

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 05-090928-00004-0000

Fecha: 2007-11-14 17:21:00 Dep. 2-21 NUEVAS CREACIONES
Tra: 11 PATENTE Y LEX 070 FASE NACIONAL
Act. 538 PETICION Folios: 2

BOGOTA - COLOMBIA
OFICINA FUNDADA EN 1941
APARTADO AEREO 12304
TEL: 57-1-3264270 57-1-6069700
FAX: 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 "PROCESO DE
PURIFICACIÓN PARA CITOLISINA BACTERIANA".-Clase
CO7K 14/315.-Expediente número 05-090.928.-

1. Me refiero a mi memorial de 19 de Diciembre de 2005.
2. De conformidad con lo dispuesto en el Artículo 5.2.12 de la Circular Externa No. 03 de 28 de Abril de 2003, y estando dentro del plazo de seis meses contados desde la fecha de la publicación de la solicitud en la Gaceta de la Propiedad Industrial número **576** de 31 de Mayo de 2007, solicito a ese Despacho proceder a realizar el examen de patentabilidad de la presente invención.
3. Me permito recordar a usted, que tal como se informó en el Petitorio de la invención, la presente solicitud corresponde a Capítulo **II**.
4. Anexo me permito acompañar recibo número 07-91.930, expedido por la Superintendencia de Industria y Comercio, que acredita el pago de la tasa que dicho examen causa.

Señor Superintendente,

ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. 53.215

125
125

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



14-0000

2020 NUECREACIONE
379 FASENACIONALII
2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 91,930
FECHA : NOVIEMBRE 13 DE 2007

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	72074902	13/11/2007	2,932,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	114 PTC CAP-II EXAMEN DE PATENTIBILID	202,000.00
TOTAL :			\$ 202,000.00

SON: DOSCIENTOS DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____ 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

RADICACIÓN EXPEDIENTE No. 05-90928

EL EXTRACTO DE LA PRESENTE SOLICITUD DE **PATENTE DE INVENCION**

FUE PUBLICADO EN LA GACETA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL No **576** DE

FECHA **31 DE MAYO DE 2007** EL TÉRMINO HÁBIL SEÑALADO POR LA LEY

EXPIRA EL **31 DE AGOSTO DE 2007**

NOTA: Dentro del plazo de los seis (6) meses siguientes a partir de la fecha de publicación en la gaceta de Propiedad Industrial, deberá solicitar y cancelar el examen de patentabilidad so pena de que la solicitud caiga en abandono, de acuerdo con lo establecido en el Artículo 44 de la Decisión 486/2000.

SE PRESENTARON OPOSICIONES POR PARTE DE TERCEROS.

SI _____

NO X

Self-interaction of Pneumolysin, the Pore-forming Protein Toxin of *Streptococcus pneumoniae*

Robert J. C. Gilbert^{1*}, Jamie Rossjohn², Michael W. Parker²
Rodney K. Tweten³, Peter J. Morgan⁴, Timothy J. Mitchell⁵
Neil Errington¹, Arthur J. Rowe¹, Peter W. Andrew⁴ and Olwyn Byron⁵

¹Department of Biochemistry
University of Leicester
Leicester LE1 7RH, UK

²The Ian Potter Foundation
Protein Crystallography
Laboratory, St Vincent's
Institute of Medical Research
41 Victoria Parade, Fitzroy
Victoria 3065, Australia

³Department of Microbiology
and Immunology, The
University of Oklahoma Health
Sciences Center, Oklahoma
City, Oklahoma 73190, USA

⁴Department of Microbiology
and Immunology, University of
Leicester, Leicester LE1 8AH
UK

⁵Division of Infection and
Immunity, Institute of
Biomedical and Life Sciences
University of Glasgow,
Glasgow G12 8QQ, UK

The pathogenically important cholesterol-binding pore-forming bacterial "thiol-activated" toxins (TATs) are commonly believed to be monomeric in solution and to undergo a transition on membrane binding mediated by cholesterol to an oligomeric pore. We present evidence, gained through the application of a number of biochemical and biophysical techniques with associated modelling, that the TAT from *Streptococcus pneumoniae*, pneumolysin, is in fact able to self-associate in solution to form the same oligomeric structures. The weak interaction leading to solution oligomerization is manifested at low concentrations in a dimeric toxin form. The inhibition of toxin self-interaction by derivatization of the single cysteine residue in pneumolysin with the thiol-active agent dithio-(bis)nitrobenzoic acid indicates that self-interaction is mediated by the fourth domain of the protein, which has a fold similar to other proteins known to self-associate. This interaction is thought to have implications for the understanding of mechanisms of pore formation and complement activation by pneumolysin.

