

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 840**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00 (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
C07K 14/245 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2010 E 10813369 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2015 EP 2474558**

54 Título: **Nuevo antibiótico que contiene un anticuerpo de simulación, método de preparación y aplicación del mismo**

30 Prioridad:

02.09.2009 CN 200910092128

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.06.2015

73 Titular/es:

**PROTEIN DESIGN LAB, LTD. (100.0%)
East 1000 Meters Qianshajian, Sujiatuo, Haidian
District
Beijing 100095, CN**

72 Inventor/es:

QIU, XIAOQING

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 538 840 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nuevo antibiótico que contiene un anticuerpo de simulación, método de preparación y aplicación del mismo

Campo de la invención

5 La presente invención pertenece al campo de la biología y la medicina, y especialmente se refiere a un antibiótico novedoso que comprende un mimético de anticuerpo, a sus métodos de preparación y a usos del mismo.

Técnica relacionada

10 Desde que empezaron a usarse la penicilina y otros antibióticos en 1944, *Diplococcus meningitides*, y otras bacterias patógenas potencialmente mortales tales como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Neisseria meningitidis* han adquirido resistencia farmacológica. Según informes relativos publicados por el Centro de Control de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos en los últimos años, sería probable que estos antibióticos perdieran su eficacia completamente en 10 ó 20 años.

15 Los presentes antibióticos destruyen bacterias patógenas restringiendo la síntesis de pared celular, restringiendo o interfiriendo con la ruta de síntesis y metabolismo de proteínas y ácido nucleico de la bacteria. Sin embargo, estos métodos de antibiosis es más probable que conduzcan a resistencia farmacológica que resulta de la mutación bacteriana. Por tanto, los científicos se han dedicado a desarrollar antibióticos novedosos. Una de las direcciones comparativamente prometedoras es imitar el mecanismo de interdestrucción entre cepas heterólogas homogéneas para desarrollar antibióticos novedosos. En la naturaleza, varias toxinas bacterianas pueden formar directamente canales iónicos en la citomembrana bacteriana para destruir bacterias. La muestra típica es una clase de toxina bacteriana secretada por *E. coli*, colicina. Una de las ellas es colicina la, descubierta en 1952 por Jacob. Tras
20 esfuerzos de generaciones, en 1996 se dio a conocer la estructura espacial transmembrana de la colicina la cuando se abren canales iónicos así como cuando se cierran en la película bimolecular lipídica artificial (Qiu *et al*, Major transmembrane movement associated with Colicin la channel gating. J. Gen. Physiology, 107: 313-328 (1996)). Esta teoría establecida puso la base para diseñar y preparar antibióticos novedosos a nivel molecular.

25 Tal como se mencionó anteriormente, la colicina es una clase ideal de modelo de antibiótico de canal iónico, pero la colicina silvestre sólo puede actuar sobre cepas heterólogas homogéneas. Debe cambiarse el direccionamiento de la colicina para que pueda actuar sobre otras bacterias patógenas. La porina, una clase de proteína de poro que existe en la membrana externa de las bacterias, las mitocondrias o los cloroplastos, permite que pasen a su través moléculas más grandes. La porina también tiene una inmunogenicidad superior, y puede inducir expresión a alto nivel de anticuerpo monoclonal en células huésped. Debe ser una dirección de desarrollo ideal para la investigación
30 de anticuerpos, si puede diseñarse un mimético de anticuerpo con una mejor capacidad de reconocimiento para cambiar el direccionamiento de la colicina, usando el anticuerpo específico para porinas en la membrana externa de bacterias como el tipo previo del mimético de anticuerpo.

Muthukkaruppan *et al.*, Immunol. Lett. 33 (1992), págs. 201-6 dan a conocer anticuerpos monoclonales contra porinas de *Salmonella* y estudian sus posibles efectos protectores contra la infección por *Salmonella*.

35 El documento WO 2007/083175 da a conocer un polipéptido que comprende un anticuerpo o mimético de anticuerpo y una porina, en el que el anticuerpo es específico para la glicoproteína de la envuelta gp350/220 del virus de Epstein-Barr, y su uso en cáncer asociado a virus. El documento WO 2007/083175 es aparentemente del mismo inventor que la presente solicitud.

Sumario de la invención

40 Para superar los defectos técnicos anteriores y compensar una deficiencia en la técnica, la presente invención proporciona un anticuerpo novedoso. Su capacidad antibacteriana es mil veces más potente que antibióticos regulares. Debido a su mecanismo de acción único, las bacterias patógenas apenas pueden adquirir resistencia farmacológica como resultado de mutación. Y el antibiótico no dañará células humanas normales cuando destruye bacterias patógenas.

45 Realizaciones de la invención son

1. Un antibiótico que comprende un mimético de anticuerpo y una colicina, o que comprende un mimético de anticuerpo y un dominio formador de canal de una colicina, estando el mimético de anticuerpo unido covalentemente al extremo carboxilo del polipéptido de la colicina o el dominio formador de canal de la colicina, en el que la colicina se selecciona del grupo que consiste en colicina E1, la, lb, A, B, N; en el que dicho mimético de anticuerpo se
50 produce fusionando dos regiones determinantes de complementariedad (CDR), V_HCDR₁ y V_LCDR₃ a través de una región de entramado relacionada (V_HFR₂) de una inmunoglobulina; en el que la inmunoglobulina reconoce específicamente porinas bacterianas.

2. El antibiótico según la realización 1, en el que la bacteria es *Neisseria meningitides*, la porina es PorA en la membrana externa de células de *Neisseria meningitidis*.

3. El antibiótico según la realización 2, en el que la inmunoglobulina consiste en un polipéptido de SEQ ID NO: 21 y un polipéptido de SEQ ID NO: 22 unidos covalentemente.
4. El antibiótico según la realización 1 o la realización 2 o la realización 3, en el que la colicina es la.
5. Una molécula peptídica que comprende un mimético de anticuerpo y una colicina, o que comprende un mimético de anticuerpo y un dominio formador de canal de una colicina, estando el mimético de anticuerpo unido covalentemente al extremo carboxilo del polipéptido de la colicina o el dominio formador de canal de la colicina, en el que la colicina se selecciona del grupo que consiste en colicina E1, Ia, Ib, A, B, N; en el que dicho mimético de anticuerpo se produce fusionando dos regiones determinantes de complementariedad (CDR), V_HCDR_1 y V_LCDR_3 a través de una región de entramado relacionada (V_HFR_2) de una inmunoglobulina; en el que la inmunoglobulina reconoce específicamente porinas bacterianas.
6. Una de las moléculas peptídicas de fusión según la realización 5, exponiéndose su secuencia de aminoácidos en SEQ ID NO. 6.
7. Una molécula de ácido nucleico que codifica para una molécula peptídica de fusión presentada en la realización 5 o la realización 6.
8. La molécula de ácido nucleico según la realización 7, exponiéndose su secuencia de nucleótidos en SEQ ID NO. 5.
9. Un plásmido recombinante que contiene una molécula de ácido nucleico según las realizaciones 7 u 8.
10. Un método de preparación de uno cualquiera de los antibióticos presentados en las realizaciones 1-4, transfectándose uno de los plásmidos recombinantes de la realización 9 en un sistema de expresión, y preparándose y purificándose el antibiótico del polipéptido expresado.
11. El antibiótico según una cualquiera de las realizaciones 1-4 para su uso en la preparación de un medicamento antibacteriano.
12. El antibiótico para su uso según la realización 11, en el que el medicamento antibacteriano se usa para destruir *Neisseria meningitidis*, *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina o *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos.
- Un antibiótico novedoso que comprende un mimético de anticuerpo y una colicina, o que comprende un mimético de anticuerpo y un dominio formador de canal de una colicina, estando el mimético de anticuerpo unido covalentemente al extremo carboxilo del polipéptido de la colicina o el dominio formador de canal de la colicina, en el que la colicina se selecciona de un grupo que consiste en colicina E1, Ia, Ib, A, B, N; en el que dicho mimético de anticuerpo se produce fusionando dos regiones determinantes de complementariedad (CDR), V_HCDR_1 y V_LCDR_3 a través de una región de entramado relacionada (V_HFR_2) de una inmunoglobulina; en el que la inmunoglobulina reconoce específicamente porinas bacterianas.
- En el que la bacteria es *Neisseria meningitidis*, la porina es PorA en la membrana externa de células de *Neisseria meningitidis*.
- En el que la inmunoglobulina consiste en dos polipéptidos unidos covalentemente con número de registro de PUBMED 2MPA_H (SEQ ID NO: 21) y número de registro de PUBMED 2MPA_L (SEQ ID NO: 22).
- En el que la colicina es la.
- Una molécula peptídica, que comprende un mimético de anticuerpo y una colicina, o que comprende un mimético de anticuerpo y un dominio formador de canal de una colicina, estando el mimético de anticuerpo unido covalentemente al extremo carboxilo del polipéptido de la colicina o el dominio formador de canal de la colicina, en el que la colicina se selecciona de un grupo que consiste en colicina E1, Ia, Ib, A, B, N; en el que dicho mimético de anticuerpo se produce fusionando dos regiones determinantes de complementariedad (CDR), V_HCDR_1 y V_LCDR_3 a través de una región de entramado relacionada (V_HFR_2) de una inmunoglobulina; en el que la inmunoglobulina reconoce específicamente porinas bacterianas.
- Una de las moléculas peptídicas mencionadas anteriormente, exponiéndose su secuencia de aminoácidos en SEQ ID NO. 6.
- Una molécula de ácido nucleico que codifica para una cualquiera de las moléculas peptídicas mencionadas anteriormente.
- La molécula de ácido nucleico puede tener la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO. 5.
- Plásmidos recombinantes que contienen una cualquiera de las moléculas de ácido nucleico mencionadas anteriormente.

