



No. 10-002809-00008-0000

Fecha: 2013-04-26 16:11:38 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 14

As. 112.689

Señor

DIRECTOR DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E.

S.

D.

REF: Expediente No. **10-2809-** solicitud de patente de invención a favor de **THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK y THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN** Título **COMPOSICIONES PARA TERMOESTABILIZACIÓN DE COCAINA ESTERASA**

RESPUESTA A EXAMEN DE FONDO

JUAN PABLO CADENA SARMIENTO, portador de la tarjeta profesional No. 57.492 del C.S.J., obrando como apoderado de la sociedad solicitante me permito dar respuesta al oficio número 23296 relacionado con la patentabilidad de la presente invención y notificado por fijación en lista el 26 de Diciembre de 2012.

Con el ánimo de subsanar las objeciones planteadas por el señor Examinador, nos permitimos presentar un nuevo pliego reivindicatorio compuesto por diez (10) reivindicaciones, en donde no se amplía en ningún momento la materia inicialmente divulgada, y se encuentra enteramente sustentado en la descripción.

De esta manera, las reivindicaciones objetadas por corresponder a excepciones a la patentabilidad, a un uso o a un segundo uso han sido eliminadas en el nuevo pliego reivindicatorio con el fin de superar la objeción impuesta por su Despacho. Por tanto, el pliego presentado es completamente patentable.

Solicitamos el cambio del título de la presente solicitud por "**COMPOSICIONES PARA TERMOESTABILIZACIÓN DE COCAINA ESTERASA**", en cumplimiento de la sugerencia del señor Examinador.

Claridad

La nueva reivindicación 1 ha sido modificada de manera tal que revela un polipéptido de cocaína esterasa (CocE) con secuencia correspondiente a la SEQ ID NO: 1, o modificaciones puntuales de la misma, y se ha especificado la naturaleza del compuesto de termoestabilización. En este sentido, la nueva reivindicación 1 establece,

Una composición que comprende:

un polipéptido de cocaína esterasa (CocE); y

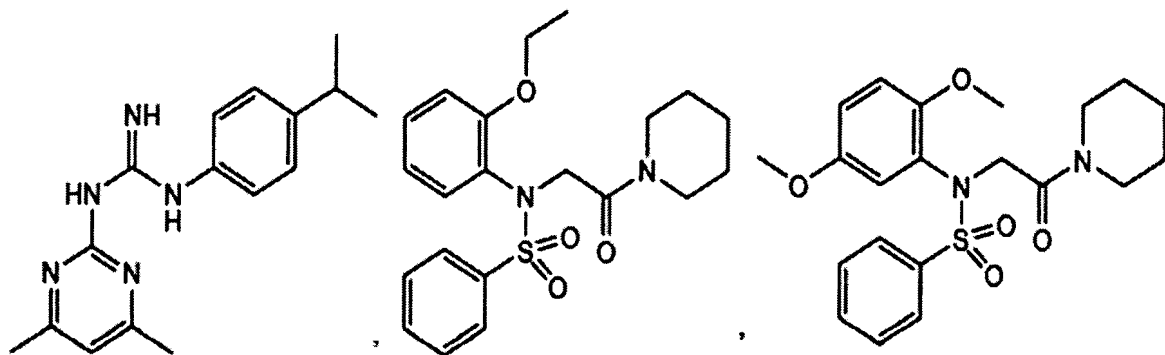
por lo menos un compuesto de termoestabilización,

