

CAVELIER

ABOGADOS

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTÁ 8, COLOMBIA

196
196
Teléfono: (57-1) 347 3611
Telefax: (57-1) 211 8650
(57-1) 540 0860
Fax in U.S.A.: (1-305) 381 9660

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 04-095972- -00005-0000

Fecha: 2007-10-12 17:27:15 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATLNTEIYII Lve: 378 FASENACIONAL
Act. 444 RESPULSTAREQUE Folios: 6

Señora Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

Trámite : 011

Evento : 378

Actuación : 444

Referencia : Expediente No. 04.095.972
Solicitante : **MICROSENS BIOPHAGE LIMITED**
Asunto : Solicitud de patente para **"ENLACE DE FORMAS
PATOLÓGICAS DE PROTEÍNAS PRIÓN"**
Fecha de solicitud : 27 de septiembre de 2004.

1. Yo, Emilio FERRERO, obrando como apoderado del solicitante en el asunto antes identificado, me refiero al Oficio No. **8725** notificado por fijación en lista del 19 de julio de 2007.

2. Mediante el Oficio No. **8725** se puso en conocimiento del solicitante el informe que contiene las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente.

Atiendo a las observaciones de la manera siguiente:

2.1. EXCEPCIONES DE PATENTABILIDAD

Ese Despacho considera que las reivindicaciones 1 a 37 de la presente invención se encuentran incursas en la excepción de patentabilidad del Art. 20, literal (d) de la Decisión 486.

198

El literal (d) del artículo 20 de la Decisión 486 establece:

"Artículo 20.- No serán patentables:

d) Los métodos terapéuticos o quirúrgicos para el tratamiento humano o animal, así como los métodos de diagnóstico aplicados a los seres humanos o a animales". (Subrayado fuera del texto)".

Así entonces, es claro que no todos los métodos de diagnóstico están excluidos de patentabilidad, únicamente aquellos "*aplicados a seres humanos o animales*". El término "aplicados a" en el texto de la excepción de patentabilidad es por consiguiente de clara y considerable importancia por cuanto los métodos de diagnóstico allí excluidos de este privilegio no son todos aquellos que de que de cualquier manera estén relacionados con humanos o animales sino solo aquellos que deben ser "aplicados" a ellos.

Así entonces, es claro que la excepción de patentabilidad se limita únicamente a aquellos métodos de diagnóstico que involucran la realización de un procedimiento sobre el cuerpo durante el proceso diagnóstico, y por ende, Los procesos *in vitro* no están incluidos dentro de dicha excepción.

A este respecto, respetuosamente ponemos de presente al Despacho que *El Manual Para El Examen De Solicitudes De Patentes de la Comunidad Andina*¹, documento que tiene por objeto la armonización de los procedimientos y prácticas en materia de patentes además de servir como elemento de trabajo para los examinadores de las Oficinas nacionales de patentes, ha sostenido lo siguiente:

¹ IEPI, BID. **"MANUAL PARA EL EXAMEN DE SOLICITUDES DE PATENTES DE INVENCION EN LAS OFICINAS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL DE LOS PAISES DE LA COMUNIDAD ANDINA"**. Quito, Ecuador 2004. Pág. 51.

"Métodos para obtener información del cuerpo humano o animal, que por sí solos no sean suficientes para tomar una decisión del tratamiento a seguir son patentable, si pueden ser llevados a cabo *sin* la intervención de un médico y solo por un técnico. Básicamente un método llevado a cabo fuera del cuerpo es poco probable que se considerado como excluido de patentabilidad"¹ (Subrayado fuera de texto).

En este mismo sentido La Doctrina ha sostenido lo siguiente:

"Se ha entendido que no quedan comprendidos en la exclusión de patentamiento.....los métodos de diagnóstico que se efectúen sobre tejidos u otra materias separadas del cuerpo y los métodos para obtener información que luego será utilizada para la elaboración de diagnósticos. También se han entendido como no comprendidos en la exclusión los métodos que solo proporcionan resultados intermedios o solo parciales"². (Subrayado fuera de texto).

De lo anterior y de los principios generales que sobre interpretación de la ley tiene nuestro ordenamiento jurídico se puede concluir que el texto de la excepción de patentabilidad es claro y que como excepción debe ser interpretada de manera restrictiva, de tal manera que si se trata de un método de diagnóstico que NO se practique sobre el cuerpo humano o animal, el mismo no puede estar comprendido dentro de dicha excepción.

