



No. 10-126241- -00006-0000

Fecha: 2013-06-05 16:25:02 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 12

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Dirección de Nuevas Creaciones

E. S. D.

Ref: EXPEDIENTE No. 10-126241

Solicitud de patente a nombre de
ALLERGAN, INC.

Me refiero al Oficio No. 399 que contiene el examen de fondo de la solicitud de patente indicada en la referencia, realizado con fundamento en el artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

En primer lugar, los solicitantes presentan un nuevo pliego reivindicatorio, en el que no se han hecho cambios de consideración porque estiman que los argumentos que a continuación se someten al Examinador son suficientes para diferenciarlas del documento D1 de Jones y otros.

La reivindicación original 8, es ahora numerada como 1. La definición de los anticuerpos está en la nueva reivindicación 3, dependiente de la reivindicación 1, y las secuencias CDRs de los anticuerpos dependen de la reivindicación 3. Las secuencias de las CDRs definen ahora los anticuerpos uno por uno con 6 CDRs para cada anticuerpo; tres de la cadena pesada y tres de la cadena ligera. Así se le da al Examinador respuesta a su petición para definir los anticuerpos por las CDRs, pero como reivindicaciones dependientes de la reivindicación 3, lo que es más amplio ya que define los anticuerpos por afinidad.

Con relación al estudio sobre patentabilidad y nivel inventivo realizado por el examinador sobre esta invención, los solicitantes someten a su consideración la siguiente respuesta.

La presente solicitud de patente describe el primer ensayo celular aprobado

por Agencias Reguladoras en varios países del mundo, incluido Colombia, para sustituir el bioensayo de ratón que ha sido el "patrón de oro" para medir la actividad biológica de las toxinas botulínicas por varias décadas.

Tal y como se describe en la página 1-párrafo 3 de la presente solicitud, el bioensayo LD50 en ratones hasta ahora era el único capaz de medir todos los pasos necesarios en la actividad de toxina botulínica, mientras que ensayos que miden únicamente la actividad endopeptidasa (subrayado, como D1) no son capaces de evaluar los pasos de unión al receptor, internalización, y translocación; y por lo tanto no podrán sustituir al bioensayo de ratón.[3] "En la actualidad el bioanálisis LD50 en ratones, una prueba de letalidad, sigue siendo el "patrón oro" usado por todos las fabricantes farmacéuticos para expresar la potencia de sus preparaciones (S. S. Arnon et al., JAMA 285: 1059-1070 (2001)). En efecto, las unidades en las etiquetas de las preparaciones farmacéuticas son unidades LD50 en ratones, y el número de animales necesarios para producir datos LD50 estadísticamente útiles es enorme. La ventaja del bioanálisis LD50 en ratones es que mide todos los pasos necesarios para la captación de toxina botulínica (por ej., unión de la toxina a un receptor de superficie celular, internalización del complejo toxina-receptor, translocación de cadena ligera en el citoplasma, escisión de la cadena ligera del sustrato), en lugar de determinar simplemente la actividad para parte únicamente de este proceso de intoxicación, tal como, por ej., en análisis in vitro que miden tan sólo la actividad enzimática de cadena ligera."

En la introducción, D1 página 91, describe la estructura de la toxina botulínica compuesta por dos cadenas, una ligera y una pesada, unidas por un puente disulfato. La cadena pesada contiene un dominio de unión que interacciona con el receptor presente en neuronas, y un dominio de translocación que facilita la salida de la cadena ligera del endosoma hacia el citoplasma donde se encuentra el sustrato SNAP25. La cadena ligera

contiene la actividad endopeptidasa que proteoliza el SNAP25. Tal y como se describe en la Figura 1B de la presente solicitud (página 3), el mecanismo de intoxicación comprende cuatro pasos: 1) unión al receptor (mediado por cadena pesada), 2) internalización del complejo toxina-receptor (mediado por cadena pesada), 3) translocación de la cadena ligera al citoplasma (mediado por cadena pesada), y 4) proteólisis del sustrato SNAP25 (mediado por cadena ligera). El ensayo de endopeptidasa que describe D1 solo mide el paso 4, la actividad catalítica de la cadena ligera frente a un sustrato de SNAP25 recombinante (secuencia parcial de SNAP25 solo de 137-206 cuando nuestro ensayo celular usa el SNAP25 completo de 1-206) y no evalúa la actividad de la cadena pesada. Por lo tanto, una toxina competente e intacta y una toxina con una cadena pesada defectuosa darían un resultado idéntico y positivo en el ensayo de D1, mientras que la toxina con cadena pesada defectuosa sería inactiva en el bioensayo LD50 de ratón y en el ensayo celular presentado en esta solicitud. Por ejemplo, el ensayo celular de la figura número 7 de la presente solicitud en la que se ensayan tres moléculas en el ensayo celular descrito en la reivindicación 8 (ahora 1), distingue claramente la actividad biológica de las tres moléculas. BoNT/A es una toxina funcional, iBoNT/A es una molécula sin actividad en la cadena ligera, y LHn/A es una molécula con una cadena ligera totalmente activa pero sin dominio de unión en la cadena pesada que cuando es administrada en el bioensayo de ratón presenta una muy baja actividad biológica. Si estas tres moléculas fueran evaluadas en el ensayo descrito en D1, la iBoNT/A sería inactiva pero la BoNT/A y la LHn/A tendrían idéntica actividad enzimática ya ambas serían catalogadas como activas cuando LHn/A no lo es. Claramente, el ensayo de D1 nunca podría sustituir al bioensayo de LD50 de ratón para medir la actividad biológica de toxina botulínica, no sería aprobado por las agencias reguladoras internacionales para medir la potencia de las preparaciones de BOTOX®.