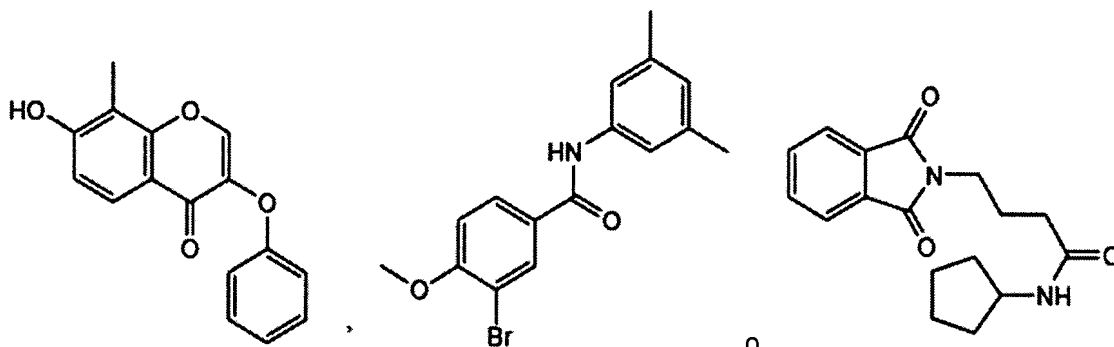
en donde,

la CocE en presencia del compuesto es más termoestable que el CocE en ausencia del compuesto;

la CocE comprende (i) una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO: 1 o (ii) una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO: 1 que tiene una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste de L163V, V225I, I218L, A310D, A149S, S159A, S265A, S56G, W220A, S140A, F189L, A193D, T254R, N42V, V262L, L508G, Y152H, V160A, T172R, Y532F, T74S, W285T, L146P, D533S, A194R, G173Q, C477T, K531A, R41I, L119A, K46A, F84Y, T172R/G173Q, L169K, F189A, N197K, R182K, F189K, V190K, Q191K, A194K, y L169K/G173Q, o combinaciones de las mismas; y tiene actividad esterasa; y

el por lo menos un compuesto de termoestabilización se selecciona de





Por tanto, el nuevo pliego reivindicatorio es claro y conciso al haberse definido puntualmente los compuestos que hacen parte de la composición reivindicada, sin hacer alusión a porcentajes de identidad de la secuencia del polipéptido CocE sino a sustituciones específicas de la secuencia SEQ ID NO: 1 y, a compuestos termoestabilizadores debidamente definidos por su estructura química.

En cuanto a la expresión “donde la CocE en presencia del compuesto es más termoestable que el CocE en ausencia del compuesto”, nos permitimos aclarar que dicha expresión no se encuentra definiendo la invención, sino que la definición de esta última está dada por las estructuras tanto del péptido como del compuesto de termoestabilización. Por tanto, se está cumpliendo el requerimiento establecido por el Instructivo de patentabilidad que establece claramente que un resultado a alcanzar puede aparecer en la reivindicación, siempre y cuando esté acompañado por las características técnicas que definen la invención (Numeral 2.6.5.8).

Así las cosas, el nuevo pliego reivindicatorio cumple con los requerimientos de su Despacho, y por tanto solicitamos respetuosamente aceptar el nuevo pliego reivindicatorio como claro y conciso.

Unidad de invención

El nuevo pliego reivindicatorio se encuentra dirigido a una composición que comprende un péptido de CocE, y mutantes del mismo, y un compuesto de termoestabilización, los cuales en conjunto permiten la obtención de una enzima CocE termoestable. Es decir, el desarrollo de la presente invención se centró en la identificación y evaluación de los compuestos que cuentan con capacidad termoestabilizante del péptido CocE, y sus mutantes específicos, lo cual en definitiva comparte un único concepto inventivo.

En cuanto a las mutaciones del péptido CocE nos permitimos informar al señor Examinador que la nueva reivindicación 1 revela un listado definido de mutaciones particulares de la SEQ ID NO: 1, y por tanto, existe una relación evidente entre dichas estructuras, toda vez que parten de la misma base y únicamente presentan modificaciones mínimas que no repercuten en su estructura general o función, y por tanto la termoestabilización es igualmente generada a partir de los compuestos que hacen parte del pliego reivindicatorio.

En este sentido, el requisito de unidad de invención se tiene como cumplido cuando existe una relación técnica entre varias invenciones y en donde dicha relación técnica define la contribución al estado de la técnica.