Teniendo en cuenta lo anterior, respetuosamente ponemos de presente que el proceso de enlace selectivo reivindicado en la presente solicitud de patente (reivindicaciones 1 a 29) no es un método de diagnóstico y no está limitado a una aplicación médica. En efecto es

² CABANELLAS, Guillermo. "DERECHO DE LAS PATENTES DE INVENCION". Tomo I. Editorial Heliasta, Buenos Aires, 2001, Pág. 826.

simplemente un método para enlazar selectivamente formas particulares de proteínas, el cual es simplemente un proceso de laboratorio, una manipulación química. Adicionalmente, el pliego reivindicatorio no establece el requisito de que el proceso de enlace sea realizado sobre el cuerpo de un humano o de un animal o de que se requiera la presencia de un cuerpo humano o animal para la realización dicho proceso. Por lo tanto, los procesos revelados en las reivindicaciones no están comprendidos dentro de los métodos de diagnóstico exceptuados de patentabilidad.

Por su parte, el proceso de ensayo de las reivindicaciones 30 a 32 tampoco es aplicado en seres humanos o animales y se realiza en muestras de fluidos o tejidos corporales *in vitro*. Lo anterior es debidamente especificado en la reivindicación 30, a saber, "Un proceso de ensayo para la presencia de una forma agregada anormal de una proteína *en una muestra...*" lo cual claramente da a entender que el proceso reivindicado no se realiza en el cuerpo humano o animal sino que es *in vitro*.

A este respecto, respetuosamente ponemos de presente que "una muestra" por definición no está unida al cuerpo y que los ejemplos de la presente solicitud se realizaron *in vitro* empleando homogenato de cerebro como muestra para el ensayo. Por consiguiente el ensayo reivindicado es llevado a cabo en un cuerpo humano o animal vivo y como tal no está incurso en esta excepción de patentabilidad.

Adicionalmente, el proceso de ensayo de la presente invención simplemente proporciona información con respecto a la presencia o no de cierto tipo de molécula en una muestra dada, mas NO indica implícita o explícitamente la presencia de una enfermedad, ni la necesidad de un tratamiento específico. Por lo tanto las reivindicaciones 30 a 32 tampoco están incursas en esta excepción de patentabilidad.

Así entonces, solicitamos que a partir de la interpretación que a esta norma le ha dado tanto la Doctrina como el Manual Andino de Patentes y teniendo en cuenta el alcance dado a esta excepción de patentabilidad, se evalúe la patentabilidad de las

700

reivindicaciones 1 a 37, teniendo en cuenta que el literal d) del artículo 20 no es aplicable al presente caso.

2.2. USOS

Ese Despacho considera que las reivindicaciones 38 a 41 de la presente invención a pesar de no estar encabezadas como usos, reclaman moléculas conocidas en el estado de la técnica indicando la forma en la que pueden ser dispuestas y que pueden ser empleadas en un proceso para el enlace de proteínas PRION agregantes.

A este respecto, respetuosamente ponemos de presente que aunque las moléculas nombradas en las reivindicaciones 38 a 41 fueran anteriormente conocidas, estas no fueron reivindicadas por si mismas sino como agentes de enlace con una porción de etiqueta enlazable. Adicionalmente, dichas reivindicaciones no mencionan el proceso en el cual los agentes de enlace deben ser usados sino cobijan clases de moléculas encontradas por los inventores para actuar como agentes de enlace en los ensayos de la presente invención, moléculas que han sido modificadas por la adición de una porción de etiqueta.

Por lo cual, respetuosamente ponemos de presente, que las reivindicaciones no hacen referencia a un uso ni a un segundo uso, sino por el contrario a un agente de enlace reivindicado con porciones de etiqueta enlazables que requiere que el poliglicósido polianiónico, la hexadimetrina y el agente de enlace policationico sean cada uno reivindicados como especies conjugadas a una porción de etiqueta enlazable, y por lo tanto, respetuosamente solicitamos se evalúe la patentabilidad de dichas reivindicaciones, puesto que las mismas se refieren a materia patentable de acuerdo con el artículo 14, esto es, a un producto caracterizado por características técnicas.

201

De la misma manera se debe proceder al estudio de patentabilidad de estas reivindicaciones por cuanto las mismas no se refieren a un segundo uso de un producto ya patentado, pues no existe evidencia alguna en el expediente de la patente que se le hubiera otorgado al mismo y por ende, no caen bajo la excepción de patentabilidad del artículo 21 de la Decisión 486.

3. Puesto que se han atendido a cabalidad las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente, atentamente solicito que se continúe su tramitación.