El Problema Técnico Objetivo que resuelve esta invención se puede formular así, tal y como se detalla en la página 2- párrafo 4: “Por consiguiente, un análisis de la actividad de la toxina botulínica sencillo, confiable, validado y aceptable para un organismo gubernamental, que pueda evaluar la integridad de todos los pasos necesarios en la captación de la toxina botulínica sería de valor significativo porque tal análisis no basado en animales aliviaría la necesidad de experimentación animal y todas las desventajas, costos y preocupaciones éticas asociadas con este tipo de análisis basado en animales.”

Este Problema Técnico Objetivo se resuelve en la reivindicación número 8 de la presente solicitud (ahora reivindicación número 1) donde se detalla un ensayo celular capaz de evaluar los pasos de unión al receptor, internalización del complejo, translocación de la cadena ligera, y actividad proteolítica de la cadena ligera. Por lo tanto, la reivindicación 8 (ahora 1) no es anticipada por D1, ya que D1 no es un ensayo celular sino tan solo un ensayo enzimático que solo mide uno de los cuatro pasos necesarios para una intoxicación productiva de la BoNT/A. Es por ello que el ensayo de endopeptidasa descrito en D1 nunca ha sido presentado a agencias reguladoras para reemplazar al bioensayo LD50 de ratón porque los autores claramente saben que no es posible. En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia entendería que el ensayo descrito en D1 no mide todos los pasos necesarios para la intoxicación por BoNT/A y no puede reemplazar al bioensayo de ratón para medir la actividad biológica de la toxina botulínica.

La reivindicación número 8 (ahora reivindicación 1) y el texto de esta solicitud de patente describen el ensayo celular en detalle y en su totalidad. 1) Identifican líneas celulares establecidas con alta sensibilidad a intoxicación por toxina botulínica (500 pM o menos de BoNT/A) (D1 no usa líneas celulares ya que es un puro ensayo enzimático). 2) Describen como aislar un

SNAP25(197) de un lisado celular tras el tratamiento con una muestra que contiene BoNT/A (D1 usa un substrato SNAP25 puro y recombinante mientras que el presente ensayo celular usa el SNAP25 contenido naturalmente en células neuronales). 3) Proporciona anticuerpos específicos para el proteolizado SNAP25(197) que son capaces de reconocer y unir específicamente el SNAP25(197) contenido en un lisado celular donde hay millares de otras proteínas presentes sin cros-reaccionar con otras proteínas celulares (D1 no prueba que los anticuerpos no tiene reacción cruzada con proteínas del lisado celular ya que nunca usa lisados celulares sino proteínas SNAP25 puras inmovilizadas en una fase solida). 4) Detecta la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo que contiene el SNAP25(197) aislado del lisado celular por el anticuerpo presente en la fase solida (En D1, la BoNT/A es añadida al pocillo que contiene el substrato SNAP25 en la fase sólida y la reaccion enzímica tiene lugar en el pocillo, no en el citoplasma de una célula). En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia entendería que la reivindicación 8 (ahora 1) no es anticipada por D1 ya que los ensayos son completamente diferentes y el ensayo descrito en la reivindicación 8 (ahora 1) necesita el uso de células sensibles a BoNT/A.