Un método de preparación de uno cualquiera de los antibióticos novedosos mencionados anteriormente, transfectándose uno de los plásmidos recombinantes mencionados anteriormente en un sistema de expresión, y preparándose y purificándose el antibiótico novedoso del polipéptido expresado.

5 Uno cualquiera de los antibióticos novedosos mencionados anteriormente puede usarse para preparar un medicamento antibacteriano.

El medicamento antibacteriano puede usarse para destruir *Neisseria meningitidis*, *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina o *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos.

10 Los antibióticos novedosos de esta invención se basan en el fundamento de la característica de la colicina de formar canales iónicos en la membrana del patógeno diana, lo que provoca que el patógeno pierda su contenido y muera. La estructura de direccionamiento es un mimético de anticuerpo con algunos dominios de una inmunoglobulina que reconoce específicamente proteína porina en el patógeno diana. El mimético de anticuerpo comprende dos regiones determinantes de complementariedad (CDR), V_HCDR_1 y V_LCDR_3 , y una región de entramado relacionada (V_HFR_2) de una inmunoglobulina; las tres regiones forman covalentemente una molécula peptídica lineal como V_HCDR_1 - V_HFR_2 - V_LCDR_3 desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo. Se sabe bien que las regiones activas de una inmunoglobulina para la reacción de reconocimiento se denominan región determinante de complementariedad que sólo tiene aproximadamente de varios a una docena de aminoácidos. El mimético de anticuerpo en el antibiótico novedoso, en comparación con una molécula de anticuerpo natural o cualquier anticuerpo reconstruido artificial presente tal como seFv y Fab, tiene un peso molecular menor, una mejor penetración en el tejido y una estructura más sencilla sin la mayoría de las partes de la estructura de entramado y fragmento Fc de un anticuerpo natural. De este modo puede reducir la reacción inmunitaria en pacientes y guía fácilmente a la colicina contenida en el antibiótico novedoso a tejidos infectados e identifica las bacterias patógenas. En aplicación clínica, el antibiótico novedoso se dirige a la membrana de las bacterias patógenas diana mediante el mimético de anticuerpo contenido, y la colicina contenida forma canales iónicos en la citomembrana bacteriana de las bacterias diana y destruye las bacterias diana conduciendo a la pérdida de su citoplasma. La capacidad antibacteriana del antibiótico novedoso también se aplica a cepas bacterianas con resistencia farmacológica. Los sitios de reconocimiento son propiedades antigénicas únicas en la superficie bacteriana, y no se ubican en la citomembrana humana, de modo que el antibiótico novedoso es seguro para seres humanos. En comparación con otros antibióticos que provocan fácilmente resistencia farmacológica, el antibiótico en esta invención destruye las bacterias patógenas no mediante la porina sino mediante la colicina que actúa sobre la biomembrana de las bacterias patógenas y que forma canales iónicos haciendo que la célula pierda el citoplasma hasta morir. El mimético de anticuerpo para el direccionamiento tan sólo necesita guiar a la colicina hasta las bacterias patógenas. La resistencia farmacológica de las bacterias se adquiere normalmente cambiando la estructura de la porina y creando una barrera para la entrada del antibiótico. El antibiótico en esta invención sólo requiere sitios de reconocimiento de anticuerpo de la porina con el fin de destruir las bacterias patógenas. Los anticuerpos novedosos identifican los sitios de la porina en la membrana de bacterias, pero la colicina del antibiótico novedoso se une a otros sitios y forma canales iónicos haciendo que las bacterias pierdan su contenido hasta morir. Los sitios de acción no son la porina. De este modo no es probable que las bacterias patógenas adquieran resistencia farmacológica al antibiótico novedoso por mutación, evolución, desprendimiento o cambio de la estructura de la porina que es necesaria para la supervivencia. Según este concepto inventivo, el antibiótico novedoso tiene muchas variantes debido a la diversidad de la porina en la superficie bacteriana y la diversidad de la inmunoglobulina que reconoce las porinas.

45 Puesto que la meningitis provocada por *Neisseria meningitidis* amenaza gravemente la salud de lactantes y niños, la resistencia farmacológica de *Neisseria meningitidis* a la medicina común es muy grave. La dosificación es cada vez más alta con el fin de inhibir las bacterias eficazmente, lo cual pone en grave peligro la salud de los pacientes. Por tanto, basándose en el concepto inventivo mencionado anteriormente de esta invención, el inventor reconstruyó y obtuvo un mimético de anticuerpo de un anticuerpo que era específico para la porina A de *Neisseria meningitidis*. El péptido de cadena pesada del anticuerpo tenía un número de registro: 2MPA_H en PubMed Home. El péptido de cadena ligera tenía un número de registro: 2MPA_L en PubMed Home. El mimético de anticuerpo, cuya secuencia de aminoácidos se expone en SEQ ID No. 2, se conectó al extremo C-terminal del péptido de colicina la para constituir un antibiótico novedoso PMC-AM1 con una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID No. 6. Como la curva de supervivencia de ratones mostrada en la figura 7, la tasa de supervivencia de los ratones a los que se les inyectó una dosis letal de *Neisseria meningitidis* en el grupo de PMC-AM1 fue del 90% en 8 días. Mostró que la actividad antibacteriana y el efecto protector *in vivo* de los antibióticos novedosos son superiores a los antibióticos normales actuales tales como penicilina y gentamicina. Mientras tanto, se estableció una prueba comparativa sobre el efecto bactericida para comparar la concentración mínima inhibitoria (valor de CMI) de PMC-AM1, ceftazidima y ampicilina para *Neisseria meningitidis*. Tal como se muestra en la figura 6A, el valor de CMI de PMC-AM1 fue de 0,11 nMol, de ceftazidima fue de 3,02 nMol y de ampicilina fue de 1,35 nMol. Este resultado indicó que la capacidad bactericida de PMC-AM1 es significativamente más potente que los antibióticos usados actualmente para inhibir *Neisseria meningitidis*.

60 En la presente invención, se establecieron algunos experimentos para someter a prueba el efecto bactericida del antibiótico novedoso PMC-AM1 sobre otros patógenos con resistencia farmacológica grave. El resultado mostró que el PMC-AM1 tenía una capacidad antibacteriana extremadamente más fuerte sobre *Pseudomonas aeruginosa*

resistente a múltiples fármacos, *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, tal como se muestra en la figura 5, su actividad antibacteriana sobre *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos fue de 127 a 3800 veces más fuerte que la de ceftazidima, levofloxacin, gentamicina, etc. Y tal como se muestra en la figura 6B y la figura 6C, PMC-AM1 tiene un efecto de inhibición obvio sobre *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

El antibiótico novedoso de esta invención puede usarse para preparar fármacos antibacterianos, especialmente para *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina o *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

Las secuencias de nucleótidos que codifican para los péptidos de los anticuerpos novedosos pueden clonarse en el vector de expresión para construir plásmidos recombinantes, que expresan la proteína de fusión en la célula huésped. La proteína de antibiótico novedoso se aísla de la proteína de fusión expresada.

Según la degeneración de los codones de nucleótidos, los nucleótidos que codifican para el antibiótico de la invención pueden ajustarse. Un experto en la técnica podrá ajustar la secuencia de nucleótidos según la preferencia de las células del huésped por el codón de nucleótidos. Siempre que el polipéptido codificado no cambie, las secuencias de nucleótidos están todavía dentro del alcance del concepto inventivo de esta invención.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la estructura de un plásmido recombinante que comprende el gen del mimético de anticuerpo y el gen de colicina la, denominado en el presente documento pBHC-PorA1.

El péptido del mimético de anticuerpo se une al extremo C-terminal de colicina la, y la secuencia de aminoácidos del mimético de anticuerpo se expone en SEQ ID No. 2.

La figura 2 muestra la estructura del plásmido recombinante que comprende el gen del mimético de anticuerpo y el gen de colicina la, denominado en el presente documento pBHC-PorA2.

El péptido del mimético de anticuerpo se une al extremo C-terminal del péptido de la, y la secuencia de aminoácidos del mimético de anticuerpo se expone en SEQ ID No. 4. En el mimético de anticuerpo, una V_H CDR₁ y una V_L CDR₃ invertida están conectadas a través de una región de entramado de entramado relacionada (V_H FR₂).

La figura 3 ilustra la construcción del antibiótico novedoso.

En la que T y R son dominios de reconocimiento de señal en el extremo N terminal de una colicina la. El formador de canal, un dominio estructural que puede formar canales iónicos, está situado en el extremo C-terminal de la colicina la. El AM es un mimético de anticuerpo.

La figura 4 muestra el resultado del experimento para determinar la capacidad de inhibición del antibiótico novedoso PMC-AM1 frente a *Diplococcus intracellularis*.

En la curva, de izquierda a derecha se muestra el control, ampicilina 5 µg/ml, PMC-AM2 5 µg/ml, PMC-AM1 5 µg/ml, PMC-AM1 10 µg/ml.