Bogotá,
Señora Jefe,



EMILIO FERRERO

T.P.A. No. 31.929

Elimination of prions by branched polyamines and implications for therapeutics

Surachai Supattapone^{*†}, Hoang-Oanh B. Nguyen^{*†}, Fred E. Cohen^{**§}, Stanley B. Prusiner^{*†§||}, and Michael R. Scott^{*†}

^{*}Institute for Neurodegenerative Diseases and Departments of [†]Neurology, [‡]Molecular and Cellular Pharmacology, and [§]Biochemistry and Biophysics, University of California, San Francisco, CA 94143-0518

Contributed by Stanley B. Prusiner, October 5, 1999

We report that branched polyamines, including polyamidoamide dendrimers, polypropyleneimine, and polyethyleneimine, are able to purge PrP^{Sc}, the protease-resistant isoform of the prion protein, from scrapie-infected neuroblastoma (ScN2a) cells in culture. The removal of PrP^{Sc} by these compounds depends on both the concentration of branched polymer and the duration of exposure. Chronic exposure of ScN2a cells to low noncytotoxic concentrations of branched polyamines for 1 wk reduced PrP^{Sc} to an undetectable level, a condition that persisted at least 3 wk after removal of the compound. Structure-activity analysis revealed that a high surface density of primary amino groups is required for polyamines to eliminate PrP^{Sc} effectively from cells. The removal of PrP^{Sc} by branched polyamines is attenuated by chloroquine in living cells, and exposure of scrapie-infected brain extracts with branched polyamines at acidic pH rendered the PrP^{Sc} susceptible to protease *in vitro*, suggesting that endosomes or lysosomes may be the site of action. Our studies suggest that branched polyamines might be useful therapeutic agents for treatment of prion diseases and perhaps a variety of other degenerative disorders.

neurodegeneration | protein conformation

Prion diseases are a group of fatal neurodegenerative disorders that can occur in hereditary, sporadic, and infectious forms (1). These illnesses occur in humans and a variety of other animals (2). Prions are infectious proteins. The normal cellular form of the prion protein (PrP), designated PrP^C, contains three α -helices and has little β -sheet; in contrast, the protein of the prions, denoted the scrapie form of PrP (PrP^{Sc}), is rich in β -sheet structure. The accumulation of PrP^{Sc} in the central nervous system precedes neurologic dysfunction accompanied by neuronal vacuolation and astrocytic gliosis.

The spectrum of human prion diseases includes kuru (3), Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) (4), Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease, fatal familial insomnia (5, 6), and a new form of human prion disease, new variant CJD (nvCJD), which has emerged in Great Britain and France (7-9). Several lines of evidence have suggested a link between the nvCJD outbreak and a preceding epidemic of bovine spongiform encephalopathy (7, 10-12). Although it is too early to predict the number of nvCJD cases that might eventually arise in Great Britain and elsewhere (8), it is clear that effective therapeutics for prion diseases are urgently needed. Unfortunately, although a number of compounds including amphotericins, sulfated polyanions, Congo red dye, and anthracycline antibiotics, have been reported as prospective therapeutic agents (13-16), all have demonstrated only modest potential to impede prion propagation, and none have been shown to effect the removal of preexisting prions from an infected host.

Here we report that noncytotoxic concentrations of branched polyamines can rapidly eliminate PrP^{Sc} from chronically infected ScN2a cells. These compounds appear to act by stimulating normal cellular mechanisms to destroy PrP^{Sc}. Once purged of prions, the treated cells remain free from evidence of scrapie infection during repeated serial passage in polyamine-free media. It remains to be determined whether branched polyamines will find use as therapeutic agents in prion diseases and other

degenerative central nervous system disorders characterized by deposits of abnormal proteins such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis, and frontotemporal dementia (17-23).

Materials and Methods

Chemicals. High molecular-weight (MW) polyethyleneimine (PEI) was purchased from Fluka. N-(1-[2,3-dioleoyloxy]propyl)-N,N,N-trimethylammonium methylsulfate (DOTAP), cationic lipid was purchased from Boehringer Mannheim, and SuperFect transfection reagent was purchased from QIAGEN (Valencia, CA). All other compounds were purchased from Sigma-Aldrich. All test compounds were dissolved in water at stock concentration of 3 mg/ml and filtered through a Millipore 0.22- μ m filter.

