

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.

Carlos R. Olarte
Juan G. Moure

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-019241- -00011-0000

Fecha: 2013-12-16 16:59:46
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 523 RESPUESTA

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 23

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERC

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Mauricio Ávila
José Jairo Dangond
Gina Cáceres
Isabella Herrera
Zaava Ravid
Miguel Felipe Porras
Catalina Arnaya
Laura M. Escobar
Lorena Andrade Tovar

Re: Expediente N° 11-019.241

Solicitud de Patente de Invención titulada: "POLIPÉPTIDOS G-CSF BOVINOS MODIFICADOS"

Solicitante: AMBRX, INC. y ELI LILLY AND COMPANY

Nuestra Ref.: P2011/000228

Medellín
María Clara Múnera
Eddie Manotas
Lorena Santamaría

RESPUESTA AL OFICIO No. 14393, NOTIFICADO POR FIJACIÓN EN LISTA No. 031
DE FECHA 06 DE AGOSTO DE 2013
(PRIMER EXAMEN DE FONDO)

CARLOS R. OLARTE, mayor de edad y vecino de Bogotá, identificado tal como aparece al pie de mi firma, en mi carácter de apoderado de la sociedad solicitante, me permito manifestar lo siguiente ante el auto emanado por ese Despacho, dentro del plazo legal de prórroga previsto en el artículo 45 de la Decisión 486, en los siguientes términos:

1. En primer lugar, con el ánimo de brindar mayor claridad a la materia reivindicada, me permito adjuntar un **Capítulo Reivindicatorio Modificado**, que reemplaza en su totalidad al Capítulo Reivindicatorio original.

Así entonces, el Capítulo Reivindicatorio Modificado contiene los siguientes cambios:

- se eliminan las Reivindicaciones originales 2, 3, 5 a 7, 10 a 14, 16 a 37, 40 a 53, 55 a 65, 67, 68 y 72 a 104;
- se modifica la Reivindicación 1 para incluir la información de las antiguas Reivindicaciones 1, 4, 8, 9, and 15. El soporte para esta Reivindicación se encuentra en las figuras 5, 13 y 14; y en los párrafos [244], [250-251], [358], [360], y [652] de la publicación PCT realizada bajo el número WO2010/011735;
- las nuevas Reivindicaciones 2, 3, 10, 13 a 15 y 16 corresponden a las antiguas Reivindicaciones 38, 39, 54, 69 a 71 y 66, respectivamente;
- las nuevas Reivindicaciones 4 a 6 están soportadas en los párrafos [495] y [543] de la publicación PCT;

- la nueva Reivindicación 7 está basada en la información de los párrafos [671] a [674] de la publicación PCT;
- las nuevas Reivindicaciones 8 y 9 están soportadas en los párrafos [736], [738], [746] y [748], y las figuras 16 a 17] de la publicación PCT;
- la nueva Reivindicación 11 tiene soporte en los párrafos [395] a [403] de la publicación PCT;
- la nueva Reivindicación 12 está soportada en la Tabla 2 y el párrafo [652] de la publicación PCT;
- el nuevo capítulo reivindicatorio consta de 16 cláusulas las cuales ha sido renumeradas conforme a la respectiva correspondencia.

Valga anotar que las modificaciones efectuadas al Capítulo Reivindicatorio cumplen a cabalidad con lo estipulado en el Artículo 34 de la Decisión 486, ya que éstas de ninguna manera implican una ampliación de la protección correspondiente a la divulgación contenida en la solicitud inicial, por el contrario éstas corresponden a una drástica limitación de la materia originalmente reclamada.

2. a- La Examinadora sugiere corregir el título toda vez que hace referencia a usos, los cuales no son objeto de patente en Colombia.

b- De acuerdo a la sugerencia de la Examinadora, se modifica el título de la invención para eliminar cualquier referencia al uso, siendo el nuevo título

“POLIPÉPTIDOS G-CSF BOVINOS MODIFICADOS”.

3. a- La Examinadora señala que las Reivindicaciones 68, 72, 102 y 104 reclaman materia no patentable.

b- Considero superada la anterior objeción, en tanto las Reivindicaciones 68, 72, 102 y 104 fueron eliminadas del Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto.

4. a- i) La Examinadora argumenta que las Reivindicaciones 1 - 104 no son claras porque el péptido de las Reivindicaciones 1-9, 22-53, 92 debe definirse en términos de la

secuencia de aminoácidos, indicando el número de la misma (SEQ ID No) y no solamente en términos de posibles modificaciones en un polipéptido.

ii) De otra parte, las composiciones de las Reivindicaciones 66, 67 y 86 deben ser definidas a partir de sus ingredientes y las proporciones de los mismos.

iii) Adicionalmente, la Examinadora sugiere mencionar los ingredientes específicos en las Reivindicaciones 3-6, 8, 23, 26, 43-47, 49, 50, 53, 57, 59-63, 67, 74, 75, 94, pues los términos un ligador, molécula biológicamente activa, polímero bifuncional, polímero soluble en agua hacen referencia a la funcionalidad del ingrediente o a su solubilidad, las cuales no son características técnicas que permitan definirlos inequívocamente.

iv) En cuanto a las Reivindicaciones 1, 2, 87, 97, 98, la Examinadora sostiene que las expresiones "polipéptido que comprende uno o más aminoácidos codificados de manera natural" y comprendiendo "sustitución, adición o delección" sin definir las modificaciones específicas no permiten establecer el alcance de la solicitud.

v) En las Reivindicaciones 10-13, 16-19 se mencionan múltiples posibilidades en cuanto a modificaciones de aminoácidos y combinaciones de los mismos, dando lugar a un sinnúmero de posibilidades que no encuentran soporte en la descripción. Adicionalmente el solo hecho de mencionar cuál es la posición del aminoácido que se sustituye sin indicar cuál es el aminoácido que lo reemplaza no permite caracterizar al polipéptido.

vi) Las Reivindicaciones 22-26 se definen por resultados a alcanzar, y no definen al polipéptido, en consecuencia, se sugiere reemplazarlo por las características esenciales, estructurales o funcionales, que contribuyen a la obtención de ese efecto.

vii) Las Reivindicaciones 27-37 no son concisas porque hacen referencia a grupos funcionales para definir un aminoácido. Se sugiere definir el aminoácido específico.

