

140A
134

Señor
SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COM
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
E. _____ S. _____ D. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 05-090928- -00007-0000
Fecha: 2010-09-06 16:36:11 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 16

Re: **P1.-GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.-Solicitud de Patente de Invención en Fase Nacional PCT para "PROCESO DE PURIFICACIÓN PARA CITOLISINA BACTERIANA".-Clase C07K 14/315.-Expediente número 05-090.928-**

wo 2004081515

1. Me refiero al auto dictado por ese Despacho notificado por fijación en lista de 11 de Junio de 2010.
2. Con el fin de dar respuesta a las objeciones expuestas por el señor Examinador en su Concepto Técnico No. **1654**, en relación con la Claridad de la Descripción y del Capítulo Reivindicatorio, la Unidad de Invención, Materia no Patentable, la Novedad y el cumplimiento del requisito de Nivel Inventivo, me permito dirigir su atención a los siguientes argumentos técnicos y modificaciones, por medio de los cuales se superan completamente dichas objeciones:

3. **CLARIDAD DE LA DESCRIPCIÓN**

En primer lugar, manifiesta el señor Examinador en su referenciado Concepto Técnico que la descripción de la presente solicitud carece de claridad debido a que:

" En el capítulo descriptivo se menciona la conjugación de la citolisina bacteriana con algunos polisacáridos, particularmente polisacáridos que provienen de antígenos de membrana bacteriales (ver folios 84-86).

Sin embargo, no existe una descripción detallada para el desarrollo de los conjugados que contengan antígeno de Moraxella catarrhalis, Haemophilus influenzae, RSV, virus de parainfluenzae o virus de influenza, así como tampoco para las proteínas Pht (PhtA, PhtB, PhtD o PhtE), puesto que no hay información sobre las pruebas inmunológicas o siquiera la elaboración de vacunas que contengan estos conjugados y que hayan sido efectivas en conferir inmunidad.

La descripción presentada, en particular la información referente a los conjugados neumolisina-polisacáridos bacteriales carece de suficiencia y por tanto, no cumple con los requisitos establecidos en el art. 28 de la Decisión 486. "

Finalmente, para la familia de proteína *PhtX*, es evidente que el capítulo descriptivo si presenta sustento adecuado, toda vez que desde la página 24 (línea 14) hasta la página 25 (línea 15) se revela que:

La familia Pht (Tríada de Poli histidina) comprende proteínas PhtA, PhtB, PhtD y PhtE. La familia es caracterizada por una secuencia de lapidación, dos dominios separados por una región rica en prolina y varias tríadas de histidina, posiblemente involucrados en el enlace actividad enzimática de metal o nucleósido, regiones de espiral enrollado (3-5), un terminal N conservado y un terminal C heterogénea. Está presente en todas las sepas de neumococos probadas. También se han encontrado proteínas homólogas en otros estreptococos y Neisseria. Los miembros preferidos de la familia comprenden PhtA, PhtB y PhtD. Más preferiblemente, comprende PhtA y PhtD. Se entiende, sin embargo, que los términos Pht A, B, D y E se refieren a proteínas que tienen las secuencias reveladas en las citaciones siguientes, así como variantes de estas que se encuentran naturalmente (y hechas por el hombre), que tienen una homología de secuencia que es al menos 90% idéntica a las proteínas referenciadas. Preferiblemente, es al menos 95% idéntica, y lo más preferido, es 97% idéntica.

La composición inmunogénica de la invención puede incorporar proteínas de fusión o proteínas de tríada de histidina. Las proteínas de fusión preferidas contienen i) PhtD o un fragmento de esta, enlazada a una PhtE o un fragmento de esta, o ii) PhtB o un fragmento de esta, enlazada a una PhtE o fragmento de esta.

Con respecto a las proteínas PhtX, la PhtA está revelada en WO 98/18930, y es también referida como Sp36. Como se notó anteriormente, es una proteína de la familia tríada de polihistidina y tiene el motivo de señal tipo II de LXXC.

La PhtD está revelada en WO 00/37105, y también se refiere como Sp036D. Como se notó anteriormente, también es una proteína de la familia tríada de polihistidina y tiene el motivo de señal tipo II de LXXC. La PhtB está revelada en WO 00/37105, y es también referida como Sp036. Otro miembro de la familia PhtB es el Polipéptido de Degradación de C3, como se revela en WO 00/17370. Esta proteína también es de la familia tríada de polihistidina y tiene el motivo de señal tipo II de LXXC. Un equivalente inmunológicamente funcional preferido es la proteína Sp42, revelada en WO 98/18930. Un truncado de PhtB (aproximadamente 79 kD) está revelado en WO99/15675 que también se considera un miembro de la familia PhtX.