Cultured Cells. Stock cultures of ScN2a cells were maintained in MEM with 10% FBS/10% Glutamax (GIBCO BRL)/100 units/ml penicillin/100 mg/ml streptomycin (supplemented MEM). Immediately before addition of test compounds, the dishes were washed twice with fresh supplemented MEM. After exposure to test compounds, dishes were drained of media, and cells were harvested by lysis in 0.25-1 ml 20 mM Tris, pH 8.0, containing 100 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40, and 0.5% sodium deoxycholate to obtain a total protein concentration of 1 mg/ml measured by the bicinchoninic acid assay (Pierce). Nuclei were removed from the lysate by centrifugation at 2,000 $\times$ g for 5 min. For samples not treated with proteinase K, 40 μ l of whole lysate (representing 40 μ g total protein) was mixed with an equal volume of 2 $\times$ SDS reducing sample buffer. For proteinase K digestion, 20 mg/ml proteinase K (Boehringer Mannheim) (total protein/enzyme ratio, 50:1) was added, and the sample was incubated for 1 h at 37°C. Proteolytic digestion was terminated by the addition of Pefabloc (Boehringer Mannheim) to a final concentration of 5 μ M. One-milliliter samples were centrifuged at 100,000 $\times$ g for 1 h at 4°C, the supernatants were discarded, and the pellets were resuspended in 80 μ l of reducing SDS sample buffer for SDS/PAGE.

Brain Homogenates. Brain homogenates from RML scrapie-affected CD-1 mice [10% (wt/vol) in sterile water] were prepared by repeated extrusion through syringe needles of successively smaller size, from 18 to 22 gauge. Nuclei and debris were removed by centrifugation at 1,000 $\times$ g for 5 min. The bicinchoninic acid protein assay was used to determine protein concentration. Homogenates were adjusted to 1 mg/ml protein in 1% Nonidet P-40. For reactions, 0.5 ml homogenate was incubated with 25 μ l 1.0 M buffer (sodium acetate for pH 3-6 and Tris acetate for pH 7-10) plus or minus 10 μ l of polyamine stock

Abbreviations: PAMAM, polyamidoamide; PPI, polypropyleneimine; PEI, polyethyleneimine; ScN2a, scrapie-infected neuroblastoma; PrP, prion protein; PrP^C, cellular form of PrP; PrP^{Sc}, scrapie isoform of PrP; MW, molecular weight; MoPrP, mouse PrP.

[†]To whom reprint requests should be addressed at: Institute for Neurodegenerative Diseases, Box 0518, University of California, San Francisco, CA 94143-0518.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

Table 1. Removal of PrP^{Sc} by polymer compounds

Compound	Molecular weight	Primary NH ₂ groups	IC ₅₀ , ng/ml
PAMAM generation 0.0	517	4	>10,000
PAMAM generation 1.0	1,430	8	>10,000
PAMAM generation 2.0	3,256	16	2,000
PAMAM generation 3.0	6,909	32	400
PAMAM generation 4.0	14,215	64	80
PAMAM-OH generation 4.0	14,279	0	>10,000
PPI generation 2.0	773	8	2,000
PPI generation 4.0	3,514	32	80
Low-MW PEI	~25,000		2,000
Average-MW PEI	~60,000		400
High-MW PEI	~800,000		80
Linear PEI	~60,000		2,000
poly(L-lysine)	~60,000	>500	10,000
SuperFect			400

All compounds were tested at five different concentrations. PrP^{Sc} levels were measured by densitometry of Western blot signals.

IC₅₀, approximate concentration of polymer required to reduce PrP^{Sc} to 50% of control levels in ScN2a cells after exposure for 16 h.

of plasmid DNA. Indeed, treatment with SuperFect caused the disappearance of PrP^{Sc} from ScN2a cells in a dose-dependent manner (Fig. 1C). The concentration of SuperFect required to eliminate >95% of preexisting PrP^{Sc} with a 3-h exposure was 150 μ g/ml (lane 4). Duration of treatment also influenced the ability of SuperFect to remove PrP^{Sc} from ScN2a cells: exposure to 150 μ g/ml SuperFect for 10 min did not affect PrP^{Sc} levels (data not shown), whereas 7.5 μ g/ml SuperFect eliminated all detectable PrP^{Sc} with a $t_{1/2}$ = 8 h (Fig. 1D).