viii) En las Reivindicaciones 47, 64, 83, 85 se hace referencia al peso molecular lo que es un parámetro, en este caso no es aceptable porque un polipéptido se puede definir por su secuencia de aminoácidos.

ix) El capítulo reivindicatorio no es conciso porque contiene un excesivo número de Reivindicaciones independientes, lo cual hace difícil definir cuál es el objeto que se busca proteger.

x) La descripción no divulga la invención de manera suficientemente completa para que una persona del oficio normalmente versada en la materia pueda ejecutarla o reproducirla.

b- i) En primer lugar, llamo respetuosamente la atención de la Examinadora sobre las drásticas modificaciones realizadas al Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto, tal como se explican en el punto 1 del presente memorial. En especial, dada la eliminación de las Reivindicaciones 2, 3, 5 a 7, 10 a 14, 16 a 37, 40 a 53, 55 a 65, 67, 68 y 72 a 104, se consideran superadas las objeciones relativas a dichas Reivindicaciones.

ii) Respecto a la objeción por la falta de claridad de las Reivindicaciones 1 a 9, se ha precisado que el polipéptido reclamado es el polipéptido bG-CSF que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, donde la posición 133 de SEQ ID NO: 1 o la posición 134 de SEQ ID NO: 2 está sustituida con una para-acetilfenilalanina; y donde el polipéptido está unido a un polímero soluble en agua que comprende un motivo poli(etilen)glicol.

Considerando la información contenida en la nueva Reivindicación 1 y dado que dicha Reivindicación ahora comprende la información de la antigua Reivindicación 15, cuya claridad no había sido cuestionada, se considera que la falta de claridad ha sido superada, pues el polipéptido reclamado ha sido definido en función de la secuencia aminoácida, indicando el número de la secuencia SEQ ID No 1 o 2, se ha precisado que el sitio de la modificación es el residuo 133 de SEQ ID NO: 1 o la posición 134 de SEQ ID NO: 2 y el aminoácido original ha sido sustituido con una para-acetilfenilalanina, lo que corresponde con las características esenciales de la invención reclamada, y por tanto, ante estas precisiones se considera superada esta objeción.

iii) En relación con la falta de claridad de la composición reclamada de la antigua Reivindicación 66, es necesario precisar que la nueva Reivindicación 16, que recoge la

información de dicha Reivindicación 66, se refiere a una composición que comprende el polipéptido bG-CSF de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9 y un cargador farmacéuticamente aceptable. Como se argumentó en el numeral anterior, la Reivindicación 1 ha sido modificada para aclarar la secuencia y la mutación que caracterizan el polipéptido de la invención. Siendo que dicha definición ahora es clara, el ingrediente activo se encuentra correctamente definido.

Basándose en ese hecho, la nueva Reivindicación 16 es clara, pues aun cuando sólo define el ingrediente activo y no hace mención de los otros ingredientes que conforman la composición ni establece las proporciones de los mismos, **dicha información resulta innecesaria y no afecta la claridad de la solicitud**, puesto que el Instructivo para el Examen de Solicitudes de Patentes de Invención y Modelos de Utilidad de la Superintendencia de Industria y Comercio¹, señala que en la nota al pie del cuadro lo siguiente: **“Si, por ejemplo, la característica técnica esencial de la composición es el compuesto activo, el examinador no deberá requerir que se mencionen también otras características estructurales”**.

En vista del lineamiento antes citado, la nueva Reivindicación 16, cuya composición está definida por el compuesto activo, es clara y **no debe requerirse que se mencionen otras características estructurales como los excipientes o las proporciones con las cuales dichos excipientes o el ingrediente activo están presente en la composición**.

En particular me permito recordar respetuosamente que la patentabilidad de estas composiciones recae únicamente en la novedad y nivel inventivo de los polipéptidos que se encuentran en estas, más no en las composiciones como tal y mucho menos en los ingredientes específicos que pueda contener. Es decir, las reivindicaciones reclaman una composición farmacéutica (cualquier composición) que esté caracterizada porque contiene los compuestos de la presente invención, sin limitación a excipientes, porcentajes o condiciones y sin importar la forma de dosificación. Incluir elementos y condiciones específicas **no esenciales** en las reivindicaciones, limitaría injustamente el derecho del inventor a reclamar el alcance del concepto inventivo desarrollado. Al incluir elementos no esenciales, el alcance de la protección se ve limitado en tanto que, para

¹ Instructivo Examen de Solicitudes de Patentes de Invención y Modelo de utilidad. Superintendencia de Industria y Comercio. 2012. Sección 2.6.5.4, Página 76. Relativo a las “Características esenciales” (disponible electrónicamente en http://api.sic.gov.co/Documentos/Guia_Examen_Patentes.pdf)

6

que existiera una infracción, dichos elementos no esenciales deberían necesariamente estar presentes en el producto o proceso infractor, lo que fácilmente podría lograrse al tratarse de elementos que pueden ser cambiados o modificados. Por tanto, incluir características adicionales que no son esenciales limitaría injustificadamente la protección de la patente incorporando elementos no esenciales dentro del concepto inventivo desarrollado.

iv) La nueva Reivindicación 1, que incluye parte de la información de la Reivindicación 8, incluye la expresión “polímero soluble en agua”, sin embargo esta característica ha sido precisada para indicar que el “polímero soluble en agua” comprende un **motivo poli(etilen)glicol**.

v) Con el nuevo Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto, la objeción relativa a la falta de concisión del mismo ha sido superada, pues se ha reducido el número de Reivindicaciones a 16, de las cuales sólo una de ellas, la Reivindicación 1, es independiente.

vi) Con las limitaciones introducidas en el Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto, **la totalidad de la materia que ahora se reclama está sustentada en la descripción** y la invención está divulgada de manera suficientemente completa para que una persona del oficio normalmente versada en la materia pueda ejecutarla o reproducirla.

Así, considero respetuosamente que el Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto cumple con los requisitos de claridad y concisión establecidos en la Decisión 486, y a la luz del MAP y la Guía de la SIC, permitiendo a la persona medianamente versada en la materia comprender inequívocamente el alcance de la materia reclamada y el cual corresponde a una generalización razonable de la materia ilustrada en el Capítulo Descriptivo.