El eje de abscisas muestra el tiempo de crecimiento de las bacterias, la unidad son horas; el eje de ordenadas muestra la densidad óptica del medio bacteriano a 600 nm, que indica la cantidad de crecimiento bacteriano.

La figura 5 muestra el valor de concentración mínima inhibitoria (CMI) del antibiótico novedoso sometido a prueba mediante el método de dilución en agar.

Las placas muestran la CMI de los fármacos frente a *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos: Con era el control de blanco, (A) la CMI de ceftazidima era de 16 µg / ml, (B) la CMI de levofloxacin era de 8 µg / ml, (C) la CMI de gentamicina era mayor de 512 µg / ml, (D) la CMI de PMC-AM1 era de 8 µg / ml.

La figura 6 muestra el experimento de comparación de la concentración mínima inhibitoria del antibiótico novedoso de esta invención con los antibióticos comúnmente usados frente a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (ATCC BAA-42), *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina (ATCC 700802), *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos (aislada por el West China Hospital, n.º 13578) y *Neisseria meningitidis* (n.º 29332 del Centro de Conservación de Bacterias en China).

En el que el eje de ordenadas muestra la concentración mínima inhibitoria (nMol);

A muestra el resultado de *Neisseria meningitidis*: (1) PMC-AM1, CMI = 0,11 nMol, (2) ceftazidima, CMI = 3,02 nMol, (3) ampicilina, CMI = 1,35 nMol;

B muestra el resultado de *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina (1) PMC-AM1, CMI = 0,23 nMol, (2) vancomicina, CMI = 21,54 nMol, (3) ampicilina, CMI = 10,78 nMol;

C muestra el resultado para *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina: (1) PMC-AM1, CMI = 0,06 nMol, (2) ampicilina, CMI = 21,55 nMol, (3) oxacilina, CMI =14,1 nMol;

5 D muestra el resultado para *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos: (1) PMC-AM1, CMI=0,91 nMol, (2) levofloxacino, CMI=43,2 nMol, (3) ceftazidima, CMI=29,3 nMol, (4) gentamicina, CMI>889,4 nMol.

10 La figura 7 muestra la curva de supervivencia de la comparación de la inhibición eficaz del antibiótico novedoso, la colicina silvestre y el polipéptido anti-*Staphylococcus aureus* dado a conocer en la patente china ZL 01128836.1 sobre *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (ATCC BAA-42), *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina (ATCC 700802) y *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos (aislada por West China Hospital, n.º 13578).

En el que el eje de ordenadas muestra la concentración mínima inhibitoria (nMol);

A muestra el resultado para *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina: (1) el polipéptido anti-*Staphylococcus aureus*, CMI = 0,91 nMol, (2) la colicina la silvestre, CMI =0,91 nMol, (3) PMC-AM1, CMI = 0,23 nMol;

15 B muestra el resultado para *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina: (1) el polipéptido anti-*Staphylococcus aureus*, CMI = 0,06 nMol, (2) la colicina la silvestre, CMI = 0,23 nMol, (3) PMC-AM1, CMI = 0,06 nMol;

C muestra el resultado para *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos: (1) el polipéptido anti-*Staphylococcus aureus*, CMI = 0,91 nMol, (2) la colicina la silvestre, CMI = 0,91 nMol, (3) PMC-AM1, CMI=0,23 nMol.

20 La figura 8 muestra curvas de supervivencia, que eran el resultado de un experimento *in vivo* de los anticuerpos novedosos para proteger a animales infectados por *Neisseria meningitidis*.

En el que el eje de abscisas muestra el tiempo de supervivencia de ratones, días; el eje de ordenadas muestra el número de supervivencia animal. 1) PMC-AM1; 2) Gen era gentamicina; 3) PEN era penicilina; 4) Con. era el control de blanco. La concentración de inyección de todos los fármacos de prueba es de 1,5 mg/kg (peso del fármaco/peso del ratón).

25 Realizaciones

La invención se ilustra adicionalmente mediante las siguientes realizaciones así como los dibujos.

Realización 1: Construcción de plásmidos que expresan los anticuerpos novedosos y preparación de los anticuerpos novedosos

30 El plásmido original era el plásmido pSELECT™-1 (8,3 kb) con genes de colicina la y proteína de inmunidad. Mediante la tecnología de mutación puntual de oligonucleótidos bicatenarios (kit QuickChange™, Strategene Corporation), se insertó el gen que codifica para el mimético de anticuerpo expuesto en SEQ ID NO. 1 ó 3 en la posición de aminoácido 626 del gen de colicina la. Se construyeron dos plásmidos recombinantes, denominados en el presente documento pBHC-PorA1 y pBHC-PorA2 mostrados en la figura 1 y la figura 2, que se usaron para preparar los anticuerpos novedosos. Se transfectaron respectivamente los plásmidos recombinantes en la bacteria modificada por ingeniería genética *E. coli* BL-21 para expresar los anticuerpos novedosos.

35 El procedimiento de mutación se realizó según el manual del kit de mutagénesis dirigida al sitio Quick Change de Strategene (n.º de catálogo 200518),

1. Se preparó el reactivo de mutación puntual tal como sigue:

5 µl de tampón 10X

40 2 µl (10 ng) de plásmido original pSELECT™-1 con genes de colicina la y proteína de inmunidad.

1,25 µl (125 ng) de cebador oligonucleotídico 5'-3' artificial (véase cebador oligonucleotídico a continuación)

1,25 µl (125 ng) de cebador oligonucleotídico 3'-5' artificial (véase cebador oligonucleotídico a continuación)

1 µl de dNTP

50 µl de agua desionizada

45 1 µl de Pfu

(Todos los fármacos anteriores eran reactivos en el kit médico, excepto el plásmido, el cebador y el agua desionizada).

2. Se realizó la amplificación por PCR con las siguientes condiciones de amplificación: desnaturalizar a 95°C durante 35 segundos, hibridar a 53°C durante 70 segundos, extender a 68°C durante 17 minutos, en total 20 ciclos.
3. Se incorporó 1 µl de endonucleasa Dpn1 para digerir la cadena de ADN original (37°C, 1 h); se colocó 1 µl de producto de digestión en hielo y se incubó con 50 µl de células competentes XL1-Blue durante 30 minutos, se sometieron a choque térmico a 42°C durante 45 segundos y entonces se pusieron en hielo durante 2 minutos;
4. Se añadieron 0,5 ml de medio de cultivo NZY, se agitó la disolución de bacterias (reactivo de la etapa 3, es decir células transformadas a partir de células competentes) a 220 rpm y 37°C durante 1 hora; entonces se tomaron 50-100 µl de reactivo para sembrar sobre una placa con medio (medio de cultivo LB con agar al 1% y ampicilina 50 µg/ml, a 37°C durante la noche);
5. Se recogieron las bacterias tras cultivar durante 18 horas, se extrajo el plásmido y se secuenció para determinar si tenía una mutación satisfactoria;
6. Se colocaron 100 ng de plásmido mutado en hielo y se incubaron con 40 µl de células competentes BL-21 durante 5 minutos, se sometieron a choque térmico a 42°C durante 30 segundos y entonces se colocaron en hielo durante 2 minutos. Se añadieron 160 µl de medio de cultivo SOC; se agitaron las bacterias a 220 rpm, 37°C durante 1 hora y se tomaron para sembrar sobre una placa con medio (medio de cultivo LB con agar al 1%, ampicilina 50 µg/ml, a 37°C cultivando una noche); se recogen colonias monoclonales para reproducir a gran escala;
7. Se reprodujeron las bacterias a gran escala en 8-10 l de medio de cultivo FB, a 250 rpm, 30°C durante 3-4 horas, y se calentaron hasta 42°C a 250 rpm durante 0,5 horas y entonces se enfriaron hasta 37°C a 250 rpm durante 1,5 horas. Se centrifugó el talo a 4°C, 6000 g durante 20 minutos, y entonces se suspendió en 80-100 ml de fluido de tampón de ácido bórico 50 mM (pH 9,0, con EDTA 2 mM) a 4°C. Tras añadirse a 50 µg de PMSF se ultrasonicó el talo a 4°C, 400 W durante 1 minuto y se repitió 4-5 veces con un intervalo de 2-3 minutos para mantener la temperatura de la disolución de bacterias. Se centrifugó a alta velocidad el talo agrietado a 4°C, 75.000 g durante 90 minutos. Se añadieron 5.000.000 de unidades de sulfato de estreptomycinina al sobrenadante para depositar el ADN (agitando a 4°C durante 1 hora). Tras centrifugar a 10000 g, 4°C durante 10 minutos, se cargó el sobrenadante en filtro de bolsa con un peso molecular de 15.000 y se dializó frente a 10 l de fluido de tampón de ácido bórico 50 mM durante la noche a 4°C; entonces se centrifugó de nuevo a 10000 g, 4°C durante 10 minutos. Se cargó el sobrenadante sobre una columna de intercambio iónico CM. Entonces se lavó la columna de intercambio iónico CM meticulosamente y se eluyó el antibiótico novedoso mediante NaCl 0,3 M+fluido de tampón de ácido bórico 50 mM. Correspondientes a las dos clases anteriores de plásmido recombinante, los anticuerpos novedosos se denominaron PMC-AM1 y PMC-AM2 cuyas secuencias de aminoácidos se exponen en SEQ ID No. 6 y SEQ ID No. 8 respectivamente.
- El AM1 era una cadena peptídica que comprendía lo péptidos del primer dominio determinante de complementariedad en la región variable de la cadena pesada, el péptido de la segunda región de marco de la cadena pesada y el péptido del tercer dominio determinante de complementariedad en la región variable de la cadena ligera. Su secuencia de aminoácidos se expuso en SEQ ID No. 2. El AM2 era una cadena peptídica que comprendía el péptido del primer dominio determinante de complementariedad en la región variable de la cadena pesada, el péptido de la segunda región de marco de la cadena pesada y el péptido del tercer dominio determinante de complementariedad invertido en la región variable de la cadena ligera. Su secuencia de aminoácidos se expone en SEQ ID No. 4.
- Se construyó el PMC-AM2 como control del PMC-AM1 para someter a prueba la actividad de los anticuerpos novedosos de la presente invención cuando los dominios que componen el mimético de anticuerpo se conectaron en un orden diferente.
- Las secuencias de oligonucleótidos artificiales para preparar los dos plásmidos de mutación anteriores son respectivamente las siguientes:
- 5'-3' (SEQ ID NO. 9)
gcg aat aag ttc tgg ggt att TCT TAT TGG CTG CAT TGG ATT AAA CAG taa ata aaa tat aag aca ggc
- 3'-5' (SEQ ID NO. 10)
gcc tgt ctt ata ttt tat tta CTG TTT AAT CCA ATG CAG CCA ATA AGA aat acc cca gaa ctt att cgc
- 5'-3' (SEQ ID NO. 11)
tgg ctg cat tgg att aaa cag AGA CCT GGT CAG GGA CTG TGG ATC GGA taa ata aaa tat aag aca ggc
- 3'-5' (SEQ ID NO. 12)
gcc tgt ctt ata ttt tat tta TCC GAT CCA CAG TCC CTG ACC AGG TCT ctg ttt aat cca atg cag cca