Adicionalmente, los anticuerpos presentados en la presente solicitud y los descritos en D1 no son idénticos. Los anticuerpos descritos en D1 son policlonales mientras que la presente solicitud presenta anticuerpos monoclonales producidos e identificados según los métodos descritos en el Ejemplo III en página 108. En este ejemplo se detalla el péptido utilizado para la inmunización, métodos para producir los hibridomas, y técnicas para identificar anticuerpos monoclonales que tengan alta afinidad por SNAP25(197) y no tengan ninguna reactividad cruzada con SNAP25(206) ni con ninguna otra proteína contenida en un lisado celular de células neuronales. D1 no presenta anticuerpos monoclonales y no demuestra que los anticuerpos policlonales producidos no tengan reacción cruzada con

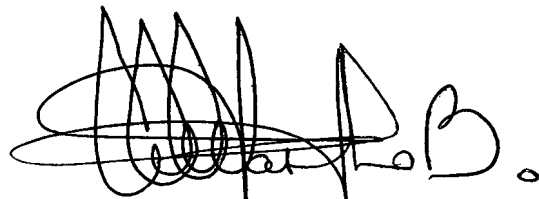
proteínas contenidas en lisados celulares ya que solo usa substratos recombinantes puros. En la presente solicitud se caracterizan los anticuerpos específicos a SNAP25(197) mediante muchas técnicas que demuestran su alta especificidad en medio de un lisado celular. También se caracteriza la afinidad por SNAP25(197) en ensayos de BiAcCore y se demuestra su alta avidez por el SNAP25(197) y la no reactividad cruzada por SNAP25(206) incluso a altas concentraciones de anticuerpo (Tabla 9, páginas 120-121). D1 no realiza ninguna de estas caracterizaciones y por lo tanto la persona del oficio normalmente versada en la materia no sabría leyendo D1 si los anticuerpos policlonales presentados se podrían utilizar para captar el SNAP25(197) presente en un lisado celular y si presentan la afinidad necesaria para obtener un ensayo celular con la sensibilidad necesaria. En nuestra solicitud de patente también se incluyen las secuencias CDR de los anticuerpos monoclonales seleccionados (Tabla 10, página 123), estas secuencias son únicas y no se encuentran en ninguna base de datos con lo que son nuevas y no anticipadas por ninguna otra patente o publicación. D1 no detalla ninguna secuencia CDR de sus anticuerpos. Adicionalmente, los autores de D1 en la discusión (página 99, segunda columna) reconocen que es posible obtener anticuerpos mejores (con mejorara avidez) que los presentados en D1 (como los descritos y caracterizados en la presente solicitud de patente) y que dichos anticuerpos aumentarían la actividad del ensayo: "Higher titre/high avidity anti-SNAP25190–197/SNAP25173–180 cleavage site detecting antibodies would, however, considerably increase the sensitivity of the current assays". Tras entender las diferencias entre los anticuerpos presentados en D1 y los anticuerpos descritos en esta solicitud de patente está claro que D1 no anticipa y no inventa los anticuerpos contenidos en la presente solicitud.

Los inventores de esta solicitud de patente han modificado las reivindicaciones para aclarar el ensayo celular de toxina botulínica que

contiene la invención presentada y la definición de los anticuerpos monoclonales usando las afinidades y las secuencias CDRs.

En los términos anteriores doy respuesta al requerimiento del Oficio No. 399, notificado en este asunto.

Atentamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'JCB', is written over a circular stamp.

JERÓNIMO CASTILLO BONILLA
C.C. 79.462.057 Bogotá
T.P 104167 C.S. Judicatura

REIVINDICACIONES

1. Un método de detectar actividad BoNT/A, método que comprende los pasos de:
 - a. tratar una célula de una línea celular establecida con una muestra que contiene una BoNT/A, en donde la célula de una línea celular establecida es susceptible a intoxicación BoNT/A en alrededor de 500 pM o menos de una BoNT/A;
 - b. aislar de la célula tratada un componente SNAP-25 que incluye un producto de escisión SNAP-25 que tiene una glutamina de término carboxilo del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A;
 - c. contactar el componente SNAP-25 con un anticuerpo α -SNAP-25 fijado a un soporte de fase sólida,
en donde el anticuerpo α -SNAP-25 une un epítipo que comprende una glutamina de término carboxilo del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25, el anticuerpo α -SNAP-25 tiene una constante de velocidad de asociación para un epítipo de una SNAP-25 que no incluye una glutamina de término carboxilo del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25 de menos de $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; y el anticuerpo α -SNAP-25 tiene una constante de disociación de equilibrio para el epítipo de menos de 0.450 nM;
 - d. detectar la presencia de un complejo anticuerpo-antígeno que incluye el anticuerpo α -SNAP-25 y el producto de escisión SNAP-25 que tiene una glutamina de término carboxilo del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A;
en donde la detección por el complejo anticuerpo-antígeno es indicativa de actividad BoNT/A.