5. a- La Examinadora argumenta que la solicitud no cumple con el requisito de unidad de invención porque se refiere a 5 grupos inventivos definidos por las siguientes características esenciales:

- Grupo I: polipéptido que comprende uno o más aminoácidos no codificados de manera natural, en donde los aminoácidos se sustituyen antes de la posición 1 de SEQ ID NO 1 o los aminoácidos correspondientes a la SEQ ID NO 2.

X

- Grupo II: dirigido a polipéptido de bovino GCSF que comprende uno o más aminoácidos no codificados de manera natural, en el que la modificación se realiza en la posición 3 SEQ ID NO 1 o el correspondiente aminoácido de SEQ ID NO 2.
- Grupo III: dirigido a polipéptido de bovino que comprende uno o más aminoácidos no codificados de manera natural, limitado a que un aminoácido no codificado de manera natural en el que la modificación se realiza en la posición 62 del polipéptido de SEQ ID NO 1 o el correspondiente aminoácido de SEQ ID NO 2.
- Grupo IV: dirigido a polipéptido de bovino GCSF que comprende uno o más aminoácidos no codificados de manera natural, limitado a que el aminoácido no codificado de manera natural es sustituido por un residuo 133 de SEQ ID NO 1 o el correspondiente aminoácido de SEQ ID NO 2.
- Grupo V: Reivindicaciones 54, 55, 69 y 70, dirigido a un ácido nucleico que codifica un polipéptido de bovino GCSF.

Adicionalmente, cada una de las modificaciones realizadas en una posición correspondería a un grupo inventivo diferente. Así las cosas, la Examinadora sugiere restringir la materia a patentar en un solo concepto común inventivo especificando el avance tecnológico sobre el estado de la técnica.

b- En el Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto el alcance de la invención ha sido limitado al concepto inventivo que caracteriza el grupo IV, toda vez que el polipéptido bG-CSF que en ella se reivindica ha sido limitado a aquel que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, donde la posición 133 de SEQ ID NO: 1 o la posición 134 de SEQ ID NO: 2 está sustituida con una para-acetilfenilalanina; y donde el polipéptido está unido a un polímero soluble en agua que comprende un motivo poli(etilen)glicol.

Esto constituye el único concepto inventivo ahora reclamado, y las restantes Reivindicaciones se refieren a dicho polipéptido, al polinucleótido que codifica dicho polipéptido y el vector y la célula transformada con dicho polinucleótido a fin de expresar el mencionado polipéptido. Como la Examinadora podrá constatar, el nuevo Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto no hace alusión a otras modificaciones u otras secuencias, como ocurría anteriormente.



6. a- La Examinadora señala que la solicitud de patente US2008/146781 (D1) afecta la novedad de las Reivindicaciones 1-67, 69-71, 73-101 y 103.

En particular, la Examinadora señala que D1 divulga un polipéptido Bg-CSF que comprende una o más sustituciones de aminoácidos (Pág. 10, Línea 0077). De igual forma, la Examinadora sostiene que las características esenciales del método de la Reivindicación 71 carecen de novedad puesto que D1 también habían sido divulgadas previamente un método de preparación de un polipéptido Bg-CSF (Pág. 10, Párr. 0077), que comprende cultivar células con polinucleótidos de Bg-CSF, e incluye un codón selector (Pág. 9, Párr. 0066) (Pág.10 Párr. 0077), una ARN sintetasa ortogonal y un RNAt ortogonal y la purificación del polipéptido bG-CSF (Pág.10, Línea. 0077).

En el mismo oficio se concluye que las Reivindicaciones 87 y 88 no son novedosas pues D1 había enseñado previamente un polipéptido bG-CSF con sustitución, adición, delección de aminoácidos, (Párr. [0053]) y un polipéptido con un polímero soluble en agua unido a aminoácido del polipéptido (párr. 0053). Además, las Reivindicaciones dependientes 89-90 no mencionan alguna característica que haga nueva a la composición de la Reivindicación 88, por lo cual se considera que no son nuevas.

Sumado a lo anterior, se advierte que las características esenciales del polipéptido de la Reivindicación 92 habían sido divulgadas previamente en el documento D1, el cual enseña polipéptido bG-CSF con ligador, polímero o una molécula biológicamente activa, que son unidas a través de un grupo funcional de aminoácido no codificado de manera natural incorporado ribosómicamente dentro del polipéptido. (línea. 0083). Siendo así, la Reivindicación 92 no es nueva y la Reivindicación dependiente 93 no menciona alguna característica que la haga novedosa.

Finalmente, las Reivindicaciones 94 y 95 tampoco son novedosas, puesto que D1 había reportado un polipéptido Bg-CSF que comprende una o más sustituciones de aminoácidos (Pág. 10, Línea 0077)

Así las cosas, la Examinadora concluye que las Reivindicaciones 1 a 67, 69 a 71, 73 a 101 y 103 de la presente solicitud no cumplen con el requisito de novedad a la luz de la información divulgada en D1.

b- i) En primer lugar, me permito llamar la atención de la Examinadora sobre el hecho que la presente invención ahora se relaciona única y exclusivamente con un polipéptido bG-CSF que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, donde la posición 133 de SEQ ID NO: 1 o la posición 134 de SEQ ID NO: 2 está sustituida con una para-acetilfenilalanina; y donde el polipéptido está unido a un polímero soluble en agua, que comprende un motivo poli(etilen)glicol.

Habiendo establecido el objeto de la invención, se hace énfasis en que el documento D1 es una divulgación genérica relacionada con proteínas de la Familia del Supergen de la Hormona del Crecimiento (GH), que incluye el factor humano de Estimulación de Colonias de Granulocitos (hG -CSF). D1 divulga un muy amplio género profético de polipéptidos hG -CSF que tiene uno o más sustituciones de aminoácidos codificados no naturalmente.

De hecho, D1 enseña que estas proteínas, incluyendo hG -CSF, pueden ser sustituidas en cada posición simple del polipéptido. Véase, por ejemplo el párrafo [337]. D1 proporciona una guía general sobre cómo seleccionar los sitios de mutación en las proteínas de la familia del Supergen GH. Los lineamientos están basados en la observación de que la actividad biológica de estas proteínas requiere que ellas se unan y oligomericen con los receptores de la superficie celular para activar las vías de señalización intracelulares. Véase, por ejemplo [223]. D1 enseña que tres bucles que se unen a las cuatro alfa hélices generalmente no están involucrados en la unión con receptor, y por lo tanto, son objetivos adecuados para la sustitución.