5'-3' (SEQ ID NO. 13)

ggt cag gga ctg tgg atc gga TCT CAG TCC ACG CAT GTG CCG AGA ACC taa ata aaa tat aag aca ggc

3'-5' (SEQ ID NO. 14)

gcc tgt ctt ata ttt tat tta GGT TCT CGG CAC ATG CGT GGA CTG AGA tcc gat cca cag tcc ctg acc

5 pBHC-PorA 2

5'-3' (SEQ ID NO. 15)

gcg aat aag ttc tgg ggt att TCT TAT TGG CTG CAT TGG ATT AAA CAG taa ata aaa tat aag aca ggc

3'-5' (SEQ ID NO. 16)

gcc tgt ctt ata ttt tat tta CTG TTT AAT CCA ATG CAG CCA ATA AGA aat acc cca gaa ctt att cgc

10 5'-3' (SEQ ID NO. 17)

tgg ctg cat tgg att aaa cag AGA CCT GGT CAG GGA CTG TGG ATC GGA taa ata aaa tat aag aca ggc

3'-5' (SEQ ID NO. 18)

gcc tgt ctt ata ttt tat tta TCC GAT CCA CAG TCC CTG ACC AGG TCT ctg ttt aat cca atg cag cca

5'-3' (SEQ ID NO. 19)

15 ggt cag gga ctg tgg atc gga ACC AGA CCG GTG CAT ACG TCC CAG TCT taa ata aaa tat aag aca ggc

3'-5' (SEQ ID NO. 20)

gcc tgt ctt ata ttt tat tta AGA CTG GGA CGT ATG CAC CGG TCT GGT tcc gat cca cag tcc ctg acc.

Realización 2: Efecto de inhibición del antibiótico novedoso sobre *Neisseria meningitidis*.

20 Las bacterias eran la cepa n.º 29332 de *Neisseria meningitidis* del Centro de Conservación de Bacterias en China), se añadieron dos microlitros (μl) de disolución de bacterias (10^5 UFC/ml) a 10 ml de medio de sangre de conejo-chocolate (que contenía 50 mg de extracto de ternera, 100 mg de triptona, 50 mg de NaCl, 30 mg de K_2HPO_4 y 0,5-0,8 ml de sangre de conejo desfibrinada). Se prepararon cinco grupos. Al primer grupo como control se le añadieron NaCl 0,3 M + fluido de tampón de ácido bórico 50 mM (es decir fluido conservante de blanco para el antibiótico novedoso, en el mismo volumen que la disolución de antibiótico novedoso en los grupos experimentales). Se añadió penicilina sódica en el segundo grupo en 5 $\mu\text{g/ml}$. Se añadió el antibiótico novedoso PMC-AM1 al tercer grupo en 5 $\mu\text{g/ml}$. Se añadió el antibiótico novedoso PMC-AM2 en el cuarto grupo en 5 $\mu\text{g/ml}$. Se añadió el antibiótico novedoso PMC-AM1 en el quinto grupo en 10 $\mu\text{g/ml}$.

30 Se puso respectivamente el líquido reactivo de los cinco grupos anteriores en un matraz cónico de 100 ml, y se cultivó a 37°C a 200 rpm. Se tomaron muestras de 100 μl de la disolución de cultivo cada hora y se añadieron sobre una placa de ELISA de 96 poros para medir la turbidez bacteriana mediante comparación de color en espectrofotómetro (A595 nm). Se preparó la curva de crecimiento bacteriano para comparar la eficacia bacteriostática de la antibiosis novedosa. El resultado, mostrado en la figura 4, mostró que *Neisseria meningitidis* sólo podía restringirse por PMC-AM1.

35 Realización 3. Experimento de contraste de la concentración mínima inhibitoria del antibiótico novedoso y antibióticos normales sobre *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos.

40 Pruebas de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del antibiótico novedoso mediante el método de dilución en agar. Se inocularon las bacterias sobre la superficie de la placa de agar que contenía diferentes concentraciones de fármacos mediante un instrumento de inoculación en múltiples puntos (Deneley A400). La concentración de bacterias sobre cada punto era de 10^5 UFC/ml. Tras incubar a 37°C durante 18-24 horas, puede observarse el resultado. La menor concentración de fármacos en el medio de siembra en placa sin crecimiento bacteriano era la concentración mínima inhibitoria (CMI) del fármaco frente a dichas bacterias.

La cepa experimental fue *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos que era una cepa clínica aislada (aislada por West China Hospital, n.º 13578) usando medio MH (cada 100 ml contenían 500 mg de extracto de ternera, 1,75 g de hidrolizado ácido de caseína, 150 mg de almidón soluble y 1,7 g de agar).

45 Como resultado mostrado en la figura 5, la CMI del antibiótico novedoso (D) PMC-AM1 sobre *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos fue de 8 $\mu\text{g/ml}$, la de ceftazidima (A) fue de 16 $\mu\text{g/ml}$, la de levofloxacino (B) fue de 8 $\mu\text{g/ml}$ y la de gentamicina (C) fue mayor de 512 $\mu\text{g/ml}$. En cuanto al patrón de peso molecular, la CMI de

PMC-AM1 sobre *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos fue de 0,23 nMol, la de ceftazidima (A) fue de 29,3 nMol, la de levofloxacino fue de 43,2 nMol y la de gentamicina (C) fue mayor de 890 nMol, es decir el efecto antibacteriano de PMC-AM1 sobre *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos fue 127-3800 veces más fuerte que el de ceftazidima, levofloxacino y gentamicina.

- 5 Realización 4. Experimento de contraste de la actividad antibacteriana *in vitro* entre el antibiótico novedoso de esta invención y antibióticos normales.

10 Pruebas de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del antibiótico novedoso mediante el método de dilución en agar. Se inocularon las bacterias sobre la superficie de la placa de agar que contenía diferentes concentraciones de fármacos mediante un instrumento de inoculación en múltiples puntos (Deneley A400). La concentración de bacterias por punto era de 10^5 UFC/ml. Tras incubar a 37°C durante 18-24 horas, puede observarse el resultado. La menor concentración de fármacos en el medio de siembra en placa sin crecimiento bacteriano era la concentración mínima inhibitoria (CMI) del fármaco frente a dichas bacterias.

15 Las cepas experimentales fueron *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos que es una cepa clínica aislada (aislada por West China Hospital, n.º 13578) usando medio MH (cada 100 ml contenían 500 mg de extracto de ternera y 1,75 g de hidrolizado ácido de caseína, 150 mg de almidón soluble, 1,7 g de gelosa), *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (ATCC BAA-42) usando medio BM (cada 100 ml contenían 1 g de triptona, 0,5 g de polvo de levadura, 0,1 g de glucosa, 100 mg de KH_2PO_4 , 1 g de NaCl y 1 g de agar), *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina (ATCC 700802) usando el medio MH; *Neisseria meningitidis* (n.º 29332 del Centro de Conservación de Bacterias en China) usando el mismo medio usado en la realización 2 (al que se le añadieron además 3,9 g de base de agar sangre Columbia).

20 El resultado se muestra en la figura 6, A mostró el resultado de *Neisseria meningitidis*: (1) PMC-AM1, CMI = 0,11 nmol, (2) ceftazidima, CMI = 3,02 nMol, (3) ampicilina, CMI = 1,35 nMol. B mostró el resultado de *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina: (1) PMC-AM1, CMI = 0,23 nMol, (2) vancomicina, CMI = 21,54 nMol, (3) ampicilina, CMI = 10,78 nMol. C mostró el resultado para *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina: (1) PMC-AM1, CMI = 0,06 nMol, (2) ampicilina CMI = 21,55 nMol, (3) oxacilina, CMI = 14,1 nMol. D mostró el resultado para *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos: (1) PMC-AM1, CMI = 0,91 nMol, (2) levofloxacino, CMI = 43,2 nMol, (3) ceftazidima, CMI = 29,3 nMol, (4) gentamicina, CMI > 889,4 nMol.