Polyamines with a High Surface Amino Group Density Are the Most Effective at Eliminating PrP^{Sc}. SuperFect is a mixture of branched polyamines derived from heat-induced degradation of a polyamidoamide (PAMAM) dendrimer (30). Therefore, we investigated the ability of several other branched and unbranched polymers to eliminate PrP^{Sc} from ScN2a cells (Table 1). The branched polymers investigated include various preparations of PEI as well as intact PAMAM and polypropyleneimine (PPI) dendrimers. Dendrimers are manufactured by a repetitive divergent growth technique, allowing the synthesis of successive well-defined "generations" of homodisperse structures (Fig. 2). The potency of both PAMAM and PPI dendrimers in eliminating PrP^{Sc} from ScN2a cells increased as the generation level increased: the most potent compounds with respect to eliminating PrP^{Sc} were PAMAM generation 4.0 and PPI generation 4.0, whereas PAMAM generation 1.0 showed very little ability to eliminate PrP^{Sc} (Table 1). Similarly, a high-MW fraction of PEI was more potent than low-MW PEI.

From the foregoing data, it is clear that for all three branched polyamines tested, increasing molecular size corresponded to an increased potency for eliminating PrP^{Sc}. To determine whether this trend was directly attributable to increased surface density of amino groups on the larger molecules, we also tested PAMAM-OH generation 4.0, a dendrimer that resembles PAMAM generation 4.0 except that hydroxyls replace amino groups on its surface. Unlike PAMAM generation 4.0, PAMAM-OH generation 4.0 did not cause a reduction of PrP^{Sc} levels even at the highest concentration tested (10 μ g/ml), establishing that the amino groups are required for the elimination of PrP^{Sc} by PAMAM (Table 1). In an effort to assess the contribution of the branched architecture to the clearing ability of polyamines for PrP^{Sc}, we also tested the linear molecules poly(L-lysine) and linear PEI. Both of these linear compounds were less potent than a preparation of branched PEI with similar

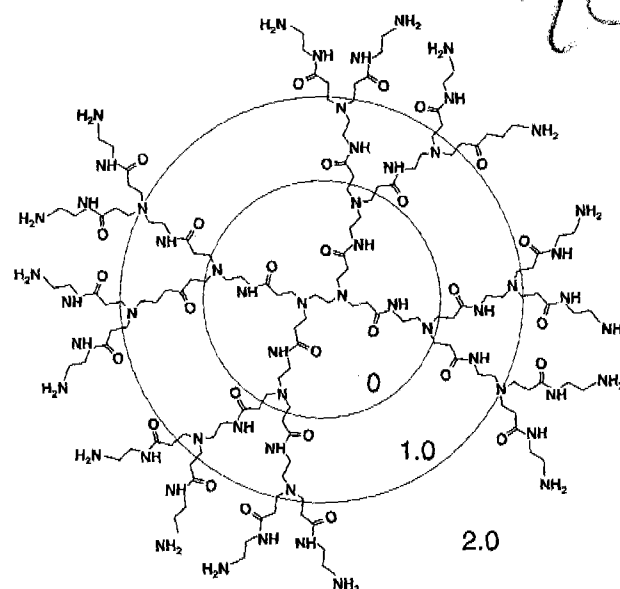


Fig. 2. Schematic diagram of PAMAM, generation 2.0 (ethylene diamine core). Successive full generations are indicated by concentric circles.

average-MW (Table 1), establishing that a branched molecular architecture optimizes the ability of polyamines to eliminate PrP^{Sc}, presumably because the branched structures achieve a higher density of surface amino groups.

Kinetics of PrP^{Sc} Elimination by Polyamines. The preceding results demonstrate the potent ability of branched polyamines to clear PrP^{Sc} from ScN2a cells within a few hours of treatment. To explore whether these compounds could be used as a potential therapeutic for treatment of prion disease, we tested whether they were cytotoxic for ScN2a cells, using as criteria cell growth, morphology, and viability as measured by trypan blue staining. None of the compounds was cytotoxic to ScN2a cells after exposure for 1 wk at concentrations up to 7.5 μ g/ml (data not shown). To determine whether branched polyamines can cure ScN2a cells of scrapie infection without affecting cell viability, we next examined the kinetics of prion clearance in the presence of a noncytotoxic concentration (7.5 μ g/ml) of three different branched polyamines. ScN2a cells were exposed to SuperFect, PEI, or PAMAM generation 4.0 (Fig. 1D) for varying periods of time, and the kinetics of PrP^{Sc} elimination were assessed by Western blotting. All three compounds caused a substantial reduction in PrP^{Sc} levels after 8–16 h of treatment, and of the three compounds, PEI appeared to remove PrP^{Sc} most quickly, with a $t_{1/2}$ = 4 h (Fig. 1D).

