

LLOREDA & CIA. S. A.
ABOGADOS

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 05-007268- -00006-0000

Fecha: 2008-07-29 16:41:09 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 85

OTA - COLOMBIA
INA FUNDADA EN 1941
RTADO AEREO 12304
57-1-3264270 57-1-6069700
57-1-3264271 57-1-6069701

CABLES: LLOREDA
CALLE 72 No. 5-83 5º. PISO
www.lloredacamacho.com
jlcco@lloredacamacho.com

Señor

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____ D. _____

Re: P1.-GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.-Solicitud de Patente de
Invención en Fase Nacional PCT para "COMPOSICIONES DE VACUNAS QUE
COMPRENDEN LIPOOLIGOSACÁRIDOS DEL INMUNOTIPO L2 Y/O L3 A
PARTIR DE IgtB(-) NEISSERIA MENINGITIDIS".-Clase A61K 39/095.-
Expediente número 05-007.268.-

1. Me refiero al auto dictado por ese Despacho notificado por fijación en lista de 14 de Marzo de 2008 y a mi memorial de plazo de 11 de Junio del mismo año.

2. Antes de responder las objeciones presentadas por el señor Examinador en el mencionado auto, me permito manifestar que es deseo del solicitante modificar el título de la presente solicitud.

Dicha modificación obedece al hecho que se cometió un error involuntario en la escritura del título de la solicitud en estudio en fase internacional, consignando de manera errónea la palabra "*Meningitidis*" como "*Minigitidis*".

De esta forma el nuevo título de la invención se lee como sigue:

**"COMPOSICIONES DE VACUNAS QUE COMPRENDEN
LIPOOLIGOSACÁRIDOS DEL INMUNOTIPO L2 Y/O L3 A PARTIR DE
IgtB(-) NEISSERIA MENINGITIDIS"**

3. Con el fin de responder las objeciones presentadas por el señor Examinador en su Concepto Técnico número **649** bajo los acápites de claridad de la solicitud y unidad de invención, me permito dirigir su atención a las siguientes modificaciones y argumentos técnicos, por medio de los cuales se superan completamente dichas objeciones.

4. En primera instancia, y antes de entrar a discutir los argumentos técnicos y las

LLORED & CIA. S. A.

dirigida a reivindicar en forma particular las realizaciones preferidas que se encuentran bajo el alcance de la presente invención.

Por lo tanto, debidamente autorizado por el solicitante, y de conformidad con el Artículo 36 de la Decisión Andina 486 de 2000, el Artículo 7 del Decreto 2591 de 13 de Diciembre de 2000 y el Artículo 11 de la Resolución No. 00210 de 15 de Enero de 2001, se ha dividido la presente solicitud de patente en dos **(2)** solicitudes, a saber:

- (1) Una solicitud original compuesta por **29 reivindicaciones** que encuentran su sustento en la descripción y en el capítulo reivindicatorio originalmente presentado a ese Despacho con la presente solicitud número **05-007.268**, y que corresponden específicamente a las reivindicaciones **1 a 8, 12 a 20 y 40 a 52** que actualmente se encuentran bajo estudio, sobre las cuales se han hecho modificaciones con el fin de superar las objeciones de claridad de la solicitud hechas por el señor Examinador, tal como se expondrá más adelante en este mismo memorial.

De esta manera, el capítulo reivindicatorio de la solicitud número **05-007.268** original, se encuentra ahora **dirigido a proteger únicamente las preparaciones de vesículas o LOS derivadas de una cepa de Neisseria del inmutotipo L2 y/o L3.** (Grupo 2 ISR).

- (2) Una solicitud fraccionada número **05-007.268A** que presenta un nuevo capítulo reivindicatorio constituido por **22** reivindicaciones que encuentran su sustento tanto en la descripción como en el capítulo reivindicatorio originalmente presentados, y que corresponden a la materia objeto de las reivindicaciones **9 a 11 y 21 a 39** actualmente presentadas para la solicitud original número **05-007.268**.

De esta manera, la nueva solicitud fraccionada número **05-007.268A** se encuentra **dirigida a proteger las preparaciones de vesículas de cepas que tienen dos o más proteínas de membrana externa reguladas hacia niveles menores de expresión, o que pertenecen a bacterias Gram-negativas.**

Finalmente, me permito señalar que **dadas las modificaciones realizadas en el capítulo reivindicatorio debidas al fraccionamiento de la presente solicitud, dicho capítulo reivindicatorio hace referencia únicamente a las preparaciones de**

LLORED & CIA. S. A.

Me permito señalar, además, que la aseveración del señor Examinador en cuanto a que "cada genotipo se considera como una invención independiente" carece de fundamento, toda vez que, tal como se expone claramente en la descripción de la presente solicitud, la característica fundamental que agrupa a las preparaciones de la invención es el tipo de Lipooligosacáridos (LOS) que contienen.

El solicitante comprobó que si se emplean vesículas o LOS derivados de cepas de Neisseria de los inmutotipos L2 y/o L3, se obtiene sorprendentemente una buena respuesta inmunológica contra Neisseria. Como sería evidente para la persona versada en la materia, y como se considera en la descripción de la solicitud en estudio, **más de una cepa de Neisseria puede expresar LOS de los inmutotipos L2 y/o L3.** Por lo tanto, no podría considerarse que cada "genotipo" en particular sea una invención separada, porque bacterias con genotipos distintos (al ser cepas diferentes) comparten la característica común de presentar lipooligosacáridos L2 ó L3.

De esta forma, **tal como se presenta el capítulo reivindicatorio modificado de la solicitud original, se está haciendo referencia a preparaciones de vesículas que comparten un único concepto inventivo: el derivarse de cepas con inmutotipos L2 y/o L3, siendo esta característica fundamental para su buena actividad inmunológica, y que resuelven el mismo problema técnico, que es proporcionar una preparación que sea eficaz y segura para una vacuna humana contra la infección de Neisseria.**

5. Acompaño los documentos que detallo a continuación, relacionados con cada una de las solicitudes resultantes del presente fraccionamiento:

- (1) **SOLICITUD No. 05-007.268: "COMPOSICIONES DE VACUNAS QUE COMPRENDEN LIPOOLIGOSACÁRIDOS DEL INMUNOTIPO L2 Y/O L3 A PARTIR DE IgtB(-) NEISSERIA MENINGITIDIS".**

(a) Recibo número 08 - 57,492, expedido por la Superintendencia de Industria y Comercio, que acredita el pago de las modificaciones expuestas anteriormente; y

(b) Nuevo capítulo reivindicatorio modificado compuesto por **29 reivindicaciones** que comprende las reivindicaciones 1 a 8, 12 a 20 y 40 a 52 actualmente presentadas, reenumeradas como nuevas reivindicaciones 1 a 29, cuyo sustento se encuentra adicionalmente en la

LLORED & CIA. S. A.

(2) **SOLICITUD DIVISIONAL A: "COMPOSICIONES DE VACUNAS QUE COMPRENDEN LIPOOLIGOSACÁRIDOS".**

- (a) Recibo número 08 - 58,366 expedido por la Superintendencia de Industria y Comercio, que acredita el pago de los derechos que causa el presente fraccionamiento;
- (b) Páginas 1 a 42 del texto de la descripción que corresponden al originalmente presentado en la solicitud número **05-007.268** inicialmente presentada;
- (c) Páginas 43 a 46 del nuevo capítulo reivindicatorio compuesto por **22** reivindicaciones que comprenden las reivindicaciones 9 a 11 y 21 a 39 actualmente presentadas en la solicitud número **05-007.268**, reenumeradas como nuevas reivindicaciones 1 a 22, las cuales encuentran pleno sustento en la descripción y en el capítulo reivindicatorio presentado con la solicitud número **05-007.268** inicialmente radicada;
- (d) Extracto de la solicitud, en sus dos formas, que incluye el título que se encuentra de acuerdo con el objeto de la presente invención fraccionada y que incluye la reivindicación 1;
- (e) Fotocopia del documento que acredita el traspaso que los autores del invento de la referencia, hacen a favor de mí representado de sus derechos sobre el mismo junto con la Traducción Oficial número 104/05;
- (f) Tarjeta de propietario; y
- (g) Formato Único de Conversión, División y Fusión de Solicitudes número 2000-14.

LLORED A & CIA. S. A.