Entre los tres bucles, D1 enseña una preferencia por el bucle B-C corto, ya que parece no ser esencial para la unión al receptor. D1 indica, además, que los residuos de aminoácidos proximales a la hélice A y distantes a la hélice final también tienden a no estar implicados en la unión al receptor. Así mismo, D1 sugiere que los sitios de glicosilación pueden ser útiles para la sustitución, ya que son típicamente en regiones de bucle, que generalmente no están implicados en la unión al receptor. Véase, por ejemplo [224] y [225]. D1 también menciona que para evitar la alteración de la actividad, **las sustituciones con aminoácidos codificados no naturalmente**

deben ser conservadoras *"incluyendo pero no limitado a, la sustitución de aminoácidos hidrófobos con aminoácidos hidrofóbicos, aminoácidos voluminosos por aminoácidos voluminosos, aminoácidos hidrófilos por amino hidrófilo ácidos..."* Véase, por ejemplo [319]. Para hG -CSF, D1 establece una preferencia por las sustituciones en una o más de las posiciones 59, 63, 67, 130, 131, 132, 134, 137, 160, 163, 167, y 171 de hG -CSF. Sin embargo, dentro de este grupo de 12 posiciones, D1 no enseña ninguna preferencia particular para cualquiera de dichas posiciones. Véase, por ejemplo [339].

Así las cosas, la sustitución con para-acetilfenilalanina (PAF) en la posición 133 de SEQ ID NO: 1 o en la posición 134 SEQ ID NO: 2, que caracteriza la presente invención, no se encuentra mencionada en D1. . Adicionalmente, dichas sustitución es una sustitución no conservadora y, por tanto, dista de las enseñanzas de D1. Esta primera diferencia hace que el objeto reclamado en la Reivindicación 1 sea novedoso a la luz de la información divulgada en D1.

En adición a lo anterior, vale la pena recordar que para fundamentar una afectación válida contra la novedad de una invención, el arte previo debe divulgar explícitamente todas y cada una de las características de la invención.² Es más, el Tribunal Andino de Justicia (TAJ) ha determinado que para establecer una objeción válida contra la novedad, la divulgación del arte previo debe ser lo suficientemente detallada para que una persona versada en la materia pueda usar dicha información para reproducir y explotar la invención.³ En el presente caso, D1 no divulga explícitamente las características estructurales de los polipéptidos de la presente invención, por tal razón la materia aquí reclamada es novedosa frente a D1.

ii) Adicionalmente, y como información relevante para el presente caso, me permito señalar que mientras que los lineamientos proporcionados por D1 podrían ser considerados para capitalizar lo que se sabía acerca de la estructura terciaria de las proteínas de la familia Supergénica GH, en ese momento y podría ser considerado "diseño racional de proteínas", lo cual no proporciona una expectativa razonable de que una mutación en una o más de las posiciones sugeridas retendrá la actividad biológica comparable a la proteína de

² Manual Andino de Patentes. (2004). Sección 9.4. (disponible en <http://www.comunidadandina.org/public/patentes.pdf>).

³ Proceso 06-IP-89 (<http://intranet.comunidadandina.org/Documentos/Procesos/209-IP-2005.doc>); y Proceso 36-IP-2004 (<http://www.notinet.com.co/serverfiles/servicios/archivos/30jul04/ca36-04.htm>)

11

tipo silvestre. De hecho, la mutación puede dar lugar a una proteína que carece de cualquier actividad biológica. Esto es claramente evidente a la luz de los datos presentados en D1 para las mutaciones en la hormona de crecimiento humano. Una serie de mutaciones se hicieron en varios residuos en la hGH. Entre los residuos ensayados se encuentran 12 posiciones en las tres regiones de bucle, las cuales según se predijo por los lineamientos generales de D1, no afectarían la actividad biológica. La actividad biológica de los mutantes se midió mediante el ensayo de fosforilación STAT5. Los datos se presentan en la Tabla 3. Como se puede corroborar en dicha tabla, a pesar de los lineamientos general de D1, sólo una posición mostró una EC50 comparable a la proteína de tipo salvaje. La mayoría de los mutantes había reducido la actividad biológica. De hecho, las dos mutantes con la actividad biológica más reducida estaban en el bucle BC, que de acuerdo con D1 era el bucle que con mayor probabilidad no afectaría la actividad. Las Tablas 5 y 6 muestran más datos para los mutantes de hGH y nuevamente, evidencian que es variada la gama de actividades biológicas de los diversos mutantes.

Por lo tanto, los lineamientos proporcionados por D1 para la mutación son, en el mejor de los casos, simplemente conjeturas sobre donde se pueden intentar mutaciones que podría no afectar negativamente a la actividad. Sin embargo, la persona medianamente versada en la materia no habría tenido ninguna expectativa razonable de éxito para todas las variantes posibles. La amplia variedad de actividades demostradas para hGH en D1 enseñan que no puede esperarse que cualquier mutante específico tenga la actividad deseada, a menos que realmente se genere la proteína mutante específica y se efectúen pruebas. Sin haber producido actualmente este tipo de datos para G-CSF humana, una persona medianamente versada en la materia no tendría ninguna expectativa razonable de producir un G-CSF humano biológicamente activo con cualquier sustitución con un aminoácido no natural.

Además, D1 enseña que era conocido en el estado de la técnica que la glicosilación en G-CSF humana contribuye positivamente a la estabilidad de pH y la estabilidad térmica. Véase, por ejemplo [20]. Teniendo en cuenta esta información y las enseñanzas de D1 para evitar la alteración de la actividad, cualquier persona medianamente versada en la materia pensaría que cualquier sustitución debe ser conservadora. Por lo tanto, una persona medianamente versada en la materia habría esperado razonablemente que la actividad del G-CSF humano se interrumpiera, si se efectuaba una sustitución no conservadora, por ejemplo, la sustitución de un pequeño aminoácido hidrófilo tal como treonina por un aminoácido voluminoso, no

codificado naturalmente y aromático (es decir, el PAF), en la posición de glicosilación (T133) del G-CSF humano. Además, el G-CSF bovino comparte tan solo alrededor del 80 al 85 % de identidad de aminoácidos con el G-CSF humano. Por lo tanto, hay incluso menos base para esperar razonablemente que la actividad biológica de G-CSF bovino se mantenga cuando se sustituye un residuo de la proteína con un aminoácido codificado de forma no natural.