Para el caso que nos ocupa, los inventores encontraron que la CocE podía estabilizarse en presencia de cocaína o subproductos de la cocaína pero que dichos subproductos inhibían parcialmente la actividad de la enzima. Con el fin de evitar dicha inhibición, los inventores llevaron a cabo un cuidadoso análisis de varios compuestos con el fin de identificar aquellos que logran la estabilización de la cocaína esterasa, en donde, finalmente se identificaron los compuestos que contaban con capacidad de incrementar la vida media de la cocaína esterasa, tal como se observa en la figura 9 de la solicitud. En otras palabras, se llevó a cabo la identificación de compuestos que permitieron la estabilidad térmica de la cocaína esterasa a 37°C.

En este orden de ideas, debido al:

- i. Descubrimiento de compuestos que previenen la agregación de cocaína esterasa pueden estabilizar la misma, y
- ii. Al descubrimiento relacionado con que dichos compuestos termoestabilizan tanto la CocE silvestre como sus mutantes específicas,

Es evidente que existe una relación técnica entre ellos, la cual permite que las reivindicaciones cumplan con un concepto inventivo único siendo dicha relación técnica la que se constituye como una contribución al arte previo. Así, la invención no solamente cumple con unidad de invención *a priori* (una sola invención) sino que también cumple con el requisito de unidad de invención *a posteriori* toda vez que la invención tal como es

reivindicada está agrupada bajo un único concepto inventivo que no se encontraba anticipado por ninguna de las anterioridades.

En consecuencia, nos permitimos aclarar al señor Examinador que la presente invención refiere una relación técnica a lo largo del pliego reivindicatorio, la cual, como se expuso previamente, corresponde a la termoestabilización del péptido CocE de SEQ ID NO: 1, y las variantes específicas del mismo, mediante compuestos específicos que mostraron actividad termo estabilizante.

Por tanto, el nuevo pliego reivindicatorio se encuentra concretamente dirigido a una composición que comprende el péptido CocE y un compuesto termoestabilizante, y a un método para llevar a cabo la termoestabilización del péptido CocE, lo cual comparte el concepto inventivo previamente expuesto.

Así las cosas, solicitamos respetosamente reconocer el nuevo pliego reivindicatorio como un único concepto inventivo.

Nivel inventivo

Teniendo en cuenta que la anterior reivindicación 70 ya no hace parte del nuevo pliego reivindicatorio, damos por superada la objeción emitida en relación con la novedad de la presente invención.

De acuerdo con las modificaciones realizadas sobre la nueva reivindicación 1, la cual revela una composición que comprende un polipéptido CocE de secuencia SEQ ID NO: 1, y sus mutantes específicas, y un compuesto de termoestabilización seleccionado de un grupo específico dado, consideramos que ninguna de las referencias citadas por su Despacho afecta el nivel inventivo de la presente invención por las razones expuestas a continuación.

Como primera media reiteramos que la presente invención se encuentra dirigida en su totalidad hacia la estabilización de la cocaína esterasa (CocE), bien sea de tipo silvestre o de sus variantes que comprenden mutaciones específicas, mediante la combinación del péptido con un compuesto específico.

En este sentido, tal como lo exponen los párrafos [0187] y [0193] de la descripción, los inventores encontraron que el péptido CocE es estabilizado en presencia de sustratos, productos o inhibidores de la enzima.

Sin embargo, una vez identificada tal situación, fue posible encontrar que dichos sustratos o productos tienen también la capacidad de inhibir la actividad catalítica de la enzima, lo cual es una enorme desventaja que puede superarse mediante la selección adecuada de compuestos estabilizantes.

Para dicho fin, los inventores centraron sus esfuerzos en el diseño del análisis de una biblioteca de más de 20000 moléculas, con el fin de identificar compuestos que previenen la agregación de la CocE, y por tanto, estabilizan la estructura polipeptídica de la misma, siendo fundamental en este sentido el reconocimiento y evaluación de aquellos compuestos que no inhiben significativamente la escisión del 4-nitrofenil acetato o sustrato de cocaína.