6. CLARIDAD DE LA SOLICITUD

6.1 CAPÍTULO DESCRIPTIVO

Por otro lado, el señor Examinador objeta la claridad y suficiencia del capítulo descriptivo de la solicitud en estudio, resaltando varios puntos que serán discutidos a continuación:

- 1) El señor Examinador señala que dentro de la descripción de la presente solicitud *"se encuentran frases sin sentido técnico coherente, lo que se percibe como errores de traducción"*.

Sobre este particular, me permito manifestar que el solicitante ha realizado una revisión minuciosa de la traducción al español de la descripción de la solicitud, encontrando efectivamente errores gramaticales en dicha traducción, y omisiones de frases, e incluso de párrafos completos, que sí estaban incluidos dentro de la solicitud internacional WO2004/014417.

Por lo tanto, siendo dichos errores involuntarios, cometidos al momento de la traducción al idioma Español de la solicitud presentada en fase internacional, se han realizado las correcciones pertinentes, que se incluyen en el nuevo capítulo descriptivo anexo a este memorial.

Me permito resaltar que dichas correcciones no amplían de forma alguna el alcance de la invención como fue originalmente presentada, toda vez que su único propósito es el de modificar la descripción presentada de forma tal que sea una fiel traducción de aquella que hace parte de la solicitud internacional.

Así, se revisó y corrigió en general la redacción de todo el texto para hacerla más clara para el lector. Adicionalmente, se sustituyeron algunos términos incorrectamente traducidos; por ejemplo, la palabra *"ampolla"*, empleada como traducción del término en inglés *"bleb"*, ha sido sustituida a lo largo de toda la solicitud por la traducción más precisa *"vesícula"*.

A continuación se resumen los principales cambios que se han realizado dentro el texto de la descripción. Como se mencionó anteriormente se corrigió en general la redacción de todo el texto, aunque no se enumeran todos los apartes donde se realizó dicha corrección. Me permito resaltar que las páginas a las cuales se hace mención en este memorial corresponden a las páginas de la

LLOREDA & CIA. S. A.

- Página 1, se reemplaza "*meningetidis*" por "***meningitidis***".
- Página 2, se reemplazan los términos "*loa*" por "*los*" y "*químicamente*" por "*química*".
- Página 3, se reemplaza los términos "*basta*" por "***rugosa***", "*sialilación*" por "***sialización***". Se introducen líneas faltantes, correspondientes a las líneas 28 a 20 de la página 2, de la solicitud internacional WO2004/014417.
- Página 4, se corrige la redacción de la frase final de los párrafos primero y tercero; se introduce en el primer párrafo líneas faltantes correspondientes a las líneas 12-13 de la página 3, de la solicitud internacional WO2004/014417.
- Página 6, se introduce en el último párrafo líneas faltantes, correspondientes a las líneas 9-10 de la página 5, de la solicitud internacional WO2004/014417.
- Página 7, se incluyen en el primer párrafo las líneas faltantes correspondientes a las líneas 15 y 16 de la página 5 de la solicitud internacional WO2004/014417.
- Página 8, se corrige la redacción del primer párrafo, se reemplaza "*LPS*" por "*LOS*", tal como se encuentra en la solicitud internacional WO2004/014417. Se incluyen dentro del primer párrafo líneas faltantes, correspondientes a las líneas 8 a 11 de la página 6, de la solicitud internacional WO2004/014417.
- Página 10, se corrige la redacción del tercer párrafo, se incluye un párrafo faltante correspondiente a las líneas 10 a 17 de la página 8, de la solicitud internacional WO2004/014417.
- Página 12, se reemplaza el término "*cisternas*" por su traducción correcta "***cisteínas***". Se incluye un párrafo faltante correspondiente a la línea 29 de la página 9 hasta la línea 3 de la página 10, de la solicitud internacional WO2004/014417.
- Página 14, se corrige la redacción de los párrafos 1 y 2.
- Página 15, se han introducido párrafos faltantes correspondientes a la línea 33 página 11 hasta la línea 4, página 12, y líneas 16 a 31, página 12, de la solicitud internacional WO2004/014417.
- Página 16, se incluye el párrafo correspondiente a la línea 31, página 13, hasta la línea 4 página 14, de la solicitud internacional WO2004/014417.
- Página 17, se corrigen los términos "*ltB*" por "***lgtB***" y "*B16B16*" por "***B16B6***".
- Página 18, se corrige la redacción del último párrafo, se incluye un párrafo faltante correspondiente a las líneas 15 a 24, página 15, de la solicitud internacional WO2004/014417.
- Página 19, se incluyen las expresiones "*(como las lisinas en las proteínas de*

LLOREDA & CIA. S. A.

WO2004/014417. Se corrige la expresión "*i mg/g*" por su correcta correspondencia "*1 mg/mg*".

- Página 21, se incluye el párrafo faltante, correspondiente a la línea 30, página 17 hasta la línea 4, página 18, de la solicitud internacional WO2004/014417.
- Página 22, se corrige el término "*alud*", por su correcta equivalencia "**alum**".
- Página 24, se reemplaza "*H. meningitidis*" por "**N. meningitidis**".

De esta forma, el capítulo descriptivo corregido, incluye todo lo revelado en la solicitud presentada en fase internacional, sin contener errores de traducción, siendo de esta forma completamente claro para la persona versada en la materia.

- 2) Adicionalmente, el señor Examinador asegura que *"Con la información presentada podría concluirse que las cepas se constituyen como desarrollos anteriores (las denominaciones presentadas son conocidas con anterioridad y si se produjo una modificación esta no se muestra exactamente, lo que es necesario para su diferenciación) y que el desarrollo que se trata de describir es una composición uni o multiantigénica proveniente de estas cepas modificadas genéticamente; sin embargo la evidencia mostrada no es clara ni contundente en ninguna de las dos vías"*.

Sobre este particular me permito manifestar que el capítulo descriptivo corregido enseña claramente que **el objeto de la invención no lo constituyen nuevas cepas bacterianas, sino una preparación de vesículas o de lipooligosacáridos (LOS) provenientes de cepas de Neisseria conocidas que son del inmunotipo L2 o L3.** Como claramente lo muestra la descripción, dicho inmunotipo puede ser expresado por más de una cepa, por ejemplo cepas L2 pueden ser B16B6 menB ó 39E tipo C, ó 760676 (página 17 de la descripción originalmente presentada, página 16, descripción modificada).

Adicionalmente, la preparación de vesículas de la invención o los LOS extraídos de ellas pueden provenir de cepas con la mutación *IgtB(-)*, tal como lo señala la descripción:

*"Un primer aspecto de la invención es una **composición inmunogénica** para la prevención o tratamiento de enfermedad de Neisseria (preferiblemente meningocócica o meningocócica B) **que comprende LOS***

LLOREDA & CIA. S. A.

preparaciones de vesícula de membrana externa (o bleb) derivadas de cepas de Neisseria L2 y L3 (Página 5 descripción originalmente presentada, página 5 descripción modificada, resaltado fuera de texto).

"Los mutantes lgtB- se prefieren más ya que los inventores han encontrado que es el truncamiento óptimo para resolver la cuestión de seguridad mientras todavía mantienen un epítipo de oligosacárido protector de LOS que todavía puede inducir una respuesta de anticuerpo bactericida (o incluso bactericida cruzada)" (Página 8, descripción originalmente presentada, página 7, descripción modificada).

Como se muestra claramente en los ejemplos consignados, por primera vez se ha demostrado que este tipo de LOS (y las vesículas que los comprenden) mantienen la habilidad de elicitar anticuerpos bactericidas contra meningococos (ver Ejemplos 3 y 5), y además remueve un epítipo que presenta una estructura similar a la de los carbohidratos de los glóbulos rojos humanos (ver Ejemplo 6).

Me permito resaltar que los ejemplos 3 y 5 muestran que la mutación lgtB(-), que trunca la cadena alfa de LOS, no quita el epítipo protector, como podría esperarse, dada la importancia de la cadena alfa en la inmunogenicidad de LOS. Teniendo en cuenta su antigenicidad y su seguridad, dichas estructuras de LOS son altamente adecuadas para su uso en vacunas humanas.

Así, la descripción de la presente solicitud muestra de forma clara el objeto de la invención y, por medio de los ejemplos consignados, permite a la persona versada en la materia reproducir la invención y comprender las ventajas técnicas de dicha invención con respecto al estado del arte más próximo.

- 3) De igual forma el señor Examinador señala que *"las tablas de los ejemplos no son claras, no se logra establecer la relación entre las mismas y la breve descripción de cada ensayo que las introduce, tampoco es posible corroborar las conclusiones que se presentan después de cada una. Igualmente no se presentan las unidades de las variables resumidas en estas tablas. Además, el origen biológico de cada antígeno no es claro y la composición(es) antigénica(s) probada(s) no logra determinarse"*.