© 1998 Academic Press

*Corresponding author

Keywords: pneumolysin; oligomerization; neutron scattering; electron microscopy; analytical ultracentrifugation

Introduction

Pneumolysin is a 53 kDa monomeric protein toxin produced by the Gram-positive bacterium *Streptococcus pneumoniae*, a causative agent of pneumonia, meningitis and otitis media (Austrian, 1981). Pneumolysin has been strongly

implicated in the mechanisms of pneumococcal disease, and is a member of a group of antigenically and structurally related proteins produced by the Gram-positive genera *Streptococcus*, *Clostridium*, *Listeria*, and *Bacillus* (Smyth & Duncan, 1978; Alouf & Geoffroy, 1991; Tweten, 1995; Morgan *et al.*, 1996). Members of this family of cytolytins are known for historical reasons as the thiol-activated toxins (TATs), and bind cholesterol in the membrane as a prelude to pore-formation and cell lysis. This fact is attested by the stereospecific inhibitory effect of free cholesterol on the TATs (Watson & Kerr, 1974) and the inability of the toxins to lyse cells lacking cholesterol (Rottem *et al.*, 1976). Pneumolysin is known to activate the complement system in a non-immunospecific manner (Mitchell *et al.*, 1991) and both membrane

Present address: P. J. Morgan, Murex Biotech Ltd,
Central Road, Dartford, Kent DA1 5LR, UK.

Abbreviations used: TAT, thiol-activated toxin; Ply, pneumolysin; EM, electron microscopy; SANS, small-angle neutron scattering; AUC, analytical ultracentrifugation; DTNB, dithio(bis)nitrobenzoate; TNB, thionitrobenzoate.

E-mail address of the corresponding author:
rjcg1@leicester.ac.uk or gilbert@bioch.ox.ac.uk

A new cytolyisin from the sea anemone, *Heteractis magnifica*: isolation, cDNA cloning and functional expression¹

Yawen Wang, Kim Lee Chua, Hoon Eng Khoo *

Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, National University of Singapore, 10 Kent Ridge Crescent, Singapore 119260, Singapore

Received 14 September 1999; received in revised form 29 November 1999; accepted 23 December 1999

Abstract

We purified a new cytolyisin (HMgIII) from the sea anemone, *Heteractis magnifica*. HMgIII, which has a molecular mass of ~19 kDa, functions as both a cytolyisin and a hemolyisin. The full-length HMg III cDNA was obtained by reverse transcriptase–polymerase chain reaction, using primers designed from its N-terminal amino acid sequence and an internal conserved region of two other sea anemone cytolyisins: equinatoxin II (EqT II) and cytolyisin III. The cDNA contained an open reading frame of 633 bp, which encodes a protein of 211 amino acids. The nascent HMg III protein contained a prepropeptide of 34 amino acids, which includes a signal peptide of 19 amino acids. The mature HMg III has a predicted molecular mass of 19 kDa and a pI of 9.1, and shares 91%, 89%, 65% and 63% amino acid sequence similarity with cytolyisin III, cytolyisin ST I, tenebrosin-C and equinatoxin (EqT II), respectively. The predicted secondary structure of the mature HMg III comprises 16% α -helix, 23% extended strand and 60% random coils. The characteristic amphiphilic α -helix of cytolyisins is located at the N-terminus of the processed HMg III. Recombinant HMg III (rHMg III) was expressed in *Escherichia coli* as a fusion protein containing a 6xHisTag at the N-terminus. The hemolytic and cytotoxic activities of the purified rHMg III were comparable to those of the native HMg III. The hemolytic activities of both proteins were similarly potentiated with 8-anilino-1-naphthalenesulfonate (ANS). Increasing the length of the peptide tag on the N-terminal of rHMg III correlated with decreasing hemolytic activity, thus confirming the importance of the N-terminal amphiphilic α -helix for its cytolytic activity. © 2000 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Cytolyisin; Sea anemone; Magnificalyisin; Cloning