La PhtE está revelada en WO00/30299 y está referida como BVH-3. " (resaltado fuera del texto)

En vista de lo anterior, resulta indudable que la memoria descriptiva de la solicitud que se encuentra actualmente en trámite **si presenta el sustento adecuado para los antígenos y proteínas reivindicados, toda vez que desde la página 24 hasta la**

Vista la anterior modificación, me permito dirigir ahora la atención del señor Examinador a los siguientes argumentos, en los cuales se responde a la objeción de claridad presentada por el señor Examinador.

En primer lugar, manifiesta el señor Examinador en su Concepto Técnico que:

" El capítulo reivindicatorio carece de soporte por cuanto:

1) Las reivindicaciones relacionadas con la composición inmunogénica que contiene conjugado neumolisina-polisacárido no tienen soporte en el capítulo descriptivo (Reivindicaciones 48-53)

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

Con relación a lo anterior, me permito señalar a ese Despacho que de conformidad con la modificación realizada al capítulo reivindicatorio de la presente solicitud la objeción planteada por el señor Examinador se entiende plenamente superada, **toda vez que las reivindicaciones 43 a 55 del juego de reivindicaciones presentado actualmente han sido canceladas.**

Consecuentemente, el capítulo reivindicatorio modificado es claro y conciso al reclamar el proceso para la purificación de citolisina bacteriana que es objeto de la presente solicitud, y por lo tanto cumple a cabalidad con lo establecido en el Artículo 30 de la Decisión Andina 486 de 2000.

5. UNIDAD DE INVENCION

Con relación con al requisito de Unidad de Invención, el señor Examinador señala que:

Tal como se mencionó en el examen preliminar de patentabilidad, esta oficina también encontró que el nuevo capítulo reivindicatorio carece de unidad de invención. La solicitud contiene varios grupos inventivos:

Grupo I. Proceso para purificar citolisina bacteriana y composiciones y vacunas que la contienen (Reivindicaciones 1-41 y 43-55)

Grupo II. Proceso para detoxificar una toxina bacteriana (Reivindicación 42).

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."

143
137

96/05859 (D4) "*Pneumococcal polysaccharide recombinant pneumolysin conjugate vaccines for immunization against pneumococcal infections*".

Acerca de dicho documento expresa que:

El uso de la neumolisina 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 neumolisina, puesto que se usa cromatografía de afinidad (ver pág 17, D4) la proteína es utilizada para la preparación del mismo tipo de compuestos (ver reivindicaciones; ejemplo 3 a 5).

De esta manera, los compuestos inmunógenos que contienen neumolisina ya habían sido divulgados por D4 y por tanto, este desarrollo carece de novedad e incumple el artículo 16 de la Decisión 486.

Sobre este particular, me permito señalar que la objeción presentada por el señor Examinador está relacionada con las reivindicaciones 46 a 55 en las que se incluye una neumolisina. En este sentido, me permito manifestar a ese Despacho que de conformidad con la información contenida en el nuevo capítulo reivindicatorio que se presenta como anexo al presente memorial, el señor Examinador notará que **las reivindicaciones 46 a 55 han sido canceladas.**

Por lo tanto, la objeción en contra de la novedad de la solicitud en cuestión se entiende plenamente superada, toda vez que **la materia contenida en el capítulo reivindicatorio de la presente invención ya no hace ninguna referencia a compuestos inmunógenos que contienen neumolisina.**

Así las cosas y en vista que la información contenida en el documento D4 no revela el proceso para la purificación de citolisina bacteriana que son objeto de la presente solicitud, **la misma puede considerarse novedosa y cumple a cabalidad con lo establecido en el Artículo 16 de la Decisión Andina 486 de 2000.**

8. **OBJECCIÓN DE FALTA DE NIVEL INVENTIVO**

Ahora bien, el señor Examinador en su Concepto Técnico No. **1654** manifiesta que el objeto de la presente solicitud carece de nivel inventivo con base en las enseñanzas de los documentos Gilbert, R. et.al., **Journal of Molecular Biology**, No. 284 (1998), pp. 1223-1237 (**D1**) "*Self-interaction of Pneumolysin, the Pore-forming Protein Toxin of Streptococcus pneumoniae*"; Wang, Y. et.al., **Biochimica et Biophysica Acta**, No. 1478 (2000), pp. 9-18 (**D2**) "*A new cytolysin from the sea anemone, Heteractis magnifica: isolation, cDNA cloning and functional expresion*"; y Queiroz, J. et.al., **Journal of Biotechnology**, No. 87 (2000), pp. 143-159 (**D3**) "*Hydrophobic interaction chromatography of proteins*".