- 25 Realización 5. Experimentos de contraste de la actividad antibacteriana *in vitro* entre el antibiótico novedoso de esta invención, el polipéptido anti-*Staphylococcus aureus* y colicina la silvestre.

30 Pruebas de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del antibiótico novedoso mediante el método de dilución en agar. La menor concentración de fármacos en el medio de siembra en placa sin crecimiento bacteriano era la concentración mínima inhibitoria (CMI) del fármaco frente a dichas bacterias.

35 Las cepas experimentales fueron *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos (aislada por West China Hospital, n.º 13578), *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (ATCC BAA-42), *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina (ATCC 700802), usando medio MH; *Neisseria meningitidis* (n.º 29332 del Centro de Conservación de Bacterias en China).

40 Los resultados se muestran en la figura 7, A mostró el resultado para *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina: (1) el polipéptido anti-*Staphylococcus aureus*, CMI = 0,91 nmol, (2) la colicina la silvestre, CMI = 0,91 nMol, (3) PMC-AM1, CMI = 0,23 nMol. B mostró el resultado para *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina: (1) el polipéptido anti-*Staphylococcus aureus*, CMI = 0,06 nMol, (2) la colicina la silvestre, CMI = 0,23 nMol, (3) PMC-AM1, CMI = 0,06 nMol. C mostró el resultado para *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos: (1) el polipéptido anti-*Staphylococcus aureus*, CMI = 0,91 nmol, (2) la colicina la silvestre, CMI = 0,91 nMol, (3) PMC-AM1, CMI = 0,23 nMol.

- 45 Realización 6. Experimentos de protección *in vivo* de los anticuerpos novedosos para animales infectados por *Neisseria meningitidis*.

Materiales experimentales

Fármacos: PMC-AM1, gentamicina, ampicilina.

Bacterias experimentales

50 *Neisseria meningitidis* (n.º 29332 del Centro de Conservación de Bacterias en China, es decir el Centro de Dispositivos Médicos del Instituto Nacional para el Control de Productos Farmacéuticos y Biológicos, SDA).

Métodos experimentales

Tal como se muestra en la figura 7, se dividieron 40 ratones en cuatro grupos experimentales, 10 ratones en cada grupo. Se les administró a los ratones una inyección intraperitoneal de disolución en glucosa de hierro a 20 mg/kg, y 1 hora después una inyección intraperitoneal de 0,5 ml de cultivo bacteriano que contenía 1 parte de disolución de

5 cultivo de *Neisseria meningitidis* (su UFC era de $2,36 \times 10^9$ /ml) y 1,5 partes de disolución de levaduras secas al 5%. Una hora tras haber administrado la inyección intraperitoneal de dosis letal del cultivo bacteriano, se les administró a los ratones en el grupo experimental una inyección intravenosa de los fármacos y se les administró a los ratones en el grupo control una inyección intravenosa de solución salina normal, se inyectaron todos los fármacos a 1,5 mg/kg, observación cada 2 horas durante 8 días, la muerte de los ratones como resultados positivos.

En la figura 7, 1. PMC-AM1 significa el antibiótico novedoso obtenido en esta invención; 2. Gen significa gentamicina; 3. PEN significa penicilina; 4. Con. significa control.

Resultados.

10 Como curva de supervivencia mostrada en la figura 7, tras haberse administrado una inyección intraperitoneal de dosis letal de disolución de *Neisseria meningitidis*, 1) todos los ratones en el grupo control murieron en dos días, 2) todos los ratones en el grupo de penicilina murieron en dos días, 3) los ratones en el grupo de gentamicina tuvieron una tasa de supervivencia del 50% en 8 días, 4) los ratones en el grupo de PMC-AM1 tuvieron una tasa de supervivencia del 90% en 8 días.

15 El resultado indica que el antibiótico novedoso PMC-AM1 de la presente invención proporcionó una actividad de protección mayor *in vivo* sobre ratones infectados por una dosis letal de *Neisseria meningitidis* que antibióticos comunes.

Lista de secuencias

<110> Protein Design Lab, Ltd.

20 <120> Anticuerpo novedoso que comprende un mimético de anticuerpo, métodos de preparación y usos del mismo

<130> EP80795HV163pau

25 <140> 10 813 369.5

<141> 27-09-2010

<150> PCT/CN2010/077351

<151> 27-09-2010

30 <150> 200910092128.4

<151> 02-09-2010

<160> 22

35 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 81

<212> ADN

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> La secuencia de nucleótidos del mimético de anticuerpo AM1

45 <400> 1

tcttattggc tgcattggat taaacagaga cctggtcagg gactgtggat cggatctcag 60

tccacgatg tgccgagaac c 81

50 <210> 2

<211> 27

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> La secuencia de nucleótidos del mimético de anticuerpo AM2

<400> 2

ES 2 538 840 T3

atgtctgacc	ctgtacgtat	tacaaatccc	ggtgcagaat	cgctggggta	tgattcagat	60
ggccatgaaa	ttatggccgt	tgatatttat	gtaaaccctc	cacgtgtcga	tgtctttcat	120
ggtacccccg	ctgcatggag	ttccttcggg	aacaaaacca	tctggggcgg	aaacgagtgg	180
gttgatgatt	ccccaacccg	aagtgatatc	gaaaaaaggg	acaaggaaat	cacagcgtac	240
aaaaacacgc	tcagcgcgca	gcagaaagag	aatgagaata	agcgtactga	agccggaaaa	300
cgcctctctg	cggcgattgc	tgcaagggaa	aaagatgaaa	acacactgaa	aacactccgt	360
gccggaaaacg	cagatgccgc	tgatattaca	cgacaggagt	tcagactcct	gcaggcagag	420
ctgagagaat	acggattccg	tactgaaatc	gccggatatg	acgccctccg	gctgcataca	480
gagagccgga	tgctgtttgc	tgatgctgat	tctcttcgta	tatctccccg	ggaggccagg	540
tcgttaatcg	aacaggctga	aaaacggcag	aaggatgcgc	agaacgcaga	caagaaggcc	600
gctgatatgc	ttgctgaata	cgagcgcaga	aaaggtattc	tggacaccgg	gttgtcagag	660
ctggaaaaaa	atggcggggc	agcccttgcc	gttcttgatg	cacaacaggc	ccgtctgctc	720
gggcagcaga	cacggaatga	cagggccatt	tcagaggccc	ggaataaact	cagttcagtg	780
acggaatcgc	ttaacacggc	ccgtaatgca	ttaaccagag	ctgaacaaca	gctgacgcaa	840
cagaaaaaca	cgcctgacgg	caaaacgata	gtttcccctg	aaaaattccc	ggggcgttca	900
tcaacaaatc	attctattgt	tgtgagcgg	gatccgagat	ttgccggtac	gataaaaatc	960
acaaccagcg	cagtcacga	taaccgtgca	aacctgaatt	atcttctgag	ccattccggt	1020

ES 2 538 840 T3

ctggactata aacgcaatat tctgaatgac cggaatccgg tggtagacaga ggatgtggaa 1080
 ggtgacaaga aaatttataa tgctgaagtt gctgaatggg ataagttacg gcaaagattg 1140
 cttgatgcca gaaataaaat cacctctgct gaatctgctg taaattcggc gagaaataac 1200
 ctcagtgcc gaacaaatga gcaaaagcat gcaaatgacg ctcttaatgc cctggtgaag 1260
 gaaaaagaga atatacgtaa ccagctttcc ggcatacaatc agaagatagc ggaagagaaa 1320
 agaaaacagg atgaactgaa ggcaacgaaa gacgcaatta atttcacaac agagttcctg 1380
 aatcagttt cagaaaaata tggtagcaaaa gctgagcagt tagccagaga gatggccggg 1440
 caggctaaag ggaagaaaat acgtaatggt gaagaggcat taaaaacgta tgaaaagtac 1500
 cgggctgaca ttaacaaaaa aattaatgca aaagatcgtg cagcgattgc cgcagccctt 1560
 gagtctgtga agctgtctga tatatcgtct aatctgaaca gattcagtcg gggactggga 1620
 tatgcaggaa aatttacaag tcttgctgac tggatcaactg agtttggtaa ggctgtccgg 1680
 acagagaact ggcgtcctct ttttgtaaa acagaaacca tcatagcagg caatgccgca 1740
 acggctcttg tggcactggt cttcagtatt cttaccggaa gcgctttagg cattatcggg 1800
 tatggtttac tgatggctgt caccggtgct ctgattgatg aatcgcttgt ggaaaagcg 1860
 aataagttct ggggtatttc ttattggctg cattggatta aacagagacc tggtcagggg 1920
 ctgtggatcg gatctcagtc cacgcatgtg ccgagaacc 1959

<210> 6
 <211> 652
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> La secuencia de aminoácidos del anticuerpo PMC-AM1