Además, D1 enseña un extenso número de posibles tipos de aminoácidos codificados de forma no natural. Véase, por ejemplo [249] - [283]. D1 enseña que muchos aminoácidos codificados no naturalmente se basan en aminoácidos naturales, incluyendo cadenas aromáticas laterales (tirosina, fenilalanina), cadenas laterales de amida (glutamina), y cadenas laterales de hidroxilo (serina y treonina). Véase, por ejemplo [252], [254] y [272]. De hecho, veintiún (21) aminoácidos codificados de forma no natural se enseñan explícitamente en [254]. D1 enseña una preferencia por p-(propargiloxi)-fenilalanina. Véase, por ejemplo [255].

Así las cosas, el cálculo más conservador de la cantidad de posibles variantes basadas en las enseñanzas D1 es: 12 posiciones a mutar, una o más posiciones pueden ser mutadas simultáneamente, y 21 aminoácidos codificados de forma no natural puede ser elegidos, esta información da lugar a elegir $1,29 \times 10^{16}$ variantes distintas. Ver el Anexo 1, Apéndice, Ejemplo A. Sumado a lo anterior, D1 también enseña un gran número de tipos de macromoléculas que pueden ser unidas a un polipéptido hG -CSF, que tiene una o más sustituciones de aminoácidos codificados no naturalmente. Véase, por ejemplo [445].

D1 también presenta un gran número de ejemplos proféticos relativos a variantes del G-CSF humanos. Sin embargo, no existen ejemplos reales de trabajo con hG -CSF, y mucho menos, con G-CSF bovina. El Ejemplo 3 describe proféticamente variantes de hG -CSF con una sola sustitución con para- acetilfenilalanina (pAF), que resultan en 12 variantes proféticas. El Ejemplo 7 describe proféticamente variantes de hG -CSF, sustituidas individualmente con p-propargiloxi-tirosina, lo que resulta en otras 12 variantes proféticas. El Ejemplo 5 describe hG -CSF que comprende variantes mutantes dobles en cuatro posiciones de combinaciones específicas. El aminoácido codificado de forma no natural no se especifica en el Ejemplo 5. Por lo tanto, este ejemplo profético abarca 1.764 variantes de hG -CSF sólo para el Ejemplo 5. Véase Anexo 1-Ejemplo B. En resumen, los ejemplos proféticos de variantes hG -CSF enseñados por D1 dan lugar a 1.788 variantes de la proteína humana.



Considerando todas las posibilidades abarcadas por las enseñanzas generales de D1 se puede establecer que D1 da lugar a un número muy grande de variantes proféticas del G- CSF humano, que no tienen ejemplos de trabajo. De hecho, D1 **no proporciona ninguna evidencia** de que alguna combinación de sustituciones, incluyendo una sustitución Thr134 de G-CSF humano, pueda ser exitosa. No hay evidencia alguna de que cada posible variante pueda ser exitosamente expresada, purificada, y enrollada. **Tampoco hay evidencia** alguna de que cada posible variante conserve la actividad del hG -CSF. Por otra parte, **no hay evidencia** en absoluto de que cada posible variante *"muestre una actividad superior y una vida media prolongada"*, como especuló en D1. Véase, por ejemplo [739]. D1 no proporciona evidencia de que alguna o todas las variantes hG -CSF, del enorme número de variantes definido en la descripción o en el conjunto de 1.788 variantes proféticas de los ejemplos, posee alguna de estas actividades.

En contraste, en la presente invención se han preparado 15 variantes específicas del polipéptido G-CSF **de la especie bovina**, incluyendo la variante que presenta una sustitución en la posición 133 (con respecto a la SEQ ID NO:1) y que está sustituida con para-acetilfenilalanina ("bG-CSF T133pAF"). Véase ejemplo 2. Sustituyendo treonina, que tiene una cadena lateral relativamente corta, con para-acetilfenilalanina (PAF), **que es más grande, comprende un anillo de fenilo, y no es una sustitución conservadora**. De hecho, se encontró que sorprendentemente, esta variante de **bG-CSF puede ser expresada, purificada y replegada con éxito**. Entonces, los inventores adicionalmente realizaron una PEGilación a la variante bG -CSF T133pAF y probaron su actividad biológica *in vitro*. **Los resultados mostraron que variante bG -CSF T133pAF-PEGilada tiene una actividad biológica y que ésta es entre 3 y 5 superior al valor EC50 reportado para bG -CSF tipo silvestre en el ensayo de proliferación NFS60**. Véase, por ejemplo, las Tablas 7 y 8 en el ejemplo. 2, y las figuras 13 y 14. Éstas últimas se reproducen a continuación.

Figura 13

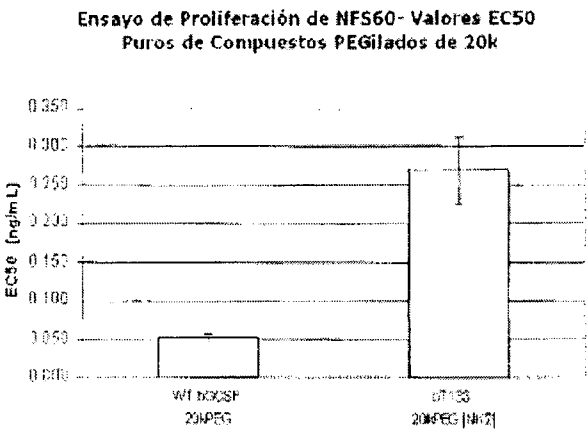
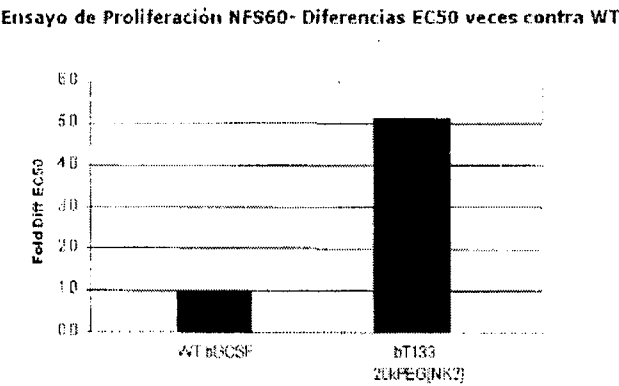


Figura 14



Además, los datos de actividad biológica *in vitro*, para cinco variantes 20K PEGiladas se presentan en la Tabla 9 de la descripción de la presente solicitud. Para mayor conveniencia, parte de dicho cuadro se reproduce a continuación. Los datos reportados para 20kPEG - BT133 se muestra como el promedio de los dos valores en la Tabla 9 original. La EC50 con relación a la proteína silvestre (WT), fue calculado dividiendo el valor de EC50 WT por el valor de la EC50 de cada mutante se agrega a la tabla.