Sin embargo, la utilización de detergente para optimizar la purificación de proteínas en la técnica de cromatografía por interacción hidrofóbica había sido sugerida por D3 (ver pág 150, columna der).

Como se observa, de los procesos de purificación divulgados en D1 y D3 o 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.

Ahora bien, con relación a la objeción planteada por el señor Examinador relacionada con el nivel inventivo de la solicitud que se encuentra actualmente en trámite, me permito dirigir la atención de ese Despacho a los siguientes argumentos técnicos a través de los cuales se demuestra la evidente altura inventiva de la presente invención a la luz de las enseñanzas de los documentos D1, D2 y D3:

8.1. Consideraciones relativas al documento Gilbert, R. et.al., *Journal of Molecular Biology*, No. 284 (1998), pp. 1223-1237 (D1) "Self-interaction of Pneumolysin, the Pore-forming Protein Toxin of *Streptococcus pneumoniae*"

En términos generales, el documento D1 revela un método para la purificación de neumolisina bacterial. En este sentido, los autores señalan en la página 1233, columna derecha, líneas 38-52, que:

La neumolisina recombinante fue expresada en el vector pKK233-2 (el cual tiene un promotor IPTG-inducible y tiene Resistencia a la ampicilina y a la kanamicina) en *Escherichia coli* M15 en caldo Luria-Bertani y purificado en una modificación del protocolo reportado (Mitchell et al., 1989). El extracto solubilizado de células se pasó por una columna de interacción hidrofóbica de fenil-Sefarosa TSK-5W (Anachem) en PBS 250 mM (8 mM Na_2HPO_4 , 1,5 mM KH_2PO_4 , 2,5 mM KCl, 250 mM NaCl, pH 7,2). La columna fue lavada exhaustivamente y la neumolisina parcialmente purificada se eluyó en agua destilada. La concentración de proteína se determinó por medición de absorbancia a 278 nm, y la pureza por SDS/PAGE (Laemmli, 1970), y la actividad de la neumolisina se midió por dilución en serie e incubación con glóbulos rojos de oveja como está reportado (Owen et al., 1994).

Las fracciones que contenían neumolisina se pasaron posteriormente por una columna de intercambio aniónico SOURCE 15Q (Pharmacia) en un sistema FPLCTM (Pharmacia) con eluyente PBS sin NaCl (8 mM Na_2HPO_4 , 1,5 mM KH_2PO_4 , 2,5 mM KCl, pH 7,76). La neumolisina pura fue eluida en un gradiente de sal de 0 a 1M NaCl (pH final 6,95) y eluida aproximadamente a una concentración de 135 mM de NaCl. La concentración de la proteína se determinó por medición de absorbancia a 278 nm ($\epsilon = 1,36 \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1}$; Morgan et al., 1997) y la pureza por SDS/PAGE. " (resaltado fuera del texto)

[NaCl] menor
pero tendencia
1ro [NaCl] alto
2do [NaCl] bajo
es igual

1451
39

menos dos tipos diferentes de técnicas cromatográficas a diferencia del proceso de la presente invención que solo comprende un paso de cromatografía de interacción hidrofóbica. OK

A su vez, dicha anterioridad **tampoco menciona o sugiere a la persona medianamente versada en la materia el uso de algún tipo de detergente y mucho menos se sugiere que la elusión en la purificación por medio de cromatografía de interacción hidrofóbica se realice con un gradiente de sal como el del proceso revelado en la presente invención.** OK Por lo tanto, el proceso de purificación de citolisina de la solicitud que se encuentra actualmente en trámite es inventivo a la luz de la información del documento D1.

En este orden de ideas, me permito dirigir la atención del señor Examinador a las enseñanzas del Manual Andino del Examinador, relevante publicación preparada por la Secretaría General de la Comunidad Andina, que con relación al estudio del nivel inventivo de una solicitud de patente señala que:

*"La cuestión para el examinador es si la invención reivindicada es o no evidente para un técnico en la materia. La existencia o falta de cualquier ventaja técnica no es un criterio absoluto para reconocer o no un nivel inventivo. El examinador no debe determinar qué "cantidad" de nivel inventivo existe. El nivel inventivo existe o no, no hay respuestas intermedias."*² (resaltado fuera del texto)

Y en vista que el citado documento D1, no sugiere ni motiva a la persona medianamente versada en la materia a la obtención de la materia objeto de la presente solicitud, es claro el nivel inventivo que la misma conlleva y cumple a cabalidad con lo establecido en el Artículo 18 de la Decisión Andina 486 de 2000.