Con respecto a este particular, me permito señalar que la descripción corregida como se discutió anteriormente, es clara para la persona versada en la materia,

LLOREDA & CIA. S. A.

En primer lugar, contrario a lo asegurado por el señor Examinador, los ejemplos claramente señalan de que cepa se deriva los LOS o las vesículas empleados en cada caso, identificando por tanto el "*origen biológico*" de cada antígeno: en el ejemplo 2, H44/76 de meningococo B, en el ejemplo 3, meningococo MC 58, ejemplo 4 H44/76, en el ejemplo 5 H44/76 siaD- PorA- L3 o de H44/76 siad-porA TrL3, en el ejemplo 7 cepa B1820, etc. Estos ejemplos también describen claramente que tipo de ensayo bactericida fue empleado, y cuales de las cepas murieron en cada ensayo.

En cuando a las unidades de cada tabla, me permito señalar que dichas tablas, tal como están presentadas, serían completamente claras para la persona versada en la materia. El ejemplo 3, muestra títulos bactericidas, los cuales no tienen unidades, sino que son una medida del título recíproco de suero requerido para matar el 50% de una muestra de bacteria. De este modo, un título de 1353 indica que se requiere menor cantidad de suero para matar el 50% de las bacterias, que un título de 21 (y, por lo tanto, que existe una cantidad mucho mayor de anticuerpos protectores en la muestra).

De igual forma, en la tabla correspondiente al ejemplo 7 los números indican la suma del incremento de temperatura (en grados centígrados) que ocurre en los animales luego de recibir una vacuna en un ensayo estándar de pirogenicidad de LOS (como se considera en la Farmacopea Europea), tal como se muestra claramente en las convenciones consignadas al final de la tabla.

Por su parte, las tablas del ejemplo 8 no tienen unidades. La primera corresponde a la media geométrica de los títulos, GMT (Geometric mean titres), que no tiene unidades, y la segunda a los títulos del ensayo bactericida en suero, SBA, cuyos títulos tampoco tiene unidades. En esta tabla el número de "respondedores" está dado por una fracción del número total de animales que respondieron, por lo que no se requiere unidades.

Así mismo, la siguiente tabla hace referencia a ensayos ELISA anti-Hsf; aunque las unidades no se presentan en la tabla, la persona versada en la materia estaría familiarizada con los ensayos de ELISA y reconocería que es común dentro de la técnica no suministrar dichas unidades porque se sobre entiende que si son resultados de un ensayo de ELISA, se está haciendo referencia a valores en μg de anticuerpo por ml de suero. Por lo tanto, los resultados consignados en dicha tabla serían claramente interpretados por dicha persona

LLOREDA & CIA. S. A.

Sumado a lo anterior, antes de suministrar los resultados, se hace una descripción breve de las condiciones y reactivos empleados en cada ensayo, y posteriormente se hace un resumen e interpretación de dichos resultados. La persona versada en la materia encontraría en estas indicaciones elementos suficientes para concluir que dichos ensayos son prueba de la efectividad de las preparaciones de vesículas o de LOS de la invención.

Consecuentemente, la persona versada en la materia, a la cual va dirigida la presente solicitud, encontraría que los ejemplos consignados en la descripción, junto con las tablas correspondientes a los resultados de cada ensayo, son claras al revelar las preparaciones de vesículas o de LOS de la invención.

- 4) De otro lado, el señor Examinador asegura que *"no se entiende si los ensayos presentados se refieren a retos inmunológicos con los antígenos de la invención de los cuales se pretende probar una inmunidad cruzada"*.

Me permito señalar que, tal como se ha discutido anteriormente, todos los ejemplos consignados en la descripción muestran de forma clara que tipo de cepas se emplearon en cada caso para obtener las vesículas y/o los LOS, que ensayo se realizó, y que resultados se obtuvieron.

De esta forma, el ejemplo 3 describe la preparación de las vesículas con LOS truncados con la mutación IgtB^- . La tabla muestra que la muerte de las cepas menigocócicas por el suero elicitado por dichas vesículas todavía es efectivo, pero si la cadena alfa es nuevamente truncada los títulos de SBA se reducen (esto muestra nuevamente que la truncación de IgtB^- es sorprendentemente óptima para la generación de una vacuna basada en LOS). Esto es igualmente claro en el ejemplo 9.

Por su parte, el ejemplo 5 muestra que los LOS contenidos en las vesículas son los responsables de la actividad. Al extraer las vesículas con un nivel alto de desoxicolato se reduce el nivel de LOS en las vesículas, afectando la habilidad de estas para elicitar anticuerpos bactericidas.

Así mismo, el ejemplo 6 muestra que la truncación IgtB^- de LOS remueve lo suficiente del epítipo de glóbulos rojos humanos, para evitar que los anticuerpos anti-LOS produzcan un aglutinamiento de glóbulos rojos humanos.

LLOREDA & CIA. S. A.

Por otro lado, el ejemplo 11 muestra que una mutación adicional (msbB⁻) puede detoxificar los LOS por la remoción de un acilo secundario de las cadenas de la molécula.

De esta forma, la persona versada en la materia encontraría que todos estos ejemplos son una evidencia clara de que los antígenos basados en LOS como los descritos en la invención son eficaces y seguros para el uso en vacunas.

- 5) Finalmente, el señor Examinador asegura que *"se presenta inconsistencia con el capítulo reivindicatorio, al no encontrar sustento para gran parte de la materia reclamada"*.

Sobre este particular, me permito manifestar que el capítulo reivindicatorio modificado, tal como se expuso anteriormente en este mismo memorial, reclama únicamente las preparaciones de vesículas de *Neisseria* que han sido evaluadas dentro de los ensayos revelados en la descripción, discutidos anteriormente.

De esta forma, el capítulo reivindicatorio modificado cuenta con pleno sustento en la descripción de la presente solicitud.

Por último, me permito manifestar que dadas las correcciones realizadas sobre la descripción de la solicitud, y los argumentos expuestos anteriormente, dicho capítulo descriptivo es claro y suficiente al reclamar las preparaciones de vesículas y de LOS de la invención, cumpliendo por lo tanto con lo preceptuado en el Artículo 28 de la Decisión 486 de 2000.

6.2 CAPÍTULO REIVINDICATORIO

Por otro lado, el señor Examinador objeta la claridad y concisión del capítulo reivindicatorio por considerar que este no define concretamente el objeto de la invención, señalando puntualmente algunas de las reivindicaciones presentadas.

Sobre este particular, me permito manifestar que es deseo del solicitante modificar el capítulo reivindicatorio de forma tal que este sea completamente claro y conciso al reclamar las composiciones y preparaciones de vesículas objeto de la invención.

Al igual que en el caso del capítulo descriptivo se ha revisado y corregido la

LLOREDA & CIA. S. A.

De esta forma, el nuevo capítulo reivindicatorio queda constituido por **29 reivindicaciones**, que tienen como base las originalmente presentadas, modificadas para brindar mayor claridad al objeto de la invención, tal como se discutió anteriormente en este mismo memorial.

Me permito señalar que dichas modificaciones no constituyen de forma alguna una ampliación del alcance de la invención, tal como fue originalmente presentada, toda vez que tienen como único propósito hacer más clara la reclamación, y delimitar inequívocamente la invención, tal como se muestra a continuación:

- **REIVINDICACIONES 1 A 8.** Estas reivindicaciones no han sido modificadas y corresponden a las originalmente presentadas. **Se ha revisado la redacción de estas reivindicaciones haciendo correcciones donde ha sido necesario.**
- **REIVINDICACIONES 9 A 11.** Me permito manifestar que, es deseo del solicitante **eliminar estas reivindicaciones del capítulo reivindicatorio.**
- **REIVINDICACIÓN 12 (nueva reivindicación 9).** Esta reivindicación ha sido **modificada en su redacción** de forma tal que sea claro que se trata de una preparación de LOS derivada de las mismas cepas de Neisseria de las cuales se han realizado las preparaciones de vesículas consideradas en las reivindicaciones 1 a 8.
- **REIVINDICACIONES 13 A 18 (nuevas reivindicaciones 10 a 15).** Estas reivindicaciones no han sido modificadas y corresponden a las originalmente presentadas. **Se ha ajustado la dependencia de estas reivindicaciones a la nueva numeración.**
- **REIVINDICACIÓN 19 (nueva reivindicación 16).** Se ha incluido dentro de esta reivindicación la **aclaração de que el proceso de obtención de las vesículas de Neisseria involucra las mismas cepas de las cuales se ha hecho referencia en las reivindicaciones 1 a 8.**
- **REIVINDICACIÓN 20 (nueva reivindicación 17).** Esta reivindicación no ha sido modificada y corresponde a la originalmente presentada. **Se ha corregido la dependencia acorde con la nueva numeración.**
- **REIVINDICACIONES 21 A 39.** Me permito manifestar que con el propósito de clarificar el objeto de la invención y debidamente autorizado por mí representado, **estas reivindicaciones han sido eliminadas del capítulo reivindicatorio.**

LLOREDA & CIA. S. A.