En este orden de ideas, se procedió a la incubación de la enzima CocE en combinación con cada uno de los compuestos bajo una temperatura de 37°C, y posteriormente se evaluó la capacidad de escisión del 4-nitrofenil acetato por parte de la enzima, identificándose aquellos sistemas que conservaron la actividad enzimática, es decir, que fueron capaces de escindir el 4-nitrofenil acetato luego de la incubación (ver párrafos [0193] a [0195]).

De esta manera, en la figura 9, contenida en la descripción, se pueden observar los compuestos que permitieron una actividad significativa de escisión y un aumento de la vida media de la enzima CocE, en comparación con los controles empleados, y se resalta la estructura química de dichos compuestos.

Así las cosas, los compuestos de utilidad fueron identificados mediante un arduo esfuerzo intelectual dirigido hacia la evaluación de diferentes entidades químicas, dentro de las cuales se encontró que los compuestos que hacen parte del pliego reivindicatorio **permiten la termoestabilización** del péptido CocE silvestre, o sus variantes específicas, sin repercutir en la actividad esterasa que caracteriza a la enzima, a diferencia de los sustratos de la CocE conocidos en el arte previo, los cuales inhibían parcialmente la actividad de la enzima.

Ahora bien, en cuanto a las referencias citadas por su Despacho, notamos que la referencia **D1 (Biochemistry. 2002 Oct 15;41(41):12297-307)** corresponde a un artículo publicado que se centra en la caracterización de la cocaína esterasa bacteriana, en términos de su estructura cristalina (incluyendo los sitios de unión de sustratos y los sitios activos de la misma), y en estudios cinéticos que corroboran el mecanismo de acción propuesto para su actividad esterasa. En este sentido, los autores de D1 consideran como objetivo los parámetros bioquímicos que determinan la actividad de la enzima, sin hacer énfasis de la estabilidad de la misma a altas temperaturas.

La referencia **D2 (Plant Physiol. (1992) 100, 2109-2112)** se centra en el estudio cinético de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), una enzima que cataliza una reacción de óxido-reducción, y se encuentra presente en el extracto de frijol mungo. De esta manera, D2 hace una mención complementaria general respecto a que es bien conocido en el arte previo que la estabilización de enzimas proteicas puede llevarse a cabo mediante el empleo de sus respectivos sustratos.

Finalmente, la referencia **D3 (Chem Biol. 2001 Aug;8(8):831-42)** corresponde a un análisis cuantitativo de la estabilización por sustrato de la beta-lactamasa PC1 de *Staphylococcus aureus*, en donde, al igual que en D2, se hace mención de la bien conocida estabilización de enzimas en presencia de sus sustratos.

En este sentido, es absolutamente claro que D2 y D3 hacen mención de los procesos de estabilización de cualquier tipo de enzima, que fueron inicialmente evaluados y descartados por los inventores de la presente solicitud, sin hacer mención alguna de los problemas derivados de la pérdida de actividad catalítica de las enzimas expuestas a sus propios sustratos, lo cual no representa ningún acercamiento a las divulgaciones que caracterizan a la presente invención.

Además, evidentemente D2 y D3 se encuentran dirigidos a los aspectos cinéticos y de estabilidad que caracterizan a enzimas completamente diferentes a la cocaína esterasa.

De esta manera, al hacer una lectura de las referencias D1 a D3, es claro que ninguna de las anteriores contempla los siguientes aspectos fundamentales,

- (i) La estabilidad térmica de la enzima cocaína esterasa (CocE),

- (ii) La pérdida de actividad de la CocE derivada de llevar a cabo la estabilización de la misma mediante sus propios sustratos, es decir, ninguna referencia establece que la actividad estearasa de la CocE se ve altamente afectada cuando la misma es estabilizada en presencia de sustratos, productos o inhibidores de la enzima.
- (iii) Debido a lo anterior, las referencias citadas desconocen completamente la existencia de compuestos particulares, como los acá reivindicados, que generan una estabilización térmica de la CocE sin repercutir en la actividad estearasa de la misma.
- (iv) Particularmente, ninguna de las referencias D1 a D3 contempla los compuestos de termo estabilización que hacen parte del pliego reivindicatorio, y por tanto, ninguna referencia enseña, ni sugiere, una composición que comprenda un péptido CocE y un compuesto de termo estabilización específico, tal como lo revela la presente invención.