10

<400> 6

ES 2 538 840 T3

100					105					110					
Asn	Thr	Leu	Lys	Thr	Leu	Arg	Ala	Gly	Asn	Ala	Asp	Ala	Ala	Asp	Ile
		115					120					125			
Thr	Arg	Gln	Glu	Phe	Arg	Leu	Leu	Gln	Ala	Glu	Leu	Arg	Glu	Tyr	Gly
	130					135					140				
Phe	Arg	Thr	Glu	Ile	Ala	Gly	Tyr	Asp	Ala	Leu	Arg	Leu	His	Thr	Glu
145						150					155				160
Ser	Arg	Met	Leu	Phe	Ala	Asp	Ala	Asp	Ser	Leu	Arg	Ile	Ser	Pro	Arg
				165					170					175	
Glu	Ala	Arg	Ser	Leu	Ile	Glu	Gln	Ala	Glu	Lys	Arg	Gln	Lys	Asp	Ala
			180					185					190		
Gln	Asn	Ala	Asp	Lys	Lys	Ala	Ala	Asp	Met	Leu	Ala	Glu	Tyr	Glu	Arg
		195					200					205			
Arg	Lys	Gly	Ile	Leu	Asp	Thr	Arg	Leu	Ser	Glu	Leu	Glu	Lys	Asn	Gly
	210					215					220				
Gly	Ala	Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Asp	Ala	Gln	Gln	Ala	Arg	Leu	Leu	Gly
225						230					235				240
Gln	Gln	Thr	Arg	Asn	Asp	Arg	Ala	Ile	Ser	Glu	Ala	Arg	Asn	Lys	Leu
				245					250					255	
Ser	Ser	Val	Thr	Glu	Ser	Leu	Asn	Thr	Ala	Arg	Asn	Ala	Leu	Thr	Arg
			260					265					270		
Ala	Glu	Gln	Gln	Leu	Thr	Gln	Gln	Lys	Asn	Thr	Pro	Asp	Gly	Lys	Thr
		275					280					285			
Ile	Val	Ser	Pro	Glu	Lys	Phe	Pro	Gly	Arg	Ser	Ser	Thr	Asn	His	Ser
	290					295					300				
Ile	Val	Val	Ser	Gly	Asp	Pro	Arg	Phe	Ala	Gly	Thr	Ile	Lys	Ile	Thr
305						310					315				320
Thr	Ser	Ala	Val	Ile	Asp	Asn	Arg	Ala	Asn	Leu	Asn	Tyr	Leu	Leu	Ser
				325					330					335	
His	Ser	Gly	Leu	Asp	Tyr	Lys	Arg	Asn	Ile	Leu	Asn	Asp	Arg	Asn	Pro
			340					345					350		
Val	Val	Thr	Glu	Asp	Val	Glu	Gly	Asp	Lys	Lys	Ile	Tyr	Asn	Ala	Glu
		355					360					365			
Val	Ala	Glu	Trp	Asp	Lys	Leu	Arg	Gln	Arg	Leu	Leu	Asp	Ala	Arg	Asn
		370				375					380				
Lys	Ile	Thr	Ser	Ala	Glu	Ser	Ala	Val	Asn	Ser	Ala	Arg	Asn	Asn	Leu
385						390					395				400
Ser	Ala	Arg	Thr	Asn	Glu	Gln	Lys	His	Ala	Asn	Asp	Ala	Leu	Asn	Ala
				405					410					415	
Leu	Leu	Lys	Glu	Lys	Glu	Asn	Ile	Arg	Asn	Gln	Leu	Ser	Gly	Ile	Asn
			420					425					430		
Gln	Lys	Ile	Ala	Glu	Glu	Lys	Arg	Lys	Gln	Asp	Glu	Leu	Lys	Ala	Thr

ES 2 538 840 T3

gccggaaacg cagatgccgc tgatattaca cgacaggagt tcagactcct gcaggcagag 420
 ctgagagaat acggattccg tactgaaatc gccggatatg acgccctccg gctgcataca 480
 gagagccgga tgctgtttgc tgatgctgat tctcttcgta tatctccccg ggaggccagg 540
 tcgttaatcg aacaggctga aaaacggcag aaggatgccg agaacgcaga caagaaggcc 600
 gctgatatgc ttgctgaata cgagcgcaga aaaggtattc tggacacccg gttgtcagag 660
 ctggaaaaaa atggcggggc agcccttgcc gttcttgatg cacaacaggc cegtctgctc 720
 gggcagcaga cacggaatga cagggccatt tcagaggccc ggaataaaact cagttcagtg 780
 acggaatcgc ttaacacggc ccgtaatgca ttaaccagag ctgaacaaca gctgacgcaa 840
 cagaaaaaca cgcctgacgg caaaacgata gtttcccctg aaaaattccc ggggcgttca 900
 tcaacaaatc attctattgt tgtgagcggg gatccgagat ttgccggtac gataaaaatc 960
 acaaccagcg cagtcacgca taaccgtgca aacctgaatt atcttctgag ccattccggt 1020
 ctggactata aacgcaatat tctgaatgac cggaatccgg tggtgacaga ggatgtggaa 1080
 ggtgacaaga aaatttataa tgctgaagtt gctgaatggg ataagttacg gcaaagattg 1140
 cttgatgcca gaaataaaat cacctctgct gaatctgagg taaattcggc gagaaataac 1200
 ctcagtgcca gaacaaatga gcaaaagcat gcaaatgacg ctcttaatgc cctggtgaag 1260
 gaaaaagaga atatacgtaa ccagctttcc ggcacatc atcagaatagc ggaagagaaa 1320
 agaaaacagg atgaactgaa ggcaacgaaa gacgcaatta atttcacaac agagttcctg 1380
 aatcagttt cagaaaaata tggtgcaaaa gctgagcagt tagccagaga gatggccggg 1440
 caggctaaag ggaagaaaat acgtaatggt gaagaggcat taaaaacgta tgaaaagtac 1500
 cgggctgaca ttaacaaaaa aattaatgca aaagatcgtg cagcgattgc cgcagccctt 1560
 gagtctgtga agctgtctga tatatcgtct aatctgaaca gattcagtcg gggactggga 1620
 tatgcaggaa aatttacaag tcttgctgac tggatcactg agtttggtaa ggctgtccgg 1680
 acagagaact ggcgtcctct ttttgttaaa acagaaacca tcatagcagg caatgccgca 1740
 acggctcttg tggcactggt cttcagtatt cttaccggaa gcgctttagg cattatcggg 1800
 tatggtttac tgatggctgt caccggtgcg ctgattgatg aatcgcttgt ggaaaaagcg 1860
 aataagttct ggggtatttc ttattggctg cattggatta aacagagacc tggtcagga 1920
 ctgtggatcg gaaccagacc ggtgcatacg tcccagtct 1959