- **REIVINDICACIÓN 40 (nueva reivindicación 18).** Se ha modificado esta reivindicación de manera que se **aclara que el proceso de obtención de vesículas conjugadas intra-vesícula que se está reclamando se realiza con una cepa de Neisseria, la cual opcionalmente puede ser lgtB(-).**
- **REIVINDICACIONES 41 A 47 (nuevas reivindicaciones 19 a 25).** Estas reivindicaciones no han sido modificadas y corresponden a las originalmente presentadas. **Se ha ajustado la dependencia acorde con la nueva numeración.**
- **REIVINDICACIÓN 48.** Acorde con la modificación realizada en la reivindicación 40 (nueva reivindicación 18), **esta reivindicación ha sido eliminada del capítulo reivindicatorio.**
- **REIVINDICACIONES 49 A 52 (nuevas reivindicaciones 26 a 29).** Estas reivindicaciones no han sido modificadas y corresponden a las originalmente presentadas. **Se ha corregido la dependencia de estas reivindicaciones consecuentemente con la nueva numeración.**

Me permito resaltar que dichas modificaciones hacen que el capítulo reivindicatorio, sea claro y conciso al reclamar las preparaciones de vesículas y de LOS de la invención.

A continuación me permito discutir las objeciones presentadas por el señor Examinador con respecto al capítulo reivindicatorio, con el fin de demostrar que las modificaciones realizadas superan completamente dichas objeciones.

- 1) En primera instancia, el señor Examinador asegura que *"no se define concretamente el objeto de la invención, sino que se caracteriza a partir de opciones indeterminadas"*.

Sobre este particular me permito señalar que la persona versada en la materia, a la cual va dirigida la presente solicitud, encontraría claramente dentro de las reivindicaciones que hacen parte del capítulo reivindicatorio modificado, que el objeto de la invención son ***preparaciones de vesículas de Neisseria o de LOS contenidos en ellas***, que tienen como característica fundamental que tienen un inmunotipo L2 y/o L3 y que opcionalmente tienen la mutación lgtB(-).

Las características adicionales de las cepas a partir de las cuales se obtienen las *LOS* para las preparaciones de la invención, son descritas en las

LLOREDA & CIA. S. A.

Adicionalmente, las preparaciones de vesículas o de LOS objeto de la solicitud en estudio, pueden ser empleadas en composiciones de vacuna, por lo que las reivindicaciones 13, 14 y 15 hacen referencia a dichas vacunas.

De igual forma, el proceso de obtención de las vesículas es importante, sobre todo si son reticuladas intra-vesícula, porque dependiendo de su preparación se obtendrán diferentes resultados de inmunogenicidad. Por esta razón, otra realización de la invención es el procedimiento para producir las preparaciones de vesículas de la invención, el cual es considerado en las nuevas reivindicaciones 16 a 29.

De esta forma, el capítulo reivindicatorio modificado describe y caracteriza de forma clara y concreta el objeto de la invención.

- 2) El señor Examinador también asegura que dentro del capítulo reivindicatorio *"no se establecen los componentes específicos de las preparaciones desarrolladas"*.

Me permito resaltar que, tal como se discutió anteriormente, el capítulo reivindicatorio modificado, muestra de forma clara que las preparaciones de la invención contienen vesículas de Neisseria de los inmunotipos LOS L2 y/o L3, ó LOS aislados de dichas vesículas.

De igual forma, las reivindicaciones 13 a 15 establecen que para la composición inmunogénica o vacuna de la invención la preparación de vesículas o de LOS provenientes de Neisseria L2 y/o L3, deben ser mezcladas con un adyuvante y excipientes farmacéuticamente aceptables.

Así, el capítulo reivindicatorio establece de forma clara los componentes de las preparaciones objeto de la invención.

- 3) Por otro lado, el señor Examinador señala que *"las preparaciones no pueden definirse a partir del origen biológico de las vesículas, ni de las características de las cepas de las que se obtienen"*.

A este respecto me permito señalar que siendo el objeto de la invención preparaciones de vesículas derivadas de cepas de Neisseria, la forma más clara y apropiada de definir a que tipo de vesículas se está haciendo referencia, es la de delimitar las características de la cepa bacteriana a partir de la cual se obtienen.

Quiero llamar la atención de ese Despacho al hecho de que **el problema que se**

LLORED A & CIA. S. A.

Para este fin se emplean vesículas derivadas de estas bacterias (dichas vesículas son producidas por las bacterias como parte fundamental de su proceso de infección) y los LOS contenidos en ellas.

El solicitante encontró de forma sorprendente las características ventajosas que tienen las preparaciones de la invención con respecto al las existentes en el estado del arte.

Siendo dichas vesículas naturalmente producidas muchas bacterias Gram-negativas, la manera más adecuada para delimitar el alcance de la invención, es hacer referencia al inmutotipo específico que poseen las bacterias a partir de las cuales se obtienen las vesículas de la invención y las características genómicas adicionales que hacen que la preparación sea completamente segura en el uso en humanos.

Así, **no todas las cepas de Neisseria expresan los inmutotipos L2 y L3, por lo que no todas podrían emplearse para obtener las vesículas o los LOS que hacen parte de las preparaciones de la invención.** De igual forma, las mutaciones posteriores (como la mutación lgtB') proporcionan características adicionales de seguridad en el uso en humanos, por lo que la referencia a la disminución o aumento de la expresión de ciertas proteínas ó oligosacáridos complementa la caracterización de las vesículas o de los LOS de la invención.

- 4) De igual forma, el señor Examinador señala que *"se caracterizan preparaciones por comparaciones, actividad buscada y propiedades que no corresponden con la esencia de las mismas"*.

Me permito resaltar que el capítulo reivindicatorio modificado describe y caracteriza de la forma más adecuada las preparaciones de la invención. Como se discutió anteriormente, las características a las cuales se hacen referencia en las reivindicaciones se constituyen en la única forma en la cual la persona versada en la materia podría identificar de manera inequívoca el alcance de la invención, y por lo tanto no se hace referencia a *"comparaciones"*, *"actividad buscada"* o características que no sean esenciales de las preparaciones objeto de la presente solicitud.

- 5) Por otro lado, el señor Examinador asegura que *"se reclama materia sin sustento descriptivo"*, por que según su criterio *"tampoco hay prueba de un solo ensayo que corresponda con otras especies de bacterias Gram Negativas"*.

LLOREDA & CIA. S. A.

A este respecto me permito manifestar que el capítulo reivindicatorio como ha sido modificado cuenta con pleno sustento en la descripción de la presente solicitud, tal como se ha discutido anteriormente.

Dichas modificaciones eliminaron del capítulo reivindicatorio las reivindicaciones que hacían referencia a otras bacterias Gram negativas (reivindicaciones 21 a 39), por lo que el capítulo reivindicatorio modificado sólo reclama preparaciones que contienen vesículas o LOS obtenidos de **cepas de Neisseria** de los inmutipos L2 ó L3, tal como se describen en los ejemplos específicos de la descripción.

- 6) El señor Examinador también señala que *"se incluye materia que corresponde con desarrollos a priori de la invención reclamada"*.

Sobre este particular me permito señalar que el objeto primordial de la invención son las preparaciones que contienen vesículas o LOS derivados de cepas de Neisseria de los inmutipos L2 y/o L3, las cuales son efectivas y seguras para su uso como vacunas en humanos. La solicitud no pretende reclamar una mutación específica de una cepa bacteriana, sino la preparación de vesículas derivadas de ellas, la cual no ha sido reportada dentro del estado de la técnica.

- 7) El señor Examinador además señala que *"se utilizan términos vagos e imprecisos y rangos especulativos"*.