1. Introduction

Sea anemones are a rich source of cytotoxic proteins. Cytolyisins comprise a group of more than 30 highly basic proteins with molecular masses of about 20 kDa [1,2]. Cytolyisins isolated from the sea ane-

mone, *Heteractis magnifica*, include magnificalyisin I (HMg I), magnificalyisin II (HMg II) and *Heteractis magnifica* toxin (HMgtxn). These are highly homologous at their N-terminals [3,4]. HMg I and II have molecular masses of approximately 19 kDa, and pI values of 9.4 and 10.0, respectively. Cytolyisins isolated from other sea anemones *Actinia tenebrosa* (Tenebrosin-C, TN-C), *Actinia equina* (Equinatoxin, EqT) and *Stichodactyla helianthus* (ShC) exhibit pore-forming, hemolytic, cytotoxic, and heart stimulatory activities [5–9].

The secondary structure of two pore-forming cy-

* Corresponding author. Fax: +65-779-1453;
E-mail: bchkhe@nus.edu.sg

¹ The nucleotide sequence reported in this paper has been submitted to the GenBank Data Bank with accession number AF170706.

137
D3 129

Hydrophobic interaction chromatography of proteins

J.A. Queiroz ^{a,*}, C.T. Tomaz ^a, J.M.S. Cabral ^b

^a Departamento de Química, Universidade da Beira Interior, 6201-001 Covilha, Portugal

^b Centro de Engenharia Biológica e Química, Instituto Superior Técnico, 1049-001 Lisboa, Portugal

Received 1 August 2000; received in revised form 10 January 2001; accepted 16 January 2001

Abstract

In this article, an overview of hydrophobic interaction chromatography (HIC) of proteins is given. After a brief description of protein hydrophobicity and hydrophobic interactions, we present the different proposed theories for the retention mechanism of proteins in HIC. Additionally, the main parameters to consider for the optimization of fractionation processes by HIC and the stationary phases available were described. Selected examples of protein fractionation by HIC are also presented. © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Hydrophobic interaction chromatography; Proteins; Purification

1. Introduction

The development of techniques and methods for the separation and purification of proteins has been essential for many of the recent advancements in biotechnology research.

The purity of a protein is a pre-requisite for its structure and function studies or its potential application. The required level of purity depends on the end use of the protein: high degree of purity for structure studies or therapeutic applications, low degree of purity for industrial applications, such as in food industry or domestic detergents.

The global aim of a protein purification process is not only the removal of unwanted contaminants, but also the concentration of the desired protein and their transfer to an environment where it is stable and in a form ready for the intended application.

A wide variety of protein purification techniques are available today, however, different types of chromatography have become dominant due to their high resolving power. In gel filtration chromatography, ion-exchange chromatography, affinity chromatography and hydrophobic interaction chromatography (HIC), the proteins separation is dependent on their biological and physico-chemical properties: molecular size, net charge, biospecific characteristics and hydrophobicity, respectively (Kennedy, 1990; Garcia and Pires, 1993). HIC takes advantage of the hydro-

* Corresponding author. Tel.: +351-275-319700; fax: +351-275-319730.