TABLA 9		
	Promedio de valores EC50	EC50 Relativa
WT bG-CSF	0.053	1.0
20kPEG-bS62	0.150	0.353

<u>20kPEG-bT133</u>	<u>0.264</u>	<u>0.201</u>
20kPEG-bR7	0.348	0.152
20kPEG-bR166	0.363	0.146
20kPEG-bL3	0.477	0.111

Los datos incluyen tres variantes bG –CSF S62, T133 y R166 que, con base en los lineamientos extrapolados de D1, son residuos totalmente accesibles de bG -CSF. Por lo tanto, basados en las orientaciones de D1, se esperaría que estas posiciones sean las que presenten mayor tolerancia a la sustitución y a la conjugación con una macromolécula, sin afectar negativamente la actividad biológica. Los resultados muestran que las cinco variantes bG -CSF PEGilado conservan la actividad biológica. **Sin embargo todas las variantes muestran una actividad reducida.** Cabe destacar que, la variante que tiene la T133 sustituida con para-acetilfenilalanina y pegilada fue la segunda que menos sufrió la reducción de la actividad. **Este resultado es inesperado porque D1 enseña que era conocido en el estado de la técnica que la glicosilación en G-CSF humano contribuye positivamente a la estabilidad de pH y la estabilidad térmica, y por lo tanto, a la actividad.** Véase, por ejemplo [20]. Las enseñanzas de D1, por tanto, habrían sugerido que una mutación en el residuo 133 reivindicado, que es glicosilado en la proteína de tipo silvestre producida en humanos y en los animales bovinos, sería la que más probablemente tendría la actividad *in vitro* más reducida.

Teniendo en cuenta los lineamientos de D1 para optar por sustituciones conservadoras, y la información que la técnica anterior había demostrado que la glicosilación en la treonina en hG -CSF contribuye positivamente a la actividad biológica, la persona medianamente versada en la materia habría esperado que la mutación de treonina 134 en hG-CSF conduciría a una reducida actividad biológica, en comparación con otras posiciones que satisfacen las orientaciones de D1. **La persona medianamente versada en la materia habría esperado que la mutación T133 en bG –CSF tuviese un efecto adverso sobre la actividad de la proteína.** En consecuencia, dicha persona no habría esperado que bG -CSF T133pAF -20K PEG estuviera entre las variantes que tiene la actividad biológica menos reducida. Los datos de bG -CSF T133pAF -20K PEG en la Tabla 9 son, por tanto, una evidencia objetiva de **no evidencia**.

6

En la presente invención se caracterizó aún más la actividad *in vivo* de bG -CSF PEGilado y T133pAF bG -CSF T133pAF en los Ejemplos 26-28. Véase, por ejemplo, las figuras 16-19 y las Tablas 10-12. En particular, la administración de una inyección única (en una de dos dosis) de PEGilado bG -CSF T133pAF a una vaca, 7 días antes de la fecha de parto esperada, **resultó en la mejora de la morbilidad y la mortalidad en comparación con dosis diarias de BG-CSFT133pAF.** Véase la Tabla 10. D1 sugiere generalmente que la pegilación de una proteína 4IIB puede mejorar la vida media de suero con respecto a la forma no conjugada. Ver [494]. Sin embargo, D1 no aporta ninguna orientación para predecir el grado de mejora para la mutación de un residuo aminoácido en particular. Por lo tanto, la persona con habilidad ordinaria en la técnica no habría tenido ninguna base para esperar los resultados presentados en la Tabla 10, donde los resultados indican que la administración de dosis diarias de la proteína Bg-CSF T-133-pAF no PEGilada reduce la incidencia de nuevas infecciones de mastitis clínica. Adicionalmente, la administración de PEG de 20K de Bg-CSF T-133-pAF reduce significativamente la incidencia de nuevas infecciones de mastitis clínica con relación a las inyecciones diarias de Bg-CSF T-133-pAF no PEGilada y lleva a la reducción numérica en el número de mortalidades.

TABLA 10		
Descripción de Tratamiento	Morbidez	Mortalidad
Salina Estéril (SIDx2, Día -7 y Día 0)	26/50 (52%)	4
bG-CSF T133-pAF (3 µg/kg, SIDx14, Día-7, Día 0)	16/49 (33%)	6
bG-CSF T133-pAF 20K PEG (40 µg/kg, SIDx2, Día -7 y Día 0)	6/33 (11%)	2
bG-CSF T133-pAF 20K PEG (20 µg/kg, SIDx2, Día -7 y Día 0)	7/52 (13%)	3

D1 tampoco proporciona ninguna base para predecir el grado en que el recuento absoluto de neutrófilos máxima (ANC) se verá afectada por la mutación en cualquier residuo particular de hG -CSF. Del mismo modo, la información de D1 no proporciona una orientación para predecir el grado o la duración del elevado ANC de cualquier mutación particular de hG -CSF. Nada en D1 enseñaba los resultados contenidos en la Figura 16 de la presente solicitud, que evidencia que animales tratados con bG-CSF PEGilado exhiben un incremento marcado en ANC dentro de las 8 horas posteriores al tratamiento. Además, los valores de máximos de ANC se observaron luego de 72 horas después del tratamiento. El conteo de neutrófilos absolutos desciende entre 4 a 5 veces luego de 5 días y se mantiene en ese nivel hasta el día 10, a partir del cual los valores se reducen hasta 3,5 veces sobre el nivel de pretratamiento y allí se continúa hasta el día 14. **Estos**

resultados indican que la bG-CSF de la invención permite obtener actividad hematopoyética con una única inyección y que ésta persiste al menos por dos semanas. Por lo tanto, la persona medianamente versada en la materia no contaba con ninguna orientación para extrapolar dichos resultado a mutaciones realizadas en bovinos de G-CSF, con una expectativa razonable de éxito en la medida que las propiedades son modificadas o mejoradas.