Curing Neuroblastoma Cells of Scrapie Infection. Encouraged by our success in reversing the accumulation of PrP^{Sc} in ScN2a cells under noncytotoxic conditions, we established that an extended exposure to even lower levels of the branched polyamines (1.5 μ g/ml) was sufficient to eliminate PrP^{Sc} (data not shown). On the basis of these findings, we used this protocol to determine whether the severe reduction in PrP^{Sc} levels after exposure to branched polyamines would persist after removal of the compounds. After the exposure of ScN2a cells to a 1.5 μ g/ml SuperFect for 1 wk, PrP^{Sc} was reduced to <1% of the baseline level but then increased back to $\approx$ 5% of the baseline level after 3 additional wk in culture in the absence of polyamine (Fig. 3A). In contrast, after exposure to 1.5 μ g/ml of either PEI or PAMAM generation 4.0 for 1 wk, PrP^{Sc} was completely elimi-

Characterization and polyanion-binding properties of purified recombinant prion protein

Debbie B. BRIMACOMBE*, Alan D. BENNETT*¹, Fred S. WUSTEMAN†, Andrew C. GILL*, Janine C. DANN* and Christopher J. BOSTOCK*

*Institute for Animal Health, Compton, Newbury, Berks. RG20 7NN, U.K., and †School of Molecular and Medical Biosciences, University of Wales, P.O. Box 911, Cardiff CF1 3US, U.K.

Certain polysulphated polyanions have been shown to have prophylactic effects on the progression of transmissible spongiform encephalopathy disease, presumably because they bind to prion protein (PrP). Until now, the difficulty of obtaining large quantities of native PrP has precluded detailed studies of these interactions. We have over-expressed murine recombinant PrP (recPrP), lacking its glycosphosphoinositol membrane anchor, in modified mammalian cells. Milligram quantities of secreted, soluble and partially glycosylated protein were purified under non-denaturing conditions and the identities of mature-length aglycosyl recPrP and two cleavage fragments were determined by electrospray MS. Binding was assessed by surface plasmon resonance techniques using both direct and competitive ligand-binding approaches. recPrP binding to immobilized polyanions

was enhanced by divalent metal ions. Polyanion binding was strong and showed complex association and dissociation kinetics that were consistent with ligand-directed recPrP aggregation. The differences in the binding strengths of recPrP to pentosan polysulphate and to other sulphated polyanions were found to parallel their *in vivo* anti-scrapie and *in vitro* anti-scrapie-specific PrP formation potencies. When recPrP was immobilized by capture on metal-ion chelates it was found, contrary to expectation, that the addition of polyanions promoted the dissociation of the protein.

Key words: pentosan polysulphate, prion, prophylactic, scrapie, surface plasmon resonance.

INTRODUCTION

Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) are fatal neurodegenerative diseases that include scrapie of sheep, bovine spongiform encephalopathy and human Creutzfeldt–Jakob disease. During TSE disease progression, a host-encoded cell-surface glycoprotein, PrP^C (cellular prion protein), is altered to a partially proteinase K-resistant form, PrP^{Sc} (the scrapie-specific isoform of prion protein). This TSE-specific change is associated with an increase in the β -sheet structure of the protein and occurs without clearly identifiable covalent modifications to either the amino acid sequence or the C-terminal glycosphosphoinositol (GPI) membrane anchor [1]. PrP^{Sc} accumulates in insoluble amorphous aggregates as scrapie-associated fibrils, which may be observed by electron microscopy [2], and, less commonly, as larger amyloid plaques, which may be visualized by light microscopy [3]. Although some TSE infectivity and PrP^{Sc} co-purify, the precise nature of the aetiological agent and a molecular understanding of TSE strain variation remain elusive [4].

Experimental animal models have demonstrated that, once clinical signs appear, TSEs are invariably fatal and that certain polysulphated compounds can delay disease if administered around the time of peripheral TSE inoculation [5]. Cell-culture studies have shown that these polyanions can decrease cell-surface PrP^C levels [6] and, with persistently scrapie-infected

cells, reduce or permanently inhibit conversion of PrP^C to PrP^{Sc} [7,8]. With several polyanions this irreversible loss of PrP^{Sc} production is associated with complete loss of scrapie infectivity in subsequent animal titration experiments (C. Birkett, personal communication). Other studies have shown that PrP^C released from the surface of cultured neuroblastoma cells binds to heparin, a sulphated polyanion closely related to cellular glycosaminoglycans (GAGs), and that other polyanions can block this binding [8,9]. In addition, scrapie amyloid plaques have been shown to contain GAGs associated with PrP^{Sc} [3]. These data suggest that anti-scrapie polyanions act by competing directly with the binding of cellular GAGs to PrP^C and/or PrP^{Sc}. It is therefore important to study the binding of polyanions to PrP^C to provide information on the mode of action of these therapeutic compounds.