<210> 8
 <211> 652
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>

ES 2 538 840 T3

<223> La secuencia de nucleótidos del anticuerpo PMC-SA2

<400> 8

Ser Asp Pro Val Arg Ile Thr Asn Pro Gly Ala Glu Ser Leu Gly Tyr
1 5 10 15

Asp Ser Asp Gly His Glu Ile Met Ala Val Asp Ile Tyr Val Asn Pro
20 25 30

Pro Arg Val Asp Val Phe His Gly Thr Pro Pro Ala Trp Ser Ser Phe
35 40 45

Gly Asn Lys Thr Ile Trp Gly Gly Asn Glu Trp Val Asp Asp Ser Pro
50 55 60

Thr Arg Ser Asp Ile Glu Lys Arg Asp Lys Glu Ile Thr Ala Tyr Lys
65 70 75 80

Asn Thr Leu Ser Ala Gln Gln Lys Glu Asn Glu Asn Lys Arg Thr Glu
85 90 95

Ala Gly Lys Arg Leu Ser Ala Ala Ile Ala Ala Arg Glu Lys Asp Glu
100 105 110

Asn Thr Leu Lys Thr Leu Arg Ala Gly Asn Ala Asp Ala Ala Asp Ile
115 120 125

Thr Arg Gln Glu Phe Arg Leu Leu Gln Ala Glu Leu Arg Glu Tyr Gly
130 135 140

Phe Arg Thr Glu Ile Ala Gly Tyr Asp Ala Leu Arg Leu His Thr Glu
145 150 155 160

Ser Arg Met Leu Phe Ala Asp Ala Asp Ser Leu Arg Ile Ser Pro Arg
165 170 175

Glu Ala Arg Ser Leu Ile Glu Gln Ala Glu Lys Arg Gln Lys Asp Ala
180 185 190

Gln Asn Ala Asp Lys Lys Ala Ala Asp Met Leu Ala Glu Tyr Glu Arg
195 200 205

Arg Lys Gly Ile Leu Asp Thr Arg Leu Ser Glu Leu Glu Lys Asn Gly
210 215 220

Gly Ala Ala Leu Ala Val Leu Asp Ala Gln Gln Ala Arg Leu Leu Gly
225 230 235 240

Gln Gln Thr Arg Asn Asp Arg Ala Ile Ser Glu Ala Arg Asn Lys Leu
245 250 255

Ser Ser Val Thr Glu Ser Leu Asn Thr Ala Arg Asn Ala Leu Thr Arg
260 265 270

Ala Glu Gln Gln Leu Thr Gln Gln Lys Asn Thr Pro Asp Gly Lys Thr
275 280 285

Ile Val Ser Pro Glu Lys Phe Pro Gly Arg Ser Ser Thr Asn His Ser
290 295 300

Ile Val Val Ser Gly Asp Pro Arg Phe Ala Gly Thr Ile Lys Ile Thr
305 310 315 320

Thr Ser Ala Val Ile Asp Asn Arg Ala Asn Leu Asn Tyr Leu Leu Ser
 325 330 335
 His Ser Gly Leu Asp Tyr Lys Arg Asn Ile Leu Asn Asp Arg Asn Pro
 340 345 350
 Val Val Thr Glu Asp Val Glu Gly Asp Lys Lys Ile Tyr Asn Ala Glu
 355 360 365
 Val Ala Glu Trp Asp Lys Leu Arg Gln Arg Leu Leu Asp Ala Arg Asn
 370 375 380
 Lys Ile Thr Ser Ala Glu Ser Ala Val Asn Ser Ala Arg Asn Asn Leu
 385 390 395 400
 Ser Ala Arg Thr Asn Glu Gln Lys His Ala Asn Asp Ala Leu Asn Ala
 405 410 415
 Leu Leu Lys Glu Lys Glu Asn Ile Arg Asn Gln Leu Ser Gly Ile Asn
 420 425 430
 Gln Lys Ile Ala Glu Glu Lys Arg Lys Gln Asp Glu Leu Lys Ala Thr
 435 440 445
 Lys Asp Ala Ile Asn Phe Thr Thr Glu Phe Leu Lys Ser Val Ser Glu
 450 455 460
 Lys Tyr Gly Ala Lys Ala Glu Gln Leu Ala Arg Glu Met Ala Gly Gln
 465 470 475 480
 Ala Lys Gly Lys Lys Ile Arg Asn Val Glu Glu Ala Leu Lys Thr Tyr
 485 490 495
 Glu Lys Tyr Arg Ala Asp Ile Asn Lys Lys Ile Asn Ala Lys Asp Arg
 500 505 510
 Ala Ala Ile Ala Ala Ala Leu Glu Ser Val Lys Leu Ser Asp Ile Ser
 515 520 525
 Ser Asn Leu Asn Arg Phe Ser Arg Gly Leu Gly Tyr Ala Gly Lys Phe
 530 535 540
 Thr Ser Leu Ala Asp Trp Ile Thr Glu Phe Gly Lys Ala Val Arg Thr
 545 550 555 560
 Glu Asn Trp Arg Pro Leu Phe Val Lys Thr Glu Thr Ile Ile Ala Gly
 565 570 575
 Asn Ala Ala Thr Ala Leu Val Ala Leu Val Phe Ser Ile Leu Thr Gly
 580 585 590
 Ser Ala Leu Gly Ile Ile Gly Tyr Gly Leu Leu Met Ala Val Thr Gly
 595 600 605
 Ala Leu Ile Asp Glu Ser Leu Val Glu Lys Ala Asn Lys Phe Trp Gly
 610 615 620
 Ile Ser Tyr Trp Leu His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 625 630 635 640
 Trp Ile Gly Thr Arg Pro Val His Thr Ser Gln Ser
 645 650

ES 2 538 840 T3

5	<210> 9 <211> 69 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> Secuencia artificial de la construcción del plásmido de mutación pBHC-PorA1, 5'-3'		
10	<400> 9		
	gcgaataagt tctggggtat ttcttattgg ctgcattgga ttaaacagta aataaaatat	60	
	aagacaggc	69	
15	<210> 10 <211> 69 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> Secuencia artificial de la construcción del plásmido de mutación pBHC-PorA1, 3'-5'		
20	<400> 10		
	gcctgtotta tattttattt actgtttaat ccaatgcagc caataagaaa taccccagaa	60	
	cttatttcgc	69	
25	<210> 11 <211> 69 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
30	<220> <223> Secuencia artificial de la construcción del plásmido de mutación pBHC-PorA1, 5'-3'		
	<400> 11		
35	tggtctgatt ggattaaaca gagacctggt caggactgt ggatcggata aataaaatat	60	
	aagacaggc	69	
40	<210> 12 <211> 69 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> Secuencia artificial de la construcción del plásmido de mutación pBHC-PorA1, 3'-5'		
45	<400> 12		
	gcctgtotta tattttattt atccgatcca cagtcctga ccaggtctct gttaaatcca	60	
	atgcagcca	69	
50	<210> 13 <211> 69 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
55	<220>		

ES 2 538 840 T3

	<223> Secuencia artificial de la construcción del plásmido de mutación pBHC-PorA1, 3'-5'	
	<400> 13	
	ggtcagggac tgtggatcgg atctcagtcc acgcatgtgc cgagaaccta aataaaatat	60
5	aagacaggc	69
	<210> 14	
	<211> 69	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia artificial de la construcción del plásmido de mutación pBHC-PorA1, 3'-5'	
15	<400> 14	
	gcctgtctta tattttattt aggttctcgg cacatgcgtg gactgagatc cgatccacag	60
	tccctgacc	69
	<210> 15	
20	<211> 69	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Secuencia artificial de la construcción del plásmido de mutación pBHC-PorA2, 5'-3'	
	<400> 15	
	gcgaataagt tctggggtat ttcttattgg ctgcattgga ttaaacagta aataaaatat	60
	aagacaggc	69
30	<210> 16	
	<211> 69	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Secuencia artificial de la construcción del plásmido de mutación pBHC-PorA2, 3'-5'	
	<400> 16	
40	gcctgtctta tattttattt actgtttaat ccaatgcagc caataagaaa taccocagaa	60
	cttattcgc	69
	<210> 17	
	<211> 69	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia artificial de la construcción del plásmido de mutación pBHC-PorA2, 5'-3'	
50	<400> 17	
	tggctgcatt ggattaaaca gagacctggt cagggactgt ggatcggata aataaaatat	60
	aagacaggc	69

ES 2 538 840 T3

<210> 18
 <211> 69
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia artificial de la construcción del plásmido de mutación pBHC-PorA2, 3'-5'
 10 <400> 18

gcctgtctta tattttattt atccgatcca cagtcacctga ccaggtctct gtttaatcca 60
atgcagcca 69

 <210> 19
 <211> 69
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia artificial de la construcción del plásmido de mutación pBHC-PorA2, 5'-3'
 20 <400> 19

ggtcaggac tgtggatcgg aaccagaccg gtgcatacgt cccagtctta aataaaatat 60
aagacaggc 69

 <210> 20
 <211> 69
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia artificial de la construcción del plásmido de mutación pBHC-PorA2, 3'-5'
 30 <400> 20

gcctgtctta tattttattt aagactggga cgtatgcacc ggtctggttc cgatccacag 60
tcctgacc 69

 <210> 21
 <211> 225
 <212> PRT
 40 <213> *Mus musculus*

 <300>
 <308> N.º de registro de PUBMED 2MPA_H
 45 <309> 09-06-1999

 <400> 21

Glu Val Asn Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Arg Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Trp Leu His Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Gly Ile Tyr Pro Gly Asn Arg Asp Thr Arg Tyr Thr Gln Arg Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ser Ile Ile Tyr Phe Asp Tyr Ala Asp Phe Ile Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser
 115 120 125

Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val
 130 135 140

Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu
 145 150 155 160

Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr
 180 185 190

Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro
 195 200 205

Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr
 210 215 220

Ile
 225

<210> 22
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<300>
 <308> N.º de registro de PUBMED 2MPA_L
 <309> 09-06-1999

10

<400> 22
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Lys Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ala Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Phe Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 Thr His Val Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125
 Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
 145 150 155 160
 Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
 180 185 190
 Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
 195 200 205
 Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210 215

REIVINDICACIONES

1. Antibiótico que comprende un mimético de anticuerpo y una colicina, o que comprende un mimético de anticuerpo y un dominio formador de canal de una colicina, estando el mimético de anticuerpo unido covalentemente al extremo carboxilo del polipéptido de la colicina o el dominio formador de canal de la colicina, en el que la colicina se selecciona del grupo que consiste en colicina E1, Ia, Ib, A, B, N; en el que dicho mimético de anticuerpo se produce fusionando dos regiones determinantes de complementariedad (CDR), V_H CDR₁ y V_L CDR₃ a través de una región de entramado relacionada V_H FR₂ de una inmunoglobulina; en el que el mimético de anticuerpo reconoce específicamente porinas bacterianas.
2. Antibiótico según la reivindicación 1, en el que la bacteria es *Neisseria meningitides*, la porina es PorA en la membrana externa de células de *Neisseria meningitidis*.
3. Antibiótico según la reivindicación 2, en el que la inmunoglobulina consiste en un polipéptido de SEQ ID NO: 21 y un polipéptido de SEQ ID NO: 22 unidos covalentemente.
4. Antibiótico según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en el que la colicina es la.
5. Molécula peptídica que comprende un mimético de anticuerpo y una colicina, o que comprende un mimético de anticuerpo y un dominio formador de canal de una colicina, estando el mimético de anticuerpo unido covalentemente al extremo carboxilo del polipéptido de la colicina o el dominio formador de canal de la colicina, en el que la colicina se selecciona del grupo que consiste en colicina E1, Ia, Ib, A, B, N; en el que dicho mimético de anticuerpo se produce fusionando dos regiones determinantes de complementariedad (CDR), V_H CDR₁ y V_L CDR₃ a través de una región de entramado relacionada (V_H FR₂) de una inmunoglobulina; en el que la inmunoglobulina reconoce específicamente porinas bacterianas.
6. Una de las moléculas peptídicas de fusión según la reivindicación 5, exponiéndose su secuencia de aminoácidos en SEQ ID NO. 6.
7. Molécula de ácido nucleico que codifica para una molécula peptídica de fusión según la reivindicación 5 o la reivindicación 6.
8. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 7, exponiéndose su secuencia de nucleótidos en SEQ ID NO. 5.
9. Plásmido recombinante que contiene una molécula de ácido nucleico según las reivindicaciones 7 u 8.
10. Método de preparación de uno cualquiera de los antibióticos reivindicados en las reivindicaciones 1-4, transfectándose uno de los plásmidos recombinantes según la reivindicación 9 en un sistema de expresión, y separándose y purificándose el antibiótico del polipéptido expresado.
11. Antibiótico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para uso en la preparación de un medicamento antibacteriano.
12. Antibiótico para su uso según la reivindicación 11, en el que el medicamento antibacteriano se usa para destruir *Neisseria meningitidis*, *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina o *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples fármacos.