En este sentido, consideramos que no basta con que las referencias D2 y D3 establezcan que es bien conocida la estabilización de las enzimas mediante sus sustratos, toda vez que, como se expuso inicialmente, los inventores encontraron que dicha práctica deriva en la inhibición de la actividad estearasa de la enzima CocE, y por tanto, la misma no se encontraría en entera capacidad de hidrolizar cocaína.

Por tanto, se requiere de la aplicación de un método alternativo que asegure tanto la estabilidad como la actividad de la enzima CocE, lo cual es posible mediante la presente invención.

Lo anteriormente expuesto, en definitiva desvirtúa la siguiente conclusión del señor Examinador,

"En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia, utilizaría un ligando de la enzima CocE, como el ácido benzoico, en la composición de D1 para llegar así al objeto de la reivindicación 1 de la solicitud, por lo cual se considera obvia. La persona del oficio normalmente versada en la materia se vería motivada a utilizar el ácido benzoico porque el documento D1 enseña que en su forma cristalina, la enzima CocE se encuentra unida a benzoato en su sitio activo y

porque los documentos D2 y D3 enseñan que es bien conocido en el estado del arte que un ligando que se una a una enzima, como sustrato, cofactor e inhibidor, le confiere estabilidad térmica.”

toda vez que como se ha expuesto en el presente memorial, la composición acá reivindicada no contempla como compuesto de termo estabilización un sustrato, cofactor o inhibidor de la enzima CocE, como el ácido benzoico, sino compuestos que no hacen parte de las enseñanzas de las referencias D1 a D3, y que fueron debidamente evaluados y clasificados en términos de su capacidad de termo estabilización y su capacidad para no afectar la actividad estearasa de la enzima.

De hecho, consideramos que la única motivación encontrada por el normalmente versado en la materia en las referencias D1 a D3 sería optar por la estabilización de la enzima CocE mediante los sustratos de la misma, lo cual, además de distar de la presente invención, no daría solución al problema de la inhibición de la actividad estearasa de dicha enzima.

Por tanto, es evidente que ninguna de las referencias D1 a D3, contempla, ni sugiere, el desarrollo de las composiciones que hacen parte de la presente solicitud, toda vez que las mismas no contemplan los problemas derivados de la estabilización con sustratos de la enzima CocE, y por tanto, no refieren la aplicación de una estrategia de identificación de compuestos de termo estabilización como la descrita previamente.

En este orden de ideas, la invención acá reivindicada cumple con el siguiente indicio de la existencia de nivel inventivo, debidamente reconocido por el Instructivo de Patentabilidad,

Superación de un prejuicio técnico: toda vez que la presente invención brinda una vía alternativa, no considerada por el arte previo, para generar una mejora en la estabilidad térmica de la enzima CocE, y sus mutantes, la cual permite un aumento en la vida media de la enzima sin inhibir significativamente su actividad catalítica. De esta manera se supera el prejuicio técnico relacionado con que la vía más indicada para estabilizar una enzima es mediante el empleo de los sustratos de la misma.

Todo lo anterior, en definitiva, nos permite concluir que la presente invención corresponde a un aporte al arte previo, y por tanto la misma cumple a cabalidad con el requisito de nivel inventivo.

Teniendo en cuenta que las anteriores reivindicaciones 70 y 71 fueron eliminadas del pliego reivindicatorio, damos por superada la objeción del nivel inventivo basada en el documento D4.