2. El método de la reivindicación 8 1, en donde el producto de escisión SNAP-25 es SNAP-25₁₉₇.
3. El método de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo α -SNAP-25 fijado a un soporte de fase sólida tiene una constante de velocidad de asociación para un epítipo que no contiene una glutamina de término carboxilo del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25 de menos de $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; y en donde el anticuerpo α -SNAP-25 tiene una constante de disociación de equilibrio para el epítipo de menos de 0.450 nM.
4. El anticuerpo de la reivindicación 3, en donde el anticuerpo comprende:
 - a. Una región variable de cadena pesada que incluye las CDRs: SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101
 - b. Una región variable de cadena ligera que incluye las CDRs: SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 113.
5. El anticuerpo de la reivindicación 3, en donde el anticuerpo comprende:
 - a. Una región variable de cadena pesada que incluye las CDRs: SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 100
 - b. Una región variable de cadena ligera que incluye las CDRs: SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 115.
6. El anticuerpo de la reivindicación 3, en donde el anticuerpo comprende:
 - a. Una región variable de cadena pesada que incluye las CDRs: SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 102
 - b. Una región variable de cadena ligera que incluye las CDRs: SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 116.
7. El anticuerpo de la reivindicación 3, en donde el anticuerpo comprende:
 - a. Una región variable de cadena pesada que incluye las CDRs: SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 100
 - b. Una región variable de cadena ligera que incluye las CDRs: SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 116.

8. El método de la reivindicación 8 1, en donde la presencia de un complejo anticuerpo-antígeno se detecta usando un ELISA sándwich.
9. El método de la reivindicación 8 1, en donde el método tiene una relación señal/ruido en la asíntota inferior de por lo menos 3:1 y una relación señal/ruido en la asíntota superior de por lo menos 10:1.
10. El método de la reivindicación 8 1, en donde la muestra comprende como máximo 100 pM de una BoNT/A
11. El método de la reivindicación 8 1, en donde la célula de una línea celular establecida es susceptible a intoxicación BoNT/A en alrededor de 100 pM o menos de una BoNT/A.
12. El método de la reivindicación 8 1, en donde el método se lleva a cabo en una forma singleplex o una forma multiplex.
13. Un método de determinar inmuno-resistencia a BoNT/A en un mamífero que comprende los pasos de:
 - a. agregar una BoNT/A a una muestra de prueba obtenida de un mamífero que se está examinando en cuanto a la presencia o ausencia de anticuerpos α -BoNT/A neutralizantes;
 - b. tratar una célula de una línea celular establecida con la muestra de prueba, en donde la célula de una línea celular establecida es susceptible a intoxicación BoNT/A;
 - c. aislar de las células tratadas un componente SNAP-25 que incluye un producto de escisión SNAP-25 que tiene una glutamina de término carboxilo del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A;
 - d. contactar el componente SNAP-25 con un anticuerpo α -SNAP-25 fijado a un soporte de fase sólida, en donde el anticuerpo α -SNAP-25 une un epítipo que incluye una glutamina de término carboxilo del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25, el anticuerpo α -SNAP-25 tiene una constante de velocidad de asociación para un epítipo de una

SNAP-25 que no incluye una glutamina de término carboxilo del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A de un producto de escisión SNAP-25 de menos de $1 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; y el anticuerpo α -SNAP-25 tiene una constante de disociación de equilibrio para el epítipo de menos de 0.450 nM;

- e. detectar la presencia de un complejo anticuerpo-antígeno que incluye el anticuerpo α -SNAP-25 y el producto de escisión SNAP-25 que tiene una glutamina de término carboxilo del enlace escindible del sitio de corte BoNT/A;
- f. repetir los pasos **b-e** con una muestra de control negativo en lugar de una muestra de prueba, comprendiendo la muestra de control negativo una BoNT/A y un suero conocido por no contener anticuerpos α -BoNT/A neutralizantes; y
- g. comparar la cantidad del complejo anticuerpo-antígeno detectado en el paso **e** con la cantidad del complejo anticuerpo-antígeno detectado en el paso **f**,
en donde la detección de una cantidad inferior del complejo anticuerpo-antígeno detectado en el paso **e** relativa a la cantidad del complejo anticuerpo-antígeno detectado en paso **f** es indicativa de la presencia anticuerpos α -BoNT/A neutralizantes.

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

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0054230
		Bogotá D.C., Junio 05 de 2013 - 16:13:56

RECIBIDO DE : CASTILLO PINEDA SAS				NI 860.046.502	
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	202838963	05/06/2013	90.000.00

*** Conceptos Pagados ***				
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
3 50005-01-01	SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	90.000.00
				<u>\$90.000.00</u>
			=====	

SON: **NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-126241- -00006-0000
Fecha: 2013-06-05 16:25:02 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 11