver la solicitud en estudio se puede considerar como la necesidad de proporcionar un método para la preparación de proteínas de fusión alternativos a los enseñados en el documento D1.

Sin embargo, las propiedades como formadores de canales en las membranas celulares de las piocinas de *Pseudomonas aeruginosa* y su relación con las colicinas se habían divulgado previamente en el documento D2, el cual se refiere a una descripción de las características de las diferentes piocinas de *Pseudomonas aeruginosa*, el documento D2 señala que las piocinas

S5, que poseen actividad formadora de canales, se relaciona evolutivamente a las colicinas la (Resumen; Pág. 504, Col. 2, "*Comparison of pyocin and colicin amino acids sequences*").

En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia, incluiría una piocina de *Pseudomonas aeruginosa* de acuerdo a lo enseñado en el documento D2, en el método para la preparación de un péptido de fusión del documento D1, llegando así al objeto de la reivindicación 5, por lo que la materia allí reclamada se considera obvia.

Puesto que las reivindicaciones 8 y 9 no mencionan características inventivas adicionales tampoco se pueden considerar inventivas.

6.2 En relación con el nivel inventivo, respetuosamente difiero de la opinión de la Examinadora ya que en términos de efecto, la presente invención se trata de proporcionar una nueva forma de desarrollar un lote de nuevos candidatos de antibióticos contra diferentes objetivos sobre las bacterias patogénicas en un periodo de tiempo corto con el fin de tratar de forma flexible con la varianza en la resistencia a drogas generada por dichas bacterias patogénicas. Por otro lado, distinguir elementos uno por uno no es una manera técnica común para que una persona versada en la materia decida resolver un problema resuelto por la Reivindicación 1. Por consiguiente cuando una persona versada en la materia enfrente un problema técnico que es resuelto por la presente invención, no obtendría ninguna motivación por parte de D1, D2 o D2.

Adicionalmente, pongo de presente que el análisis de nivel inventivo no puede estar basado en la posibilidad del alcance de la invención. En otras palabras, a la fecha de prioridad de la invención reclamada, la persona versada en la materia podría haber llegado al proceso de la presente invención usando técnicas conocidas en el arte previo, ya que como tal, el proceso desarrollado existe. Sin embargo, la consideración pertinente es lo que una persona versada en la materia habría hecho a la fecha de prioridad cuando estuviese motivada por el conocimiento general y el arte previo.

En el presente caso, la simple y desvinculada mención de características en el arte previo no guía inmediatamente a la persona versada en la materia a obtener la invención los efectos específicos logrados. Dichas divulgaciones pueden considerarse como una ligera invitación a hacer investigación y desarrollo en el campo pero no guían de alguna manera

a la persona versada en la materia a obtener de forma inmediata lo reivindicado en la materia.

VII. PETICIÓN

1. Puesto que se ha dado respuesta a todas las objeciones formuladas por la Dirección de Nuevas Creaciones, se solicita proceder al otorgamiento de la solicitud de patente.

VIII. ANEXOS

1. Capítulo Reivindicatorio Modificado conformado por **6** reivindicaciones.
2. Capítulo Descriptivo Modificado;

Señor Director,

ANDRÉS RINCÓN USCÁTEGUI

C.C. 79.780.910 de Bogotá

T.P. 114.908

COLO-21271-0841-0002-1

NRA\NRA\ID-296903\WPC21271

No. M-2017-296903\NRA

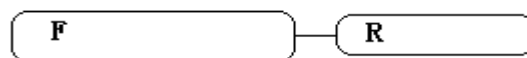
REIVINDICACIONES MODIFICADAS

1. Un método para la preparación de un polipéptido recombinante con actividad anti-bacterial, anti-viral, o anti-fúngica, el cual comprende los siguientes pasos:

(1) determinar un objetivo: dicho objetivo es un virus, célula procariota o célula eucariota con membranas bicapa fosfolipídica como la estructura básica de su membrana celular o la envoltura;

(2) Preparar una librería de estructura molecular para dicho polipéptido recombinante;

En donde dicha estructura molecular de dicho polipéptido recombinante está diseñado de acuerdo a la siguiente fórmula general (I):



en donde, R es una región de reconocimiento, que específicamente reconoce o combina dichos objetivos; F es una región efectora, la cual se refiere a una sustancia bioactiva que genera efectos farmacéuticos a los objetivos, y dichos efectos farmacéuticos son un efecto para regular, reparar, etiquetar, provocar la muerte, colapsando específicamente contra dichos objetivos;

Estableciendo la librería de estructura molecular y por medio de la preparación de una pluralidad de sustancias artificiales las cuales específicamente reconocen, combinan, o ambas, a dicho objetivo, y obtienen estructuras moleculares del mismo, en donde dichas sustancias artificiales son una pluralidad de anticuerpos miméticos; cada uno de dichos anticuerpos miméticos están diseñados de acuerdo a una secuencia amino acídica de una inmunoglobulina la cual puede reconocer específicamente una única sustancia en dicho objetivo; dicha región de reconocimiento de la librería de estructura molecular comprende una pluralidad de anticuerpos miméticos que son derivados de múltiples inmunoglobulinas que pueden reconocer respectivamente múltiples sustancias únicas sobre dicho objetivo;

Establecer la librería de estructura molecular de región efectora, y de acuerdo a la formula (I) anterior, preparar dicha librería de estructura molecular recombinante en base a dicha región de reconocimiento de la librería de

estructura molecular y a la región efector de la librería de estructura molecular;

En donde, la preparación incluye reajustar, recombinar, corroborar o las combinaciones de las mismas, la estructuras moleculares de las sustancias recolectadas, seleccionadas o preparadas como una región efectora o una región de reconocimiento;

(3) Aislar proteínas recombinantes expresadas de dicha pluralidad de vectores de expresión recombinante de tal manera que se obtengan candidatos de polipéptidos recombinante,

(4) Detectar la actividad de los antibióticos de dicho candidato de polipéptido recombinante contra dicho objetivo de dicho polipéptido recombinante;

Cada uno de dichos anticuerpos miméticos es un péptido corto con una estructura de $V_H\text{CDR1}$ - $V_H\text{FR2}$ - $V_L\text{CDR3}$ del N-terminal al C-terminal el cual está constituido por las regiones de $V_H\text{CDR1}$, $V_H\text{FR2}$, $V_L\text{CDR3}$ sobre el corto brazo Fab de dicha inmunoglobulina.

2. El método de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde dicha región efectora se refiere a una sustancia bioactiva la cual puede formar un canal iónico o ruta de poro en membranas de bicapa de fosfolípido.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha región efectora es la bacteriocina piocina de *Pseudomonas aeruginosa*.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha región efectora es colicina E1, Ia, Ib, A, B o N; o dominios de moléculas de colicina E1, Ia, Ib, A, B o N que pueden formar canales de ión en dichas membranas de bicapa de fosfolípido.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde, dicha preparación de recombinante es un gen que codifica dicho polipéptido recombinante en el sistema de expresión biológica para expresar una proteína de fusión, y en donde el antibiótico se obtiene al separar y purificar la proteína de fusión.

6. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde, dicho sistema de expresión es *E.coli* B834 (DE3).

NRA\NRA\ID-501815\WPC21271