Only small amounts of native PrP^C can be extracted from brain, the most concentrated natural source [10–12], whereas many molecular structure and function analyses require larger amounts of purified, soluble and non-denatured protein. Several groups have expressed recombinant PrP (recPrP) in a range of gene-expression systems [13], but those capable of providing milligrams of recPrP per litre of culture have produced material that is denatured, truncated and/or fused to another protein. We describe the stable expression, in mammalian cells, of recPrP genetically modified to prevent GPI attachment. Milligram

Abbreviations used: DELFIA, dissociation-enhanced lanthanide fluorescence immunoassay; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; GAG, glycosaminoglycan; GMEM-S, Glasgow minimal essential medium for methionine sulfoximine selection; GPI, glycosphosphoinositol; IDA, iminodiacetic acid; NTA, nitrilotriacetic acid; ORF, open reading frame; PNGase F, peptide N-glycosidase F; PrP, prion protein; *Prn-p*, prion protein gene; *Prp*, prion protein structural gene; PrP^C, cellular prion protein; PrP^{Sc}, scrapie-specific isoform of prion protein; PPS, pentosan polysulphate; recPrP, recombinant prion protein; SPR, surface plasmon resonance; TSE, transmissible spongiform encephalopathy.

¹ To whom correspondence should be addressed (e-mail Alan.Bennett@bbsrc.ac.uk).

205

205

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES**

Abogado
Emilio Ferrero

ASUNTO	Radicación	04-95972
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	430
	Oficio	
	Folios	7 10565

Como resultado del examen de fondo, realizado con fundamento en el artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica:

1. Documentos estudiados

<u>Descripción:</u>	Folios: 87 a 166 como se radicó inicialmente.
<u>Reivindicaciones:</u>	Folios 167 a 173 como se radicó inicialmente.
<u>Dibujos:</u>	Folios 175
<u>Respuestas del solicitante:</u>	Folios 196 a 201 del 12/10/2007
<u>Prioridad:</u>	GB 0204797.5 2002-02-28 GB 0210808.6 2002-07-18 GB 0229614.3 2002-12-19

2. Objeto de la invención

Título de la solicitud: **"Enlace de formas patológicas de proteínas PRION"**

La presente solicitud se refiere a un proceso para el enlace selectivo de las formas anormales agregantes de proteínas en la presencia de la forma no agregante de la proteína que comprende poner en contacto un material poli iónico, resistente a proteasa, que tiene avidez por la forma agregante de la proteína, con una muestra que puede contener las dos formas alternativas. Las condiciones de unión pueden incluir un agente competitivo que presenta una avidez menor por la forma agregante en comparación con el material poli aniónico. Adicionalmente, tras el enlace de la forma agregante, se adiciona una proteasa. El material poli-ionico puede comprender una multiplicidad de grupos aniónicos o catiónicos y el material de competencia presenta una cantidad menor de grupos iónicos que el material poli-ionico. El presente método es útil en el diagnóstico de encefalopatía bovina, antes que el animal presente signos clínicos.

IPC: G01N 33/68

3. De la solicitud de Patente

206

3.1. Reivindicaciones (artículo 30 D 486)

El capítulo reivindicatorio presenta imprecisiones en su formato actual:

- 1) La cláusula 1 no permite definir la invención actual puesto que no se menciona para que proteínas va dirigido el proceso, que tipo de material se pone en contacto con el enlace selectivo, ni cual es el agente de enlace selectivo. De la manera como esta reivindicado este proceso de enlace, se puede aplicar a cualquier tipo de enfermedad que genere una anomalía en proteínas agregadas, y por tanto el estado del arte podría afectar la novedad de la invención.
- 2) Se sugiere al solicitante ajustar la totalidad del capítulo reivindicatorio de forma que sea claro el objeto de la solicitud. Si este objeto es un agente de enlace para un tipo de proteína específico debe ser reivindicado como tal, con su estructura, alternativas, y características técnicas definidas.
- 3) Las reivindicaciones independientes deben hacer mención a todos los elementos que son nombrados en las correspondientes reivindicaciones dependientes, de manera que las características técnicas mencionadas en las últimas estén circunscritas en las primeras.

De esta manera, el capítulo reivindicatorio presentado no cumple con los requisitos establecidos en el art. 30 de la Decisión 486.