A este respecto me permito señalar que la redacción actual del capítulo reivindicatorio no incluye ningún término que pueda ser considerado como *"impreciso"* y que los rangos incluidos en las reivindicaciones corresponden con aquellos considerados en los ejemplos específicos consignados en la descripción por lo cual no pueden clasificarse como *"especulativos"*.

- 8) Por último el señor Examinador considera que *"la redacción actual de todas las cláusulas es confusa"* señalando por ejemplo la reivindicación 21.

Me permito señalar que las reivindicaciones incluidas en el capítulo reivindicatorio modificado están redactadas de forma tal que son completamente claras para la persona versada en la materia. De igual forma, y tal como se ha dicho anteriormente, **la reivindicación 21 ya no hace parte de la presente solicitud.**

LLOREDA & CIA. S. A.

Finalmente me permito resaltar que el capítulo reivindicatorio modificado es claro y conciso al reclamar las preparaciones objeto de la invención, cumpliendo de esta forma con lo preceptuado en el Artículo 30 de la Decisión 486 de 2000.

7. CONCLUSIÓN

Por último me permito resaltar que, dadas las modificaciones realizadas en el capítulo reivindicatorio como consecuencia del fraccionamiento de la presente solicitud, el capítulo reivindicatorio modificado reclama únicamente las preparaciones de vesículas o de LOS derivados de Neisseria de los inmutotipos L2 y/o L3, constituyéndose por tanto en una sola unidad de invención.

Por su parte, las correcciones realizadas al capítulo descriptivo y los argumentos discutidos hacen que dicho capítulo sea claro y suficiente al revelar las preparaciones materia de la presente solicitud.

De igual forma, el capítulo reivindicatorio modificado es claro y conciso al reclamar dichas preparaciones de vesículas y LOS de la invención.

8. Por otro lado, dado que la fecha de presentación de la solicitud resultante del presente fraccionamiento es la misma **--28 de Enero de 2005--** atentamente solicito a usted se sirva dar a la solicitud fraccionada el mismo número de Expediente de la solicitud original, acompañada de la letra **A** para su identificación. Adicionalmente, la Clasificación Internacional para esta solicitud fraccionada, acorde con el objeto de la misma, es la siguiente: **A61K 39/095**.

9. En cuanto a las reivindicaciones de las **PRIORIDADES** respecto de la solicitud divisional, son las mismas invocadas en la solicitud original, las cuales fueron reivindicada oportunamente en Fase Internacional.

10. Ratifico a usted que la sociedad titular de la solicitud fraccionada en cuestión es **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**; organizada y existente de conformidad con las leyes Bélgica y domiciliada en Rixensart, Bélgica.

11. Así mismo, reitero a usted que el documento que acredita mi calidad de Representante Legal en dicha sociedad para todos los asuntos de la Propiedad Industrial, fue presentado junto con la solicitud original el 28 de Enero de 2005.

LLOREDA & CIA. S. A.

12. De conformidad con lo establecido por el Artículo 36 de la Decisión Andina 486 de 2000, solicito a ese Despacho se sirva aceptar y estudiar la solicitud divisional presentada y conceder el privilegio de patente solicitado.

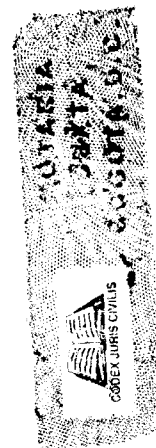
13. En vista de lo anterior, ruego a usted proceder a estudiar nuevamente la solicitud a la luz de las argumentaciones presentadas y de las modificaciones realizadas y conceder el privilegio de patente solicitado.

Señor Superintendente,



ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P. 53.215

NOTARIA S E X T A DE BOGOTÁ
RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL
 Bogotá, D.C. **29 JUL 2008**
 Ante mi **PABLO MENDEZ BARRALES**
NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE
BOGOTÁ
 Comparecieron:
Alicia Lloreda Ricaurte
 quien (as) exhibió (eron) C.C. No. **39'690.713**
 y declaró (aron) que la(s) firma(s) que aparece(n)
 en el presente documento es (son) la(s) suya (s) y
 que el contenido del mismo es cierto. En constancia se firma esta diligencia.




ALICIA LLOREDA RICAURTE
C.C. No. 39'690.713 de Usaquén

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 57,492
FECHA : JULIO 18 DE 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 05-007268- -00006-0000

Fecha: 2008-07-29 16:41:09 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 85

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLONDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	1859832	18/07/2008	6,734,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-03	CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	
		12 MARCAS Y LEMAS COMERCIALES	103,000.00
		TOTAL :	\$ 103,000.00

SDN: CIENTO TRES MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

REIVINDICACIONES

1. Una preparación de vesículas de *Neisseria* derivada de una cepa de *Neisseria* con un inmunotipo LOS L2 ó de una cepa de *Neisseria* con un inmunotipo LOS L3, y en la que la cepa es lgtB⁻, o una preparación de vesícula de *Neisseria* que comprende una combinación de vesículas derivadas de una cepa de *Neisseria* con un inmunotipo L2 LOS y una cepa de *Neisseria* con un inmunotipo LOS L3, en la que opcionalmente cada cepa es lgtB⁻.
2. La preparación de vesículas de *Neisseria* de la reivindicación 1, en la que la (s) cepa (s) de *Neisseria* son meningocócicas, preferiblemente serogrupo B.
3. La preparación de vesículas de *Neisseria* de la reivindicación 1 ó 2, en la que la (s) cepa (s) de *Neisseria* no pueden sintetizar polisacárido capsular.
4. La preparación de vesículas de *Neisseria* de la reivindicación 3, en la que la (s) cepa (s) de *Neisseria* tienen uno de los siguientes genes de polisacárido capsular regulados hacia niveles menores de expresión, y preferiblemente suprimidos, en comparación con la (s) cepa (s) nativa (s) a partir de la(s) cual(es) se derivan: ctrA, ctrB, ctrC, ctrD, synA, synB, synC o, preferiblemente, siaD; y en la que cuando las vesículas L2 y L3 están ambas presentes, las cepas de las que se derivan tienen preferiblemente el mismo gen de polisacárido capsular regulado hacia niveles menores de expresión en cada cepa.
5. La preparación de vesículas de *Neisseria* de las reivindicaciones 1-4, en la que la (s) cepa (s) de *Neisseria* tienen cualquier o ambos de los siguientes genes de lípido A regulado hacia niveles menores de expresión, y preferiblemente suprimidos, en comparación con la (s) cepa (s) nativa (s) a partir de la(s) cual(es) se derivan: msbB o htrB, preferiblemente el primero; y en la que cuando las vesículas L2 y L3 están ambas presentes, las cepas de las que se derivan tienen preferiblemente el (los) mismo (s) gen (es) de lípido A regulado hacia niveles menores de expresión en cada cepa.
6. La preparación de vesículas de *Neisseria* de las reivindicaciones 1-5, en la que la (s) cepa (s) de *Neisseria* tienen 1 o más de los siguientes genes de proteína de membrana externa regulado hacia niveles menores de expresión, y preferiblemente suprimidos, en

de membrana externa regulados hacia niveles menores de expresión en cada cepa.

7. La preparación de vesículas de *Neisseria* de la reivindicación 6, en la que la (s) cepa (s) de *Neisseria* tienen cualquiera de las siguientes combinaciones de genes de proteína de membrana externa regulado hacia niveles menores de expresión, y preferiblemente suprimidos, en comparación con la (s) cepa (s) nativa (s) a partir de la(s) cual(es) se derivan: PorA y OpA, PorA y OpC, OpA y OpC, PorA y OpA y OpC, PorA y FrpB, OpC y FrpB, OpA y FrpB, PorA y OpA y OpC y FrpB.

8. La preparación de vesículas de *Neisseria* de las reivindicaciones 1-7, en la que la (s) cepa (s) de *Neisseria* tienen 1 o más de los siguientes antígenos de proteína de membrana externa regulados hacia niveles mayores de expresión: NspA, TbpA bajo, TbpA alto, Hsf, Hap, OMP85, PilQ, NadA, LbpA, MltA; y en la que donde las vesículas L2 y L3 están ambas presentes, las cepas de las que se derivan tienen preferiblemente uno o más antígenos diferentes de proteína de membrana externa regulados hacia niveles mayores de expresión en cada cepa.

9. Una preparación de LOS aislada de la(s) cepa(s) de *Neisseria* de las cuales las preparaciones de vesículas de *Neisseria* de las reivindicaciones 1 a 8 se derivan, que comprende el inmunotipo L2 y/o L3 LOS.