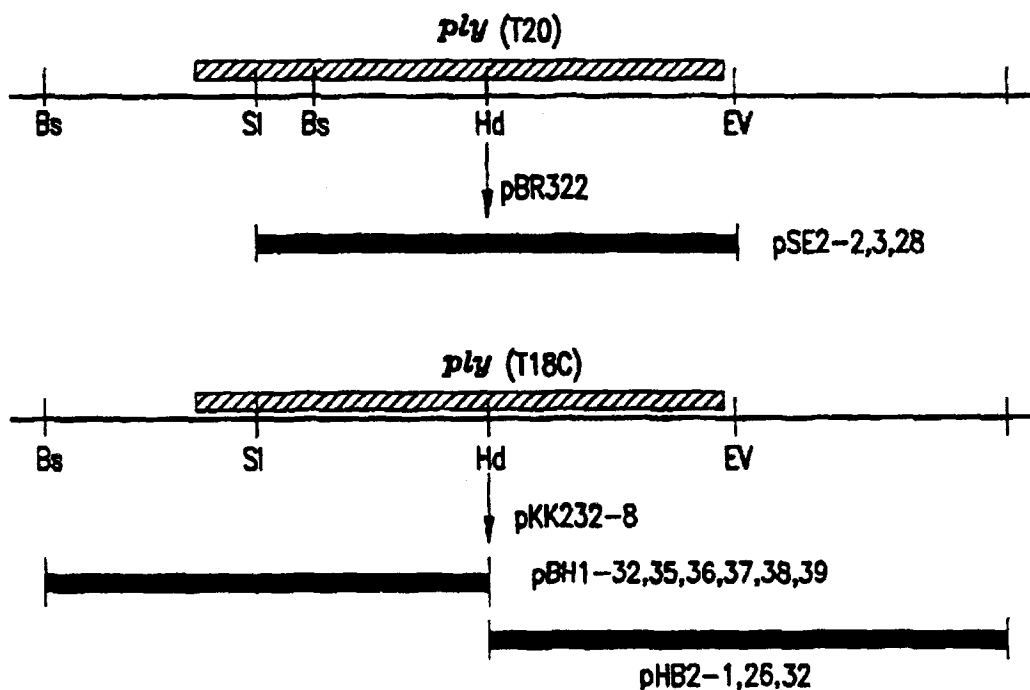
E-mail address: jqueiroz@alpha2.ubi.pt (J.A. Queiroz).



D4

(51) International Patent Classification ⁶ : A61K 39/09 // C07K 14/315		(11) International Publication Number: WO 96/05859
A1		(43) International Publication Date: 29 February 1996 (29.02.96)
(21) International Application Number: PCT/US95/10227 (22) International Filing Date: 10 August 1995 (10.08.95) (30) Priority Data: 08/295,305 24 August 1994 (24.08.94) US (71) Applicant: AMERICAN CYANAMID COMPANY [US/US]; One Cyanamid Plaza, Wayne, NJ 07470 (US). (72) Inventors: KUO, Joseph, S.-C.; 67 Constitution Drive, Tappan, NY 10983 (US). REE, Heesoo, K.; 9-1903 Professor Apartments, 756 Jigok-dong, Pohang, Kyongbuk 790-390 (KR). (4) Agents: GORDON, Alan, M.; American Cyanamid Company, 1 Cyanamid Plaza, Wayne, NJ 07470 (US) et al.		(81) Designated States: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UZ, VN, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO patent (KE, MW, SD, SZ, UG). Published <i>With international search report.</i> <i>Before the expiration of the time limit for amending the</i> <i>claims and to be republished in the event of the receipt of</i> <i>amendments.</i>

(54) Title: PNEUMOCOCCAL POLYSACCHARIDE-RECOMBINANT PNEUMOLYSIN CONJUGATE VACCINES FOR IMMUNIZATION AGAINST PNEUMOCOCCAL INFECTIONS



(57) Abstract

Immunogenic polysaccharide-protein conjugates are generated which have an oxidized polysaccharide derived from the capsular polysaccharide of *Streptococcal pneumoniae* and the pneumolysin protein of *S. pneumoniae* which is expressed recombinantly. The pneumolysin is not toxoided prior to conjugation with said oxidized polysaccharide. The immunogenic conjugates are used as vaccines to elicit antibody responses to the capsular polysaccharide of *S. pneumoniae* and to recombinant pneumolysin, and to immunize against *S. pneumoniae*-caused disease.

135 131

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

Abogada
Alicia Lloreda

ASUNTO Radicación 05-90928
 Trámite 002
 Evento 001
 Actuación 430
 Oficio
 Folios 013

Patente de Invención ☒ Patente de Modelo de Utilidad ☐

Vía Nacional ☐

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

No. Sol. Internacional PCT/EP2004/002641

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

Descripción: Folios: 61 a 102 como se radicó inicialmente.