En vista de lo anteriormente expuesto, respetuosamente solicitamos el retiro de las objeciones de la presente solicitud y la concesión del privilegio solicitado, ya que en opinión del solicitante cumple con todos los requisitos establecidos en la decisión 486.

Atentamente,



JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

T.P. No. 57.492 del C.SJ.

C.C. 80.410.337 de Usaquén

Calle 70 A No. 4 - 41

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:

un polipéptido de cocaína esterasa (CocE); y

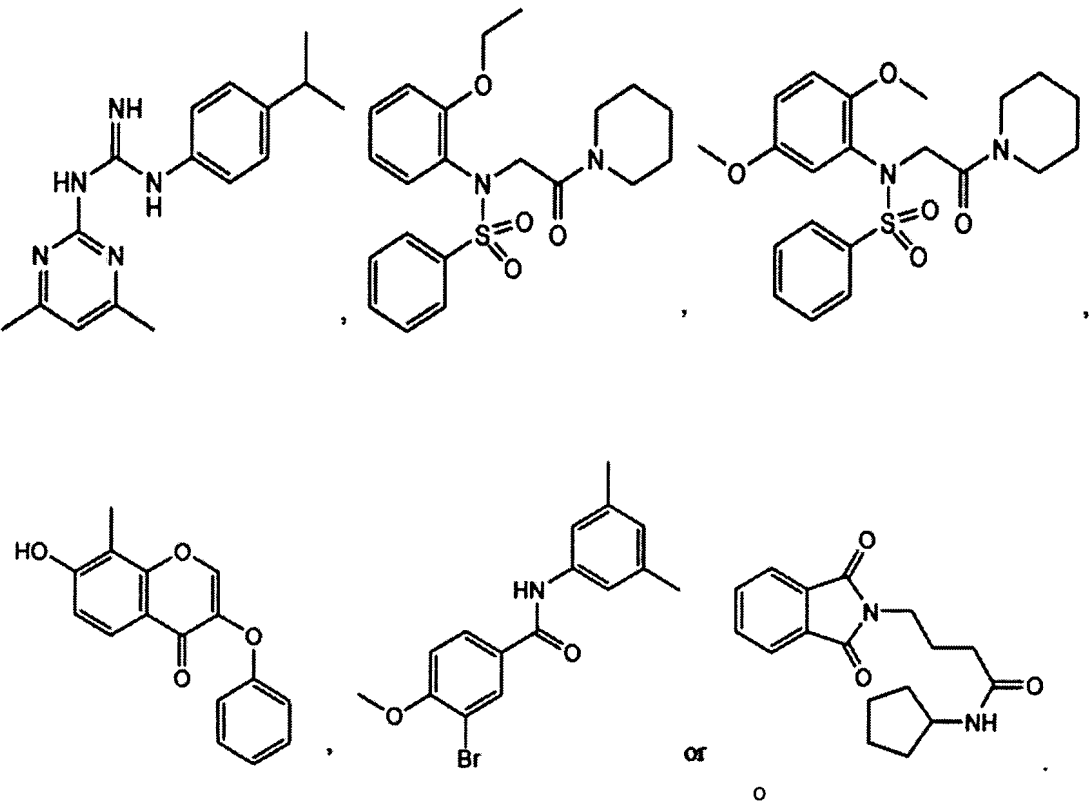
por lo menos un compuesto de termoestabilización,