10. La preparación de LOS de la reivindicación 9 en una formulación de liposoma.

11. La preparación de las vesículas de *Neisseria* de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 8 ó la preparación de LOS de la reivindicación 9 ó 10, en la que los LOS contenidos en ella se conjugan a una fuente de epítomos auxiliares de T, preferiblemente una proteína o proteína de la membrana externa.

12. La preparación de vesículas de *Neisseria* de la reivindicación 11, la cual es obtenible a través de un proceso de reticulación intra-vesículas.

13. Una composición inmunogénica o vacuna que comprende la preparación de vesículas de *Neisseria* de las reivindicaciones 1 - 8 ó la preparación de LOS de las reivindicaciones 9 ó 10 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

15. La vacuna de la reivindicación 13 ó 14 que comprende adicionalmente uno o más polisacáridos capsulares conjugados u oligosacáridos derivados de las siguientes cepas: meningococo serogrupo A, meningococo serogrupo C, meningococo serogrupo W-135, meningococo serogrupo Y, y *H. influenzae* tipo b. *sustento?*

(16) Un procedimiento de fabricación de la vacuna de preparación de vesículas de *Neisseria* de la reivindicación 13, que comprende las etapas de cultivar la (s) cepa (s) de *Neisseria* de las cuales se derivan las preparaciones de vesículas de *Neisseria* de las reivindicaciones 1 a 8, aislar las vesículas de aquellas, opcionalmente combinar las vesículas L2 y L3 si es adecuado, y formular las vesículas con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

17. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que la etapa de aislamiento se lleva a cabo mediante extracción con 0 - 0,5, 0,02 - 0,4, 0,04 - 0,3, 0,06 - 0,2 ó 0,08 - 0,15% de desoxicolato, preferiblemente con aproximadamente o exactamente 0,1% de desoxicolato.

(18) Un procedimiento de producir una preparación de vesículas conjugadas intra-vesícula de una cepa de *Neisseria* en la membrana externa de la que se integra una proteína de membrana externa conjugada a LOS, que comprende las etapas de:

- a) aislar vesículas de la cepa de *Neisseria*, donde la cepa opcionalmente es un mutante lgtB^- ,
- b) llevar a cabo la química adecuada para conjugar el resto de oligosacáridos de LOS presente en las vesículas a una proteína de membrana externa presente en la misma vesícula,
- c) aislar la preparación de vesículas conjugadas intra-vesícula, y
- d) formular opcionalmente la preparación de vesículas conjugadas intra-vesícula con una preparación adicional de vesículas conjugadas intra-vesícula fabricada mediante el mismo procedimiento pero teniendo un inmutotipo LOS diferente y/o formular la preparación de vesículas con un excipiente farmacéuticamente aceptable para fabricar una composición de vacunas.

19. El procedimiento de la reivindicación 18 en el que en la etapa a) las vesículas se extraen usando una concentración baja de desoxicolato tal como 0 -

20. El procedimiento de la reivindicación 18 ó 19, en el que en la etapa b) el pH se mantiene entre 7 y 9, preferiblemente alrededor de 7,5.
21. El procedimiento de las reivindicaciones 18 - 20, en el que la etapa b) se lleva a cabo en 1 - 5% de sacarosa, preferiblemente alrededor de 3%.
22. El procedimiento de las reivindicaciones 18 - 21, en el que la etapa b) se lleva a cabo en condiciones de baja concentración de NaCl.
23. El procedimiento de las reivindicaciones 18 - 22, en el que la etapa b) se lleva a cabo con química de EDAC/NHS.
24. El procedimiento de las reivindicaciones 18 - 23, en el que en la etapa a) las vesículas se aíslan de una cepa de *Neisseria*, preferiblemente una cepa meningocócica, más preferiblemente una cepa de meningococo B.
25. El procedimiento de las reivindicaciones 18-24 en el que la cepa no puede fabricar polisacárido capsular y es preferiblemente un mutante *siaD*⁻.
26. El procedimiento de las reivindicaciones 18 - 25 en el que la cepa es un *msbB*⁻ y/o *htrB*⁻.
27. El procedimiento de las reivindicaciones 18 - 26 en el que la cepa tiene un inmunotipo LOS L2.
28. El procedimiento de las reivindicaciones 18 - 27 en el que la cepa tiene un inmunotipo LOS L3.
29. El procedimiento de las reivindicaciones 18 - 28 en el que en la etapa d) una preparación de vesículas conjugadas intra-vesícula meningocócica con un inmunotipo L2 fabricado mediante el procedimiento de la reivindicación 27 se combina con una preparación adicional de vesículas conjugadas intra-vesícula meningocócicas con un inmunotipo L3, fabricado mediante el procedimiento de la reivindicación 28.

Molecular analysis of a locus for the biosynthesis and phase-variable expression of the lacto-*N*-neotetraose terminal lipopolysaccharide structure in *Neisseria meningitidis*

Michael P. Jennings,* Derek W. Hood, Ian R. A. Peak, Mumtaz Virji and E. Richard Moxon

Molecular Infectious Diseases Group and Department of Paediatrics, Institute of Molecular Medicine, John Radcliffe Hospital, Headington, Oxford OX3 9DU, UK.

Summary

Lipopolysaccharide (LPS) is a major determinant of *Neisseria meningitidis* virulence. A key feature of meningococcal LPS is the phase-variable expression of terminal structures which are proposed to have disparate roles in pathogenesis. In order to identify the biosynthetic genes for terminal LPS structures and the control mechanisms for their phase-variable expression, the *lic2A* gene, which is involved in LPS biosynthesis in *Haemophilus influenzae*, was used as a hybridization probe to identify a homologous gene in *N. meningitidis* strain MC58. The homologous region of DNA was cloned and nucleotide sequence analysis revealed three open reading frames (ORFs), two of which were homologous to the *H. influenzae* *lic2A* gene. All three ORFs were mutagenized by the insertion of antibiotic-resistance cassettes and the LPS from these mutant strains was analysed to determine if the genes had a role in LPS biosynthesis. Immunological and tricine-SDS-PAGE analysis of LPS from the mutant strains indicated that all three genes were probably transferases in the biosynthesis of the terminal lacto-*N*-neotetraose structure of meningococcal LPS. The first ORF of the locus contains a homopolymeric tract of 14 guanosine residues within the 5' end of the coding sequence. As the lacto-*N*-neotetraose structure in meningococcal LPS is subject to phase-variable expression, colonies that no longer expressed the terminal structure, as determined by monoclonal antibody binding, were isolated. Analysis of an 'off' phase variant revealed a change in the number of guanosine residues resulting in a frameshift mutation, indicating that a slipped-strand mispairing

mechanism, operating in the first ORF, controls the phase-variable expression of lacto-*N*-neotetraose.

Introduction

Meningococcal meningitis and septicaemia remain as significant health problems worldwide. The lipopolysaccharide (LPS) of *Neisseria meningitidis* (Nm) is known to be a major determinant of virulence (Jones *et al.*, 1992), and the use of monoclonal antibodies and structural studies have demonstrated the heterogeneity and complexity of meningococcal LPS which can be divided into 12 immunotypes (ITs; Verheul *et al.*, 1993). Present in neisserial LPS are the terminal structures, Gal α (1–4)Glc and lacto-*N*-neotetraose, which are also found on the surface of human epithelial cells or in host secretions (Mandreli *et al.*, 1988; Virji *et al.*, 1990); the presence of these structures in LPS may facilitate the evasion of the host immune system.

Meningococcal terminal LPS structures undergo high-frequency, reversible switching (phase-variation) of expression. Studies in model systems have suggested roles for the expression of different terminal LPS structures in pathogenesis, and by implication the importance of the switching mechanisms which control their phase-variable expression. These studies include the recent report of the relative serum resistance of the L3,7,9 IT compared to the L8 IT (Moran *et al.*, 1994), and studies in the mouse model of infection reveal that the L1,8 ITs predominate in the nasopharynx while the L3,7,9 ITs are most commonly found in the blood of the infected mice (Jones *et al.*, 1992). The type of terminal LPS structure expressed also determines the efficiency of adhesion/invasion function. Meningococcal variants expressing the Opc invasin (Opc⁺) and the L3 IT LPS structure (lacto-*N*-neotetraose), which is commonly modified by the addition of sialic acid, are non-invasive, whereas Opc⁺ variants expressing the L8 IT, non-sialylated, LPS structure are invasive (see the accompanying article by Virji *et al.*, 1995).