Reivindicaciones: Folios: 26 a 31 como se presentaron en fase internal.
 Folios: 44 a 47 modificadas en fase internacional
 Folios: 103 a 108 modificadas en fase nacional

Figuras: Folios: 109 a 113 como se radicó inicialmente.

Prioridad: 13/03/2003, Gran Bretaña, GB 0305791.6
 13/03/2003, Gran Bretaña, GB 0305792.4

2. Objeto de la invención

Título de la solicitud: "Proceso de purificación para citolisina bacteriana".

El objeto de la presente solicitud de patente de invención consiste en suministrar un método para la purificación de citolisina bacteriana, particularmente de neumolisina de *Streptococcus pneumoniae*. Además, se suministran composiciones farmacéuticas y vacunales que contienen tal neumolisina para el tratamiento de la neumonía u otitis causada por este agente.

132
137

De acuerdo con lo anterior, el capítulo reivindicatorio en general no cumple con el requisito de unidad de invención establecido en el art. 25 de la Decisión 486.

5. No es una invención (artículo 15, literal b))

Teniendo en cuenta que:

- el método de aislamiento propuesto por la solicitud permite obtener una citolisina bacteriana, específicamente una neumolisina aislada del organismo *S.pneumoniae* sin ninguna modificación estructural o funcional, sino tal como se encuentra en la naturaleza;
- adicionalmente, esta citolisina independientemente del método de aislamiento posee las mismas características de la citolisina silvestre

Por tanto, la citolisina bacteriana caracterizada en las reivindicaciones 43 y 44, no puede considerarse una invención por ser todo o parte de un ser vivo tal como se encuentra en la naturaleza.

De esta manera y de acuerdo a lo establecido en el artículo 15, literal b) de la Decisión 486, el contenido de las reivindicaciones 43 y 44 deberá excluirse.

6. 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 13/03/2003

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	Gilbert R., <i>et.al.</i> J. Mol. Biol. (1998) 284: 1223-1237	"Self-interaction of Pneumolysin, the Pore-forming Protein Toxin of <i>Streptococcus pneumoniae</i> "	1998
D2	Wang Y., <i>et.al.</i> Biochimica et Biophysica Acta 1478 (2000): 9-18	"A new cytolysin from the sea anemone, <i>Heteractis magnifica</i> : isolation, cDNA cloning and functional expresión"	2000
D3	Queiroz, J. <i>et.al.</i> , Journal of Biotechnology 87 (2001): 143-159	"Hydrophobic interaction chromatography of proteins"	Mayo, 2001
D4	WO 96/05859	"Pneumococcal polysaccharide recombinant pneumolysin conjugate vaccines for immunization against pneumococcal infections"	29/02/1996

7. Análisis de patentabilidad (artículo 14 D486)

7.1. Novedad (artículo 16 D486)

El uso de la pneumolisina para la preparación de compuestos inmunógenos, incluso en moléculas conjugadas ya había sido divulgada por WO 96/05859 (D4). En este documento aunque se utiliza un método de purificación diferente para la pneumolisina, puesto que se usa cromatografía de afinidad (ver pág 17, D4) la proteína es utilizada para la preparación del mismo tipo de compuestos (ver

133

Como se observa, de los procesos de purificación divulgados en D1 y D3 ó en D2 y D3, el experto en la materia podía realizar un proceso de purificación de citolisina tal como el propuesto en la solicitud. De esta manera las reivindicaciones 1-41 están afectadas por tales documentos y carecen de nivel inventivo.

8. Conclusión:

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

Nº	Documento N°	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D1	Gilbert R., <i>et.al.</i> J. Mol. Biol. (1998) 284: 1223-1237	1-41	Nivel inventivo
D2	Wang Y., <i>et.al.</i> Biochimica et Biophysica Acta 1478 (2000): 9-18	1-41	Nivel inventivo
D3	Queiroz, J. <i>et.al.</i> , Journal of Biotechnology 87 (2001): 143-159	1-41	Nivel inventivo
D4	WO 96/05859	46-55	Novedad

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.


ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (C)

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

CONCEPTO TÉCNICO No. 1654	EXAMINADOR TÉCNICO Código No.202052
-------------------------------------	---