4. **Excepción a la patentabilidad (artículo 20 D486 literal a)-d))** (según causal)

A pesar de los argumentos del solicitante, esta oficina mantiene la opinión que aún cuando la totalidad de la invención no se trate de un método de diagnóstico (si es definido el producto de enlace de manera concreta en el capítulo reivindicatorio), si hay reivindicaciones que hacen alusión al mismo. Este es el caso de las reivindicaciones 30 y dependientes, las cuales tratan sobre un proceso de ensayo para la presencia de una forma agregada anormal de una proteína de la muestra. Este ensayo resulta en el diagnóstico de encefalopatía en ganado bovino. (BSE).

De acuerdo con lo anterior la materia reclamado en las cláusulas 30 a 32 estaría exceptuada de patentabilidad a la luz del literal d) del artículo 20 de la D. 486.

5. **Determinación del Estado de la Técnica**

La fecha que se ha tenido en cuenta para determinar el Estado de la Técnica es:

Fecha de presentación de la solicitud prioritaria: 28/02/2002

Teniendo en cuenta la fecha indicada se realizó la búsqueda en el estado de la técnica de documentos relacionados con la solicitud encontrándose los siguientes documentos más relevantes:

Nº	Documento	Título	Fecha de publicación
D1	Supattapone, <i>et al.</i> PNAS, vol 96 (Nº25):14529-14534	"Elimination of prions by branched polyamines and implications for therapeutics"	07/12/1999
D2	Brimacombe, <i>et al.</i> Biochem.J., vol 342:605-613	"Characterization and polyanion-binding properties of purified recombinant prion protein"	1999

207

6. Análisis de patentabilidad (artículo 14 D486)

6.1. Nivel inventivo (artículo 18 D486)

La solicitud en estudio reclama un proceso para el enlace selectivo de una forma anormal agregada de una proteína en presencia de una forma normal no agregada de la proteína, caracterizado porque comprende poner en contacto bajo condiciones de enlace selectivo un material que contiene tanto las formas anormales como normales de un agente de enlace que es un material poli-iónico que tiene una fuerza de enlace para la forma agregada de la proteína como se presenta en la muestra (reivindicaciones 1-37).

Adicionalmente, la solicitud reclama un agente de enlace, caracterizado porque es un poliglicósido polianiónico, hexadimetrina, o un agente de enlace policationico conjugado a una porción de etiqueta enlazable, en donde el agente de enlace puede inmovilizarse en un medio sólido por el enlace de la porción de etiqueta enlazable a un agente de captura en el medio sólido (reivindicaciones 38-41).

En el documento de Supattapone, *et.al.* (D1), se divulga la unión selectiva que tienen los compuestos de tipo poliaminas ramificadas, por ejemplo: dendrímeros de poliamidoamina, polipropileneimina, polietileneimina, a la forma de proteína prion resistente a la proteasa PrP^{Sc}, en células en cultivo (ver resumen; pág 14531-columna izq).

La diferencia entre D1 y la solicitud en estudio, es que las pruebas de unión selectiva se habían realizado y comprobado para células en cultivo. Sin embargo, las pruebas *in-vivo* e *in-vitro* con este tipo de agentes enlazantes, en especial polianiones polisulfatados, fueron divulgadas en el documento de Brimacombe (D2) (ver resumen, materiales y métodos).

Con lo anterior, es evidente que de la combinación de D1 y D2 una persona versada en la materia tenía el conocimiento de cuales eran los agentes enlazantes que se unen selectivamente a las proteínas prion PrP^{Sc}, que se pueden utilizar en muestras biológicas y de esta manera podría desarrollar la invención tal como es planteada en la solicitud. De esta manera, el desarrollo reclamado se deriva evidentemente del estado de la técnica y por lo tanto carece de actividad inventiva, de acuerdo con lo estipulado en el artículo 18 de la D486.

7. Conclusión:

Los requisitos de patentabilidad de la presente solicitud se encuentran afectados así:

N°	Documento N°	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D1	Supattapone, <i>et.al.</i> PNAS, vol 96 (N°25):14529-14534	1-41	Nivel Inventivo
D2	Brimacombe, <i>et.al.</i> Biochem.J., vol 342:605-613	1-41	Nivel inventivo

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de sesenta días contados a partir de la fecha de notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento, o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el artículo 8 de la resolución reglamentaria No. 00210 del 15 de enero de 2001, advirtiéndole que contra él no procede recurso alguno en la vía gubernativa.

208

ALIX CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha

CONCEPTO TECNICO No. 2963	EXAMINADOR TECNICO 202052
-------------------------------------	-------------------------------------