In *Haemophilus influenzae* (Hi), a number of loci involved in the phase-variable expression of LPS epitopes have been isolated and the molecular mechanism of phase-variable expression elucidated in the three *lic* loci

Received 19 May, 1995; revised 17 July, 1995; accepted 21 July, 1995. *For correspondence. E-mail: mjennings@molbiol.ox.ac.uk. Tel: (01865) 222347; Fax: (01865) 222626.

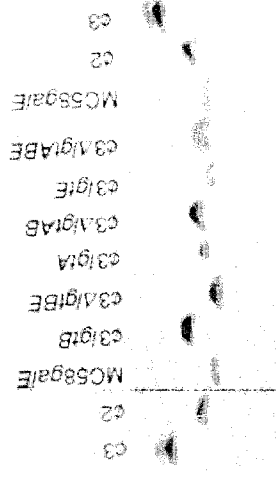


Fig. 3. Silver-stained gel after T-SDS-PAGE of LPS from *N. meningitidis* strain c3 and derivative mutant strains. Strains from which the prototype K lysate LPS samples were derived are indicated above the lanes. 10 μ l of an OD_{490nm} = 5.0 lysate of each sample was loaded. The double band in sample c3 presumably corresponds to sialylated (upper) and non-sialylated (lower) forms.

of *Xba*I restriction sites. Noted in the DNA sequence of the part of this region which is presented in this study (see Fig. 1) are two direct repeats of a 72 bp sequence (see under the accession number U25839). Database searches revealed homology with this 72 bp sequence, or with subsets of the sequence, in many sequences derived from Nm and Ng. These include, in order of homology, the *pttA* gene of Nm (McGuinness *et al.*, 1990), ISJ106 of Nm (Knight *et al.*, 1992), the *omc* gene of Ng (Tsai *et al.*, 1989), *carA* of Ng (GenBank accession number U11294), the *tbp1* and *tbp2* region of Nm (Legram *et al.*, 1993), the *lgtA-E* locus of Ng (Gotschlich, 1994), *plbS1* of Ng (Haas and Meyer, 1986), and the gene for protein II of Ng (Connell *et al.*, 1988). In all of these cases the repeat sequence is found in the intergenic regions of these sequence entries.

Mutagenesis of the *lgtABE* locus

In order to confirm the role of these genes in LPS biosynthesis, mutants were constructed by the insertion of a kanamycin antibiotic-resistance (*Kan^r*) cassette into restriction endonuclease sites present in the coding sequences of the *lgtA*, *lgtB*, and *lgtE* genes. Insertions were made which inactivated the genes individually and also in combinations (see the *Experimental procedures*). These constructs were used to transform Nm strain c3 (an L3 IT derivative of strain MC58, see Table 2 later) to kanamycin resistance, replacing the wild-type region on the chromosome with the construct containing the *Kan^r* cassette. The locations of these insertions in the *lgtABE* locus are detailed in Fig. 1.

The phenotype of the LPS expressed by these mutant strains was determined by tricine-SDS-PAGE (T-SDS-PAGE; see Fig. 3). The migration of the LPS from all insertional mutant strains was increased in comparison to the parental strain (c3), indicating a reduction in apparent molecular weight of the LPS, consistent with all three genes

being involved in LPS biosynthesis. The LPS from strain c3Δ*lgtE*, containing the inactivated *lgtE* gene, migrated the furthest, co-migrating with the LPS from MC58galE (MC58galE is a UDP-galactose epimerase-deficient strain which expresses a truncated LPS structure indicated later in Fig. 7; Jennings *et al.*, 1993). LPS from mutants in which the other genes are inactivated in conjunction with the *lgtE* gene, c3Δ*lgtBE* and c3Δ*lgtABE*, had the same migration as an *lgtE* single mutant. Inactivation of the *lgtA* gene, c3Δ*lgtA*, resulted in LPS which ran at the same apparent molecular weight as the c2 (L8 IT) control sample, which is one sugar residue longer than the LPS of MC58galE. The *lgtAB* double mutant, c3Δ*lgtAB* had the same LPS phenotype as c3Δ*lgtA*. LPS from c3Δ*lgtB* migrated between the c2 and c3 control samples. It is worth noting that, below the major LPS band in the single knockout mutant strains c3Δ*lgtA* and c3Δ*lgtB*, as well as in the *lgtAB* double mutant, are weak bands which have the same migration as LPS from mutants with an inactivated *lgtE* gene. This is presumably due to reduced transcriptional readthrough from an upstream promoter, caused by the insertion of the *Kan^r* cassette upstream of the *lgtE* gene, resulting in reduced levels of expression of *lgtE* and a partial *lgtE* mutant phenotype consistent with the three genes constituting a single transcriptional unit.

The effect of these mutations on the expression of LPS epitopes was investigated by a immune dot blot procedure. The parent strain c3 expressed the L3 IT, as indicated by binding of the typing monoclonal antibody (mAb) Mn4A8-B2. This epitope was absent in all of the mutant strains tested as well as in c2 (L8 IT), MC58galE and MC58lsr1 (deep-rough LPS mutant equivalent to *rfaF* of *Salmonella typhimurium* indicated later in Fig. 7; Jennings *et al.*, 1993). A similar result was obtained with mAb SM82 which has a binding specificity similar to that of mAb Mn4A8-B2. Mn8D6A is a mAb which is broadly cross-reactive across a range of meningococcal ITs (Kim *et al.*, 1988). It presumably has specificity for a 'core' epitope, as it binds to L8 IT and MC58galE mutant LPS but not to L3 IT LPS, containing the lacto-*N*-neotetraose structure (see Fig. 4 and Jennings *et al.*, 1993). Mn8D6A does not bind to L3 LPS, and binding to the L8 LPS is slightly weaker than to MC58galE LPS, consistent with reduced binding in proportion to increasing saccharide chain length (see Fig. 4 and also Fig. 7 later). In LPS from strains containing a *lgtE* mutation (c3Δ*lgtE*, c3Δ*lgtBE* and c3Δ*lgtABE*) the binding to mAb Mn8D6A is similar to MC58galE, consistent with the T-SDS-PAGE result in which LPSs from these mutants have the same apparent molecular weight as MC58galE LPS. Similarly, mutants in which the *lgtA* gene is inactivated (c3Δ*lgtA*, c3Δ*lgtAB*) display the same slightly reduced binding specificity for mAb Mn8D6A and the same T-SDS-PAGE LPS phenotype as the L8 IT control. The mutant strain c3Δ*lgtB* does not react with mAb

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
8 February 2001 (08.02.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/09350 A2

(51) International Patent Classification⁷: **C12N 15/74**,
A61K 39/02, C12N 15/31, 15/67, A61K 39/095, 39/116,
39/118, 39/09, 39/104, 39/102, 39/295, C07K 14/195,
C12N 1/21

(21) International Application Number: PCT/EP00/07424

(22) International Filing Date: 31 July 2000 (31.07.2000)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
9918319.6 3 August 1999 (03.08.1999) GB

(71) Applicant (for all designated States except US):
SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A.
[BE/BE]; 89, rue de l'Institut, B-1330 Rixensart (BE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **BERTHET, François-Xavier, Jacques** [FR/BE]; SmithKline Beecham Biologicals s.a., 89, rue de l'Institut, B-1330 Rixensart (BE). **DALEMANS, Wilfried, L., J.** [BE/BE]; SmithKline Beecham Biologicals s.a., 89, rue de l'Institut, B-1330 Rixensart (BE). **DENOEL, Philippe** [BE/BE]; SmithKline Beecham Biologicals s.a., 89, rue de l'Institut, B-1330 Rixensart (BE). **DEQUESNE, Guy** [BE/BE]; SmithKline Beecham Biologicals s.a., 89, rue de l'Institut, B-1330 Rixensart (BE). **FERON, Christiane** [BE/BE]; SmithKline Beecham Biologicals s.a., 89, rue de l'Institut, B-1330 Rixensart (BE). **LOBET, Yves** [BE/BE]; SmithKline Beecham Biologicals s.a., 89, rue de l'Institut, B-1330 Rixensart (BE). **POOLMAN, Jan** [NL/NL]; SmithKline

Beecham Biologicals s.a., 89, rue de l'Institut, B-1330 Rixensart (BE). **THIRY, Georges** [BE/BE]; SmithKline Beecham Biologicals s.a., 89, rue de l'Institut, B-1330 Rixensart (BE). **THONNARD, Joelle** [BE/BE]; SmithKline Beecham Biologicals s.a., 89, rue de l'Institut, B-1330 Rixensart (BE). **VOET, Pierre** [BE/BE]; SmithKline Beecham Biologicals s.a., 89, rue de l'Institut, B-1330 Rixensart (BE).