Así las cosas, la presente invención ha llevado con éxito a la práctica una variante específica de G-CSF bovina pegilada y demostrado su actividad biológica, tanto in vitro como in vivo. En particular, los datos in vivo respecto a la morbilidad y la mortalidad, y los datos in vivo relativos a la magnitud y/o duración de la elevada ANC, no podrían haber sido predichos sobre la base de las enseñanzas de D1.

Sumado a lo anterior y basándonos en el contenido del Instructivo para el Examen de Solicitudes de Patentes de Invención y Modelos de Utilidad de la Superintendencia de Industria y Comercio⁴, que señala: “El examen de nivel inventivo debe realizarse mediante el método problema – solución, así:

- Identificar el estado de la técnica cercano a la invención.
- Determinar la diferencia entre la invención reivindicada y estado de la técnica cercano.
- Definir ¿qué efecto técnico produce el incluir esa diferencia?
- ¿Cuál es el problema técnico objetivo?
- Definir si la selección es inventiva. Si la respuesta a las siguientes preguntas: (a) ¿La persona medianamente versada en la materia reconocería el problema?; (b) ¿Lo resolvería de la forma reivindicada, con base en el estado de la técnica, sin realizar un esfuerzo inventivo? es afirmativa, entonces puede concluirse que la selección reivindicada es obvia.

Para el caso que nos ocupa, el documento más cercano es D1, las diferencias entre la invención reivindicada y D1 es que el polipéptido de la invención es que el polipéptido G-CSF es un polipéptido bovino que comprende una sustitución con para-acetilfenilalanina en la posición 133 de SEQ ID NO: 1 o la posición 134 de SEQ ID NO: 2 y está unido a un polímero soluble en agua que comprende un motivo poli(etilen)glicol. Dichas diferencias hace que el polipéptido

⁴ Instructivo Examen de Solicitudes de Patentes de Invención y Modelo de utilidad. Superintendencia de Industria y Comercio. 2012. Sección 3.5. 5, Páginas 194. Relativo al Examen de *Nivel inventivo* relativo a Patentes de Selección (disponible electrónicamente en http://api.sic.gov.co/Documentos/Guia_Examen_Patentes.pdf)



reivindicado mejore la morbilidad y la mortalidad de terneros, incluso si se le compara con dosis diarias de BG- CSFT133pAF, puesto que reduce la incidencia de nuevas infecciones de mastitis clínica y lleva a la reducción numérica en el número de mortalidades, al tiempo que genera un incremento marcado en ANC dentro de las 8 horas posteriores al tratamiento y una curva de mantenimiento que indica que la bG-CSF de la invención permite obtener actividad hematopoyética con un única inyección y que ésta persiste al menos por dos semanas.

Ahora bien, el problema técnico objetivo era eliminar o minimizar los inconvenientes asociados a la actividad y la producción de polipéptidos bG-CSF, y producir un polipéptido bG-CSF con propiedades biológicas mejoradas o farmacológicas y / o un mejor medio de vida terapéutico.

A la luz de los efectos inesperados antes evidenciados y del problema técnico que se deseaba resolver, es factible que una persona medianamente versada en la materia reconocería el problema. Sin embargo, partiendo de las enseñanzas de D1, dicha persona nunca resolvería el problema de la forma reivindicada, con base en D1 y sin realizar un esfuerzo inventivo, pues la solución planteada se basa en una sustitución no conservadora, efectuada en un sitio de glicosilación, lo cual es contrario a las enseñanzas de D1, que precisamente establecía que para no afectar la actividad del polipéptido cualquier sustitución debía ser conservadora, más cuando dicha sustitución se realizaba en sitios de glicosilación, pues según D2, la glicosilación en G-CSF humana contribuye positivamente a la estabilidad de pH y la estabilidad térmica. Así las cosas, una persona medianamente versada en la materia no habría efectuado una sustitución no conservadora en un punto de glicosilación pues lo que obtendría, según las enseñanzas de D1, era la reducción de la actividad.

En conclusión y en el mejor de los casos, D1 describe una hoja de ruta para la experimentación científica en un intento de producir variantes de G-CSF humano y entonces, determinar lo que podría exhibir "muestran una actividad superior y vida media prolongada." D1 sin embargo no proporciona orientación específica para dirigir a la persona medianamente versada en la materia hacia la producción de un polipéptido bG- CSF bovina que comprende una sustitución para-acetilfenilalanina en la posición 133 de la SEC ID N °: 1 o en la posición 134 de SEQ ID NO: 2, donde un polímero soluble en agua que comprende un motivo poli (etileno) glicol está unido al polipéptido en la para-acetilfenilalanina.

19

Las enseñanzas y los datos en D1 no son suficientes para dar la orientación específica experta en la materia sobre cualquier mutante específico de G- CSF humano que razonablemente se espera que retenga la actividad biológica. Además, D1 guarda completo silencio con respecto a su aplicabilidad en G-CSF bovina. Por lo tanto, la persona medianamente versada en la materia no tendría una base razonable para extrapolar las enseñanzas proféticas de D1 a G- CSF bovina, con alguna expectativa razonable de éxito de derivar la invención aquí reclamada.

7. Finalmente, me permito informar que para el concepto inventivo comprendido en la presente solicitud, ya fue concedida en Nueva Zelanda (bajo el registro N° 591235 emitido el 5 de noviembre de 2012) y en Panamá, (cuyo número de patente es 88368-01 de 1 de febrero de 2011).

Si bien es cierto que las concesiones de patentes en oficinas de otros países no son vinculantes en el sentido que obliguen a la SIC a tomar una decisión en el mismo sentido, considero que dichas concesiones sugieren el cumplimiento de los requisitos de patentabilidad de la materia reivindicada, ya que los criterios de evaluación y estudio aplicados para concluir la aceptación de dichas patentes resultan equivalentes a los que la SIC debe emplear.

8. Por todo lo anterior, considero que las objeciones presentadas por la Examinadora en su primer examen de fondo, han sido resueltas y por consiguiente solicito respetuosamente que el Despacho tenga por cumplidos los requisitos de patentabilidad y proceda con la concesión de la patente.