Fig.1

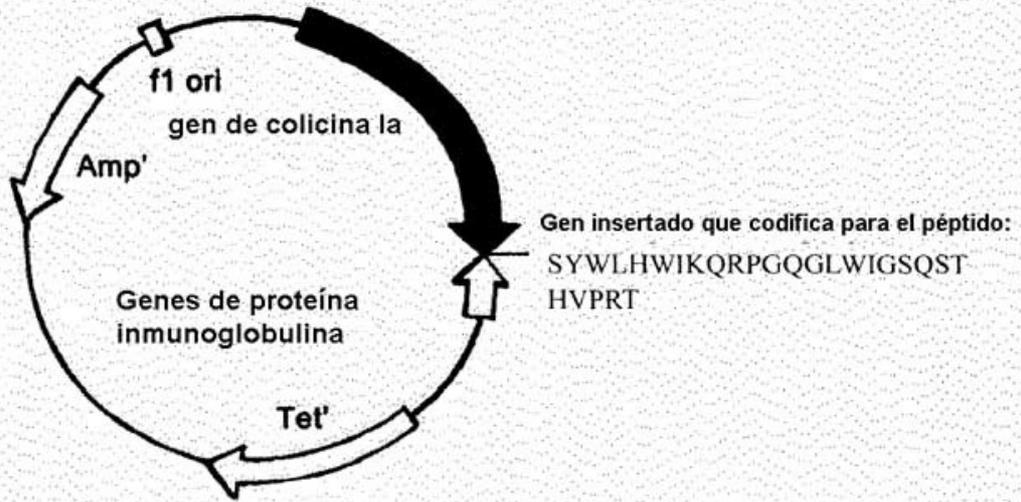


Fig.2

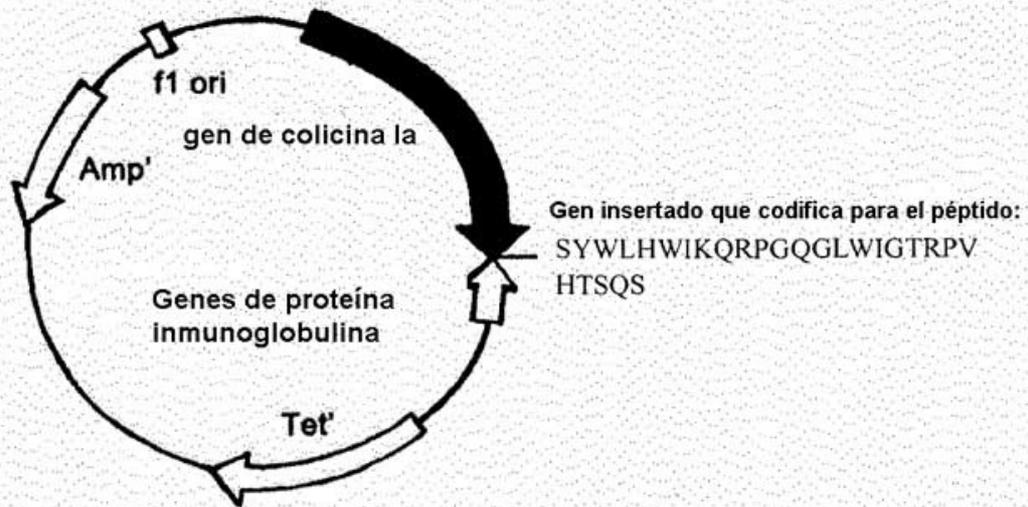


Fig.3

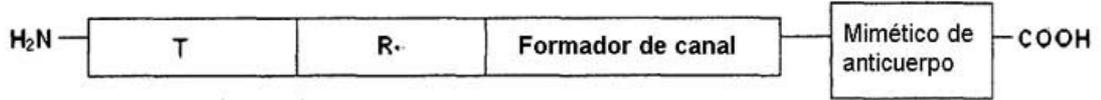


Fig.4

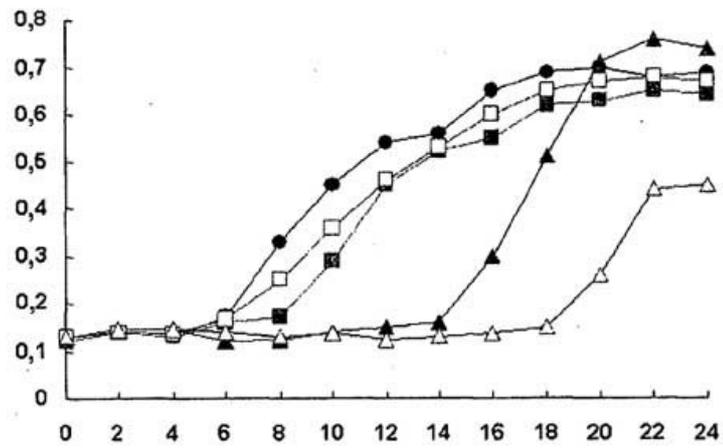


Fig.5

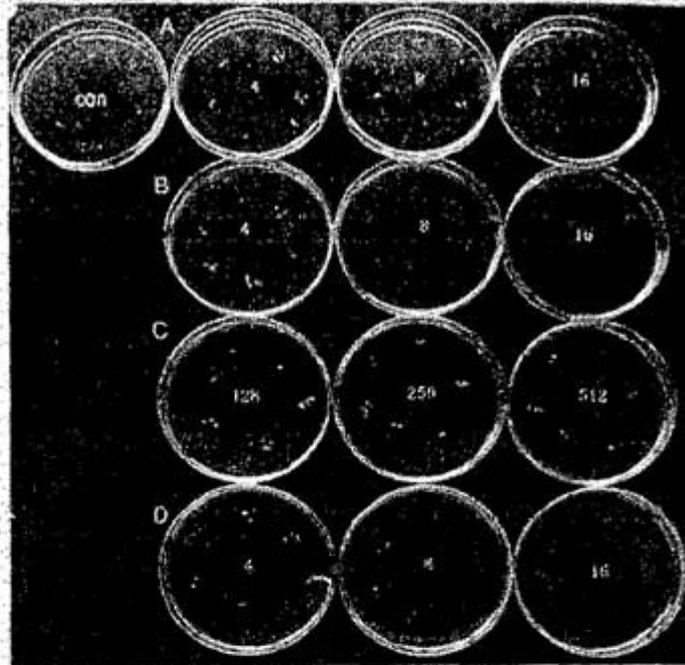


Fig.6

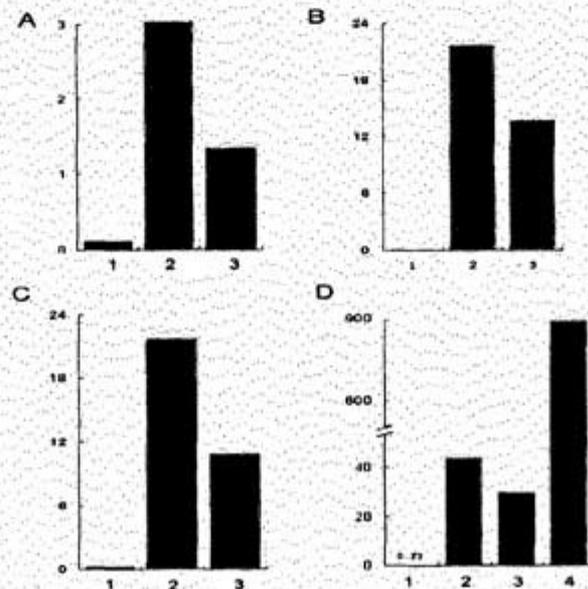


Fig.7

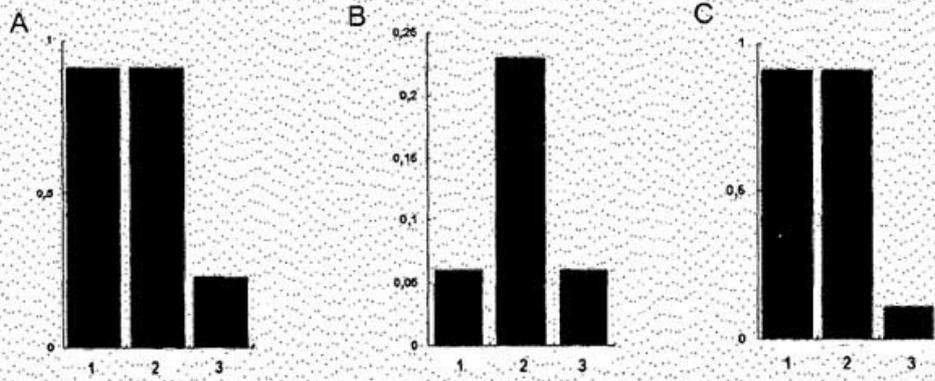


Fig.8