(74) Agent: **DAITON, Marcus, Jonathan, William**; Corporate Intellectual Property, SmithKline Beecham, Two New Horizons Court, Brentford, Middlesex TW8 9EP (GB).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— Without international search report and to be republished upon receipt of that report.

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 01/09350 A2

(54) Title: VACCINE COMPOSITION

(57) Abstract: The present invention relates to an immuno-protective and non-toxic Gram-negative bleb vaccine suitable for paediatric use. Examples of the Gram-negative strains from which the blebs are made are *N. meningitidis*, *M. catarrhalis* and *H. influenzae*. The blebs of the invention are improved by one or more genetic changes to the chromosome of the bacterium, including up-regulation of protective antigens, down-regulation of immunodominant non-protective antigens, and detoxification of the Lipid A moiety of LPS.

202

Example 8: Isolation and purification of blebs from meningococci devoid of capsular polysaccharide

5 Recombinant blebs were purified as described below. The cell paste (42gr) was suspended in 211 ml of 0.1M Tris-Cl buffer pH 8.6 containing 10 mM EDTA and 0.5% Sodium Deoxycholate (DOC). The ratio of buffer to biomass was 5/1 (V/W). The biomass was extracted by magnetic stirring for 30 minutes at room temperature. Total extract was then centrifuged at 20,000g for 30 minutes at 4°C (13,000 rpm in a
10 JA-20 rotor, Beckman J2-HS centrifuge). The pellet was discarded. The supernatant was ultracentrifuged at 125,000g for 2 hours at 4°C (40,000 rpm in a 50.2Ti rotor, Beckman L8-70M ultracentrifuge) in order to concentrate vesicles. The supernatant was discarded. The pellet was gently suspended in 25 ml of 50 mM Tris-Cl buffer pH 8.6 containing 2 mM EDTA, 1.2% DOC and 20% sucrose. After a second
15 ultracentrifugation step at 125,000g for 2 hours at 4°C, vesicles were gently suspended in 44 ml of 3% sucrose and stored at 4°C. All solutions used for bleb extraction and purification contained 0.01% thiomersalate. As illustrated in Figure 8, this procedure yields protein preparations highly enriched in outer-membrane proteins such as PorA and PorB.

20

Example 9: Identification of bacterial promoters suitable for up-regulation antigens-coding genes

The use of strong bacterial promoter elements is essential to obtain up-regulation of genes coding for outer membrane proteins. In that context, we have
25 shown previously that up-regulating the *Neisseria meningitidis* *nspA*, *hsf*, and *omp85* genes using the *porA* promoter has allowed us to isolate recombinant blebs enriched in the corresponding NspA, Hsf and Omp85 proteins. Alternatives to the *porA* promoter may be useful to obtain different levels of up-regulation, to overcome potential *porA* phase variation and/or to achieve conditional gene expression (iron-
30 regulated promoters). Here we describe a method allowing the identification of a precise transcriptional start site of strong promoter elements likely to confer high level of expression in bacteria. Since promoter regulatory elements are classically

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

Abogada
Alicia Lloreda Ricaurte

ASUNTO	Radicación	05-7268
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	430
	Oficio	1866
	Folios	7

Patente de Invención ☒ Patente de Modelo de Utilidad ☐Vía Nacional ☐

Vía PCT (fase nacional) ☒ Cap. I ☐ Cap. II ☒

No. Sol. Internacional	PCT/EP2003/008568
Fecha de Presentación Internat.	31/07/2003

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:

Se aceptó la divisional de esta solicitud, por tanto este concepto técnico hace referencia al expediente 05-07268 que es la solicitud original.

1. Documentos estudiados

Descripción: Folios: 28 a 74 como se radicó inicialmente.

Reivindicaciones: Folios: 75 a 82 como se radicó inicialmente.
Folios: 195 a 198 modificadas

Figuras: Folios: 83 a 88 como se radicó inicialmente.

Prioridad:

02/08/2002,	Gran Bretaña,	GB0218037.0
02/08/2002,	Gran Bretaña,	GB0218036.2
02/08/2002,	Gran Bretaña,	GB0218035.4
02/08/2002,	Gran Bretaña,	GB0218051.1
30/08/2002,	Gran Bretaña,	GB0220197.8
30/08/2002,	Gran Bretaña,	GB0220199.4
01/11/2002,	Gran Bretaña,	GB0225524.8
01/11/2002,	Gran Bretaña,	GB0225531.3
24/12/2002,	Gran Bretaña,	GB0230164.6
24/12/2002,	Gran Bretaña,	GB0230168.7
24/12/2002,	Gran Bretaña,	GB0230170.3
02/08/2002,	Gran Bretaña,	GB0305028.3

El objeto de la presente solicitud de patente de invención consiste en procedimientos de obtención de nuevas cepas meningocócicas de inmunotipo L2 y L3, modificadas genéticamente que son más adecuadas para la producción de vacunas de vesículas de membrana externa de *Neisseria spp.*

El problema planteado en esta solicitud es la necesidad de una vacuna segura y eficaz contra *N. meningitidis* de serogrupo B basada en vesículas de la membrana externa o componentes purificados de la misma, específicamente utilizando los antígenos LOS.

Para solucionar este problema técnico la solicitud en estudio proporciona composiciones inmunogénicas que contienen antígenos LOS modificados provenientes de diferentes inmunotipos de *Neisseria spp* y procedimientos de obtención de las vesículas que los contienen y que no tienen efecto tóxico.

IPC A61K 39/095, C12N 1/21, A61P 37/04, A61K 39/102.

3. De la solicitud de Patente (según el caso)

3.1. Reivindicaciones (artículo 30 D 486)

El capítulo reivindicatorio presentado carece de sustento por cuánto:

- Se reclama materia sin sustento descriptivo (cláusula 15), no existe evidencia de una preparación vacunal estabilizada que contenga varios antígenos, todas las figuras y ejemplos mostrados corresponden a inmunizaciones con composiciones de vesículas que provienen de una sola cepa.

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

4. 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 02/08/2002

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	Jennings M. Mol.Microbiol. vol 18 (4):729-740.	"Molecular analysis of a locus for the biosynthesis and phase-variable expression of the Lacto-N-neotetraose terminal lipopolysaccharide structure in <i>Neisseria meningitidis</i> "	Nov, 1995
D2	WO01009350	"Vaccine composition"	Feb, 2001

5. Análisis de patentabilidad (artículo 14 D486)

205 ✓ 205

La reivindicación 1 y dependientes reclaman una preparación de vesículas de *Neisseria spp.*, derivada de una cepa de inmunotipo LOS L2 o de una cepa de inmunotipo LOS L3 y en la que la cepa es LgtB^- ; o una preparación en vesícula de *Neisseria* que comprende una combinación de vesículas derivadas de una cepa neisserial con un inmunotipo L2 LOS y una cepa neisserial con un inmunotipo L3 LOS, en la que opcionalmente cada cepa es LgtB^- , así como la forma de preparación de las mismas.

El documento de Jeggings *et. al.* (D1) divulga una cepa neisserial con el gen LgtB^- , el mutante fue construido por la inserción de un cassette de resistencia a la kanamicina, el cual inactiva el gen LgtB (ver pág 733, columna 1). La única diferencia entre D1 y la solicitud en estudio es que esta última incluye vesículas que tienen las proteínas de membrana con expresión disminuida.

Sin embargo, el documento WO01009350 (D2) expone composiciones de vesículas de *Neisseria spp.* derivadas de cepas modificadas genéticamente para regulación hacia niveles menores de expresión de los genes PorA , PorB , PilC , TbpA , TbpB , LpbA , LpbB , OpA , OpC (Ver Página 31, Párrafo 5-20). De igual forma, este documento divulga la forma de preparación de estas vesículas (ver pag 30; ej 7 y 8).

De la combinación de D1 y D2 un experto en la materia podría realizar la invención tal como es planteada en la solicitud. Por lo tanto, la invención no cumple con el requisito de nivel inventivo establecido en el artículo 18 de la Decisión 486.

6. Conclusión:

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

N°	Documento N°	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D1	Jennings M. Mol.Microbiol. vol 18 (4):729-740.	1-17	Nivel inventivo
D2	WO 01/09350	1-29	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 60 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 numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.

DORIS ELENA POLO

Jefe de División de Nuevas Creaciones (E)

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

13 FEB. 2009