en donde,

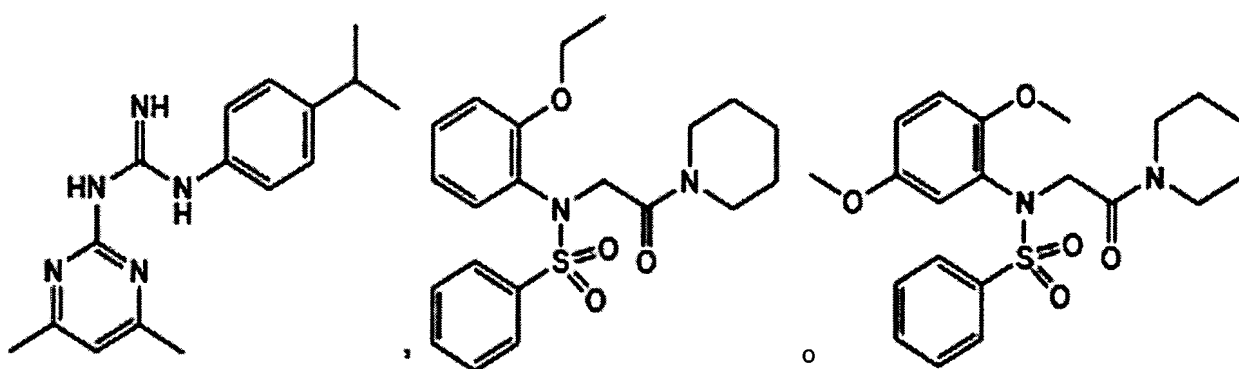
la CocE en presencia del compuesto es más termoestable que la CocE en ausencia del compuesto;

la CocE comprende (i) una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO: 1 o (ii) una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO: 1 que tiene una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste de L163V, V225I, I218L, A310D, A149S, S159A, S265A, S56G, W220A, S140A, F189L, A193D, T254R, N42V, V262L, L508G, Y152H, V160A, T172R, Y532F, T74S, W285T, L146P, D533S, A194R, G173Q, C477T, K531A, R41I, L119A, K46A, F84Y, T172R/G173Q, L169K, F189A, N197K, R182K, F189K, V190K, Q191K, A194K, y L169K/G173Q, o combinaciones de las mismas; y tiene actividad esterasa; y

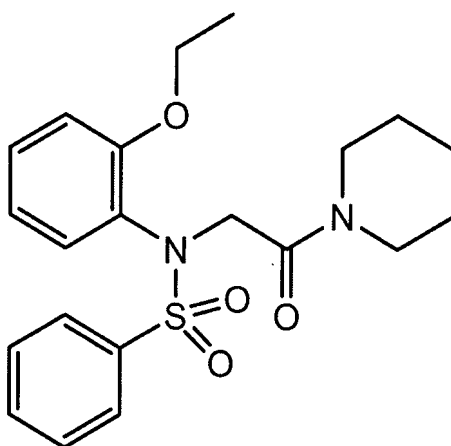
el por lo menos un compuesto de termoestabilización se selecciona de



2. La composición de la reivindicación 1, en donde la CocE tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO: 1 con una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste de: T172R, S159A, N197K, L169K, F189K, G173Q, y T172R/G173Q.
3. La composición de la reivindicación 1, en donde la CocE tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO: 1 con la sustitución L169K/G173Q.
4. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la CocE es una CocE pegilatada.
5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el por lo menos un compuesto de termoestabilización se selecciona de:



6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el por lo menos un compuesto de termoestabilización es:



7. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 que comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.