Atentamente,



CARLOS R. OLARTE
C.C. No. 79.782.747 de Bogotá
T.P. 74.295

Anexos:

- Capítulo Reivindicatorio Modificado
- Anexo 1. Calculation of number of hG-CSF variants



CAPÍTULO REIVINDICATORIO MODIFICADO

(Primer Examen de Fondo)

1. Un polipéptido bG-CSF que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, donde la posición 133 de la SEQ ID NO: 1 o la posición 134 de la SEQ ID NO: 2 está sustituida con una para-acetilfenilalanina; y en donde el polipéptido está unido a un polímero soluble en agua que comprende una fracción de poli(etilen)glicol.
2. El polipéptido bG-CSF de la Reivindicación 1, donde el polímero soluble en agua tiene un peso molecular entre aproximadamente 0,1 kDa y aproximadamente 100 kDa.
3. El polipéptido bG-CSF de la Reivindicación 1, donde el polímero soluble en agua tiene un peso molecular entre aproximadamente 0,1 kDa y aproximadamente 50 kDa.
4. El polipéptido bG-CSF de la Reivindicación 1, donde el polímero soluble en agua tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kDa.
5. El polipéptido bG-CSF de la Reivindicación 1, donde el polímero soluble en agua tiene un peso molecular de aproximadamente 30 kDa.
6. El polipéptido bG-CSF de la Reivindicación 1, donde el polímero soluble en agua tiene un peso molecular de aproximadamente 40 kDa.
7. El polipéptido bG-CSF de la Reivindicación 1, en donde dicho polímero soluble en agua tiene un peso molecular entre aproximadamente 10 kDa y aproximadamente 40 kDa, y donde dicho polipéptido bG-CSF exhibe al menos aproximadamente 20% de la actividad de la bG-CSF tipo silvestre in vitro, medida mediante el ensayo de proliferación M-NFS60.
8. El polipéptido bG-CSF de la Reivindicación 1, donde el polímero soluble en agua tiene un peso molecular entre aproximadamente 10 kDa y aproximadamente 40 kDa, y donde dicho polipéptido bG-CSF está caracterizado por inducir un conteo máximo absoluto de neutrófilos (ANC) aproximadamente 10 veces mayor que el ANC previo al tratamiento, medido aproximadamente 72 horas después de una única inyección subcutánea de 40 µg/kg en un ternero saludable.
9. El polipéptido bG-CSF de la Reivindicación 8, donde dicho polipéptido bG-CSF está caracterizado por inducir un conteo máximo absoluto de neutrófilos (ANC) al menos

aproximadamente 4 veces mayor que el ANC previo al tratamiento por al menos 7 días, medido después de una única inyección subcutánea de 40 µg/kg en un ternero saludable.

10. Un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido bG-CSF de la Reivindicación 1.
11. Un vector que comprende el polinucleótido aislado de la Reivindicación 10.
12. El vector de la Reivindicación 11, donde dicho vector comprende adicionalmente un ácido nucleico que codifica una ARNt ortogonal sintetasa y la ARNt ortogonal específica para la incorporación de para-acetilfenilalanina en bG-CSF.
13. Una célula hospedera que comprende al ácido nucleico de la Reivindicación 10 o el vector de las Reivindicaciones 11 o 12.
14. La célula hospedera de la Reivindicación 13, donde dicha célula además comprende una ARNt ortogonal sintetasa y la ARNt ortogonal para la incorporación de para-acetilfenilalanina en bG-CSF.
15. Un método para elaborar un polipéptido bG-CSF que comprende un aminoácido no codificado naturalmente, donde dicho método comprende:
 - a. Cultivar células hospederas de la Reivindicación 13, bajo condiciones que permitan la expresión del polipéptido bG-CSF;
 - b. Purificar el polipéptido bG-CSF; y
 - c. PEGilación del polipéptido bG-CSF.
16. Una composición que comprende el polipéptido bG-CSF de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9 y un portador farmacéuticamente aceptable.

ANEXO 1

APPENDIX: Calculation of number of hG-CSF variants

The number of unique variant polypeptides encompassed by the teachings of D1 is equal to the summation of the product of the number of combinations $C_{(n,r)}$ ¹ for each r and the number of unique combinations of non-naturally encoded amino acids for each r; where $C_{(n,r)}$ is:

$$\frac{n!}{r!(n-r)!}$$

and the number of unique variant polypeptides is:

$$\sum_{r=1}^{12} \frac{n!}{r!(n-r)!} a^r$$

where: (n) is the set size of 12 amino acid positions, and C is the summation over the subset size (r) from 1-12 and (a) is the non-naturally encoded amino acid set of 21.

EXAMPLE A: How many possible variants are there when 2 of the 12 residues are mutated with any of the 21 non-naturally encoded amino acids taught by D1?

For this calculation: n = 12; r = 2; and a = 21.

There are 66 different combinations of 2 mutations over the 12 residues:

$$C_{(n,r)} = \frac{12!}{2!(12-2)!} = \frac{12 \times 11}{2 \times 1} = 66$$

For each one of the 66 combinations, there are $21^2 = 441$ different combinations of non-naturally encoded amino acids. Therefore, the number of variants wherein 2 of the 12 residues can be mutated with any of the 21 non-naturally encoded amino acids is:

$$66 \times 441 = 29,106 \text{ different variants}$$

Japan Patent Application No.: 2011-520158

Title: "Modified Bovine G-CSF Polypeptides and Their Uses"

Aoyama Ref.: P238842 TI

Lilly Ref.: X18746_JP

¹ See, e.g., "CalcTool: Combinations, permutations calculator," at <http://www.calctool.org/CALC/math/probability/combinations> (Copyright © 2008).



EXAMPLE B: Example 5 in Cho describes hG-CSF variants comprising double mutants at four specific combinations of positions. How many possible variants are there for these 4 combinations, when mutated with any of the 21 non-naturally encoded amino acids taught by D1?

As explained in Example A, there are 66 unique combinations of 2 mutations over the 12 residues. Example 5 refers to 4 of these 66 unique combinations.

For each one of the 4 combinations, there are $21^2 = 441$ different combinations of non-naturally encoded amino acids. Therefore, the number of variants encompassed by prophetic Example 5 is:

$$4 \times 441 = 1764 \text{ different variants}$$