8.2. Consideraciones relativas al documento Wang, Y. et.al., *Biochimica et Biophysica Acta*, No. 1478 (2000), pp. 9-18 (D2) "A new cytolsin from the sea anemone, *Heteractis magnifica*: isolation, cDNA cloning and functional expression"

De otra parte, el documento D2 citado por el señor Examinador dentro de su concepto técnico revela en las páginas 13 y 14 un proceso para la purificación de una citolisina extraída de la anémona de mar *Heteractis Magnifica*.

En este sentido, los autores de la anterioridad D2 señalan que:

"El extracto crudo de H. Magnifica fue fraccionado por filtración en gel utilizando Sephadex G-50 (Fig. 1A). Las fracciones bajo el pico G exhibieron actividad hemolítica y se

² Secretaría General de la Comunidad Andina "Manual para el examen de patentes"

Y al haber demostrado a lo largo de los argumentos presentados, que la materia de la solicitud que se encuentra actualmente en trámite no resulta obvia a partir de la información contenida en el documento D2, se concluye que la misma es inventiva a la luz de dicho documento D2.

8.3. Consideraciones relativas al documento Queiroz, J. et.al., *Journal of Biotechnology*, No. 87 (2000), pp. 143-159 (D3) "Hydrophobic interaction chromatography of proteins"

Ahora bien con relación al documento D3, es preciso señalar que dicha anterioridad comprende un extenso resumen teórico relativo a la técnica de cromatografía de interacción hidrofóbica aplicada a la purificación de proteínas. En este sentido, el Examinador señala que dicha anterioridad sugiere el uso de un detergente para optimizar la purificación de dichas proteínas.

De conformidad con lo anterior, me permito dirigir la atención del señor Examinador a la información revelada en las páginas 150 y 151 del citado documento D3, donde se mencionan los aditivos que pueden ser utilizados en el desarrollo de técnicas de cromatografía de interacción hidrofóbica:

" Como se mencionó anteriormente, ciertos aditivos pueden ser utilizados en HIC, no solo para mejorar la solubilidad de las proteínas o modificar la conformación de las mismas, sino que también para promover la elusión de las proteínas enlazadas. Los aditivos de mayor uso son los alcoholes miscibles en agua (por ejemplo, etanol y etilenglicol), los detergentes (por ejemplo, Triton X-100) y soluciones acuosas de sales caotrópicas. La parte no polar de los detergentes y de los alcoholes logra el desplazamiento de las proteínas enlazadas debido a la competencia por los ligandos de la fase estacionaria de la HIC. Cuando los detergentes iónicos se enlazan al medio, el modo de separación es una mezcla de procesos de intercambio iónico e interacción hidrofóbica, debido a la presencia del grupo cargado del detergente (Janson and Ryde'n, 1993). Las sales caotrópicas promueven la desorción de las proteínas al afectar la estructura ordenada del agua y/o las proteínas enlazadas. Estas últimas pueden ser desnaturalizadas o inactivadas por la alta concentración de los aditivos, por lo tanto, su uso en la elusión es considerado como un último recurso cuando otras condiciones más suaves no favorecen la recuperación de la proteína. Sin embargo, si proteínas fuertemente hidrofóbicas se enlazan a la fase estacionaria, dichos aditivos pueden ser utilizados en la limpieza de la columnas HIC. "
(resaltado fuera del texto)

Visto lo anterior, es preciso aclarar a ese Despacho que si bien el documento D3 citado por el señor Examinador en su concepto técnico menciona las ventajas del uso de aditivos en los procesos de purificación de proteínas realizados por medio de la técnica de cromatografía de interacción hidrofóbica, es evidente también que dicha anterioridad da igual importancia a la inclusión de un detergente que a la inclusión de un alcohol miscible en agua. Es decir, la

8.4. Consideraciones relativas a la combinación de los documentos D1 y D3

Ahora bien, manifiesta el señor Examinador que el proceso de purificación de citolisina bacteriana es obvio a la luz de la combinación de las enseñanzas de los documentos D1 y

D3, toda vez que desde su punto de vista la única diferencia entre el proceso de la presente solicitud y aquel revelado por D1 es que en la anterioridad no se contempla el uso de un detergente en el proceso de purificación, pero el uso de dicho detergente es claramente sugerido por la anterioridad D3.