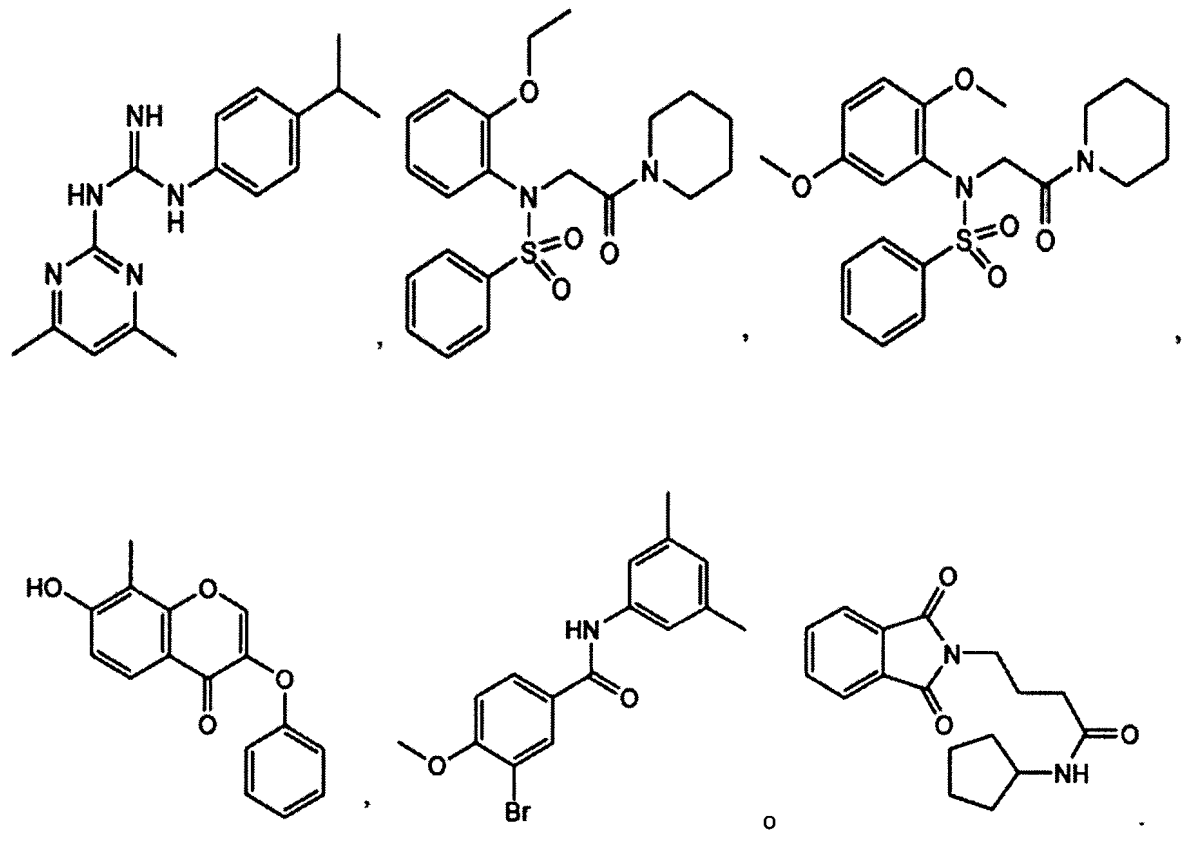
8. Un método *ex vivo* para termoestabilizar una cocaína esterasa (CocE), que comprende:

combinar un polipéptido CocE con por lo menos un compuesto de termoestabilización;

en donde,

la CocE comprende (i) una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO: 1 o (ii) una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO: 1 que tiene una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste de L163V, V225I, I218L, A310D, A149S, S159A, S265A, S56G, W220A, S140A, F189L, A193D, T254R, N42V, V262L, L508G, Y152H, V160A, T172R, Y532F, T74S, W285T, L146P, D533S, A194R, G173Q, C477T, K531A, R41I, L119A, K46A, F84Y, T172R/G173Q, L169K, F189A, N197K, R182K, F189K, V190K, Q191K, A194K, y L169K/G173Q, o combinaciones de las mismas; y tiene actividad esterasa; y

el por lo menos un compuesto de termoestabilización se selecciona de



9. El método de la reivindicación 8, en donde la combinación del polipéptido CocE con uno o más compuestos de termoestabilización ocurre *in vitro*, durante la purificación de la CocE, durante el almacenamiento de la CocE, o una combinación de los mismos.

10. Una composición que comprende:

- (i) un polipéptido de cocaína esterasa (CocE) aislado, que comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO: 1, excepto para las sustituciones L169K y G173Q, y actividad esterasa con termoestabilidad incrementada a 37°C en comparación a la CocE de tipo silvestre; o
- (ii) un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido de (i); y
- (iii) opcionalmente, un portador farmacéuticamente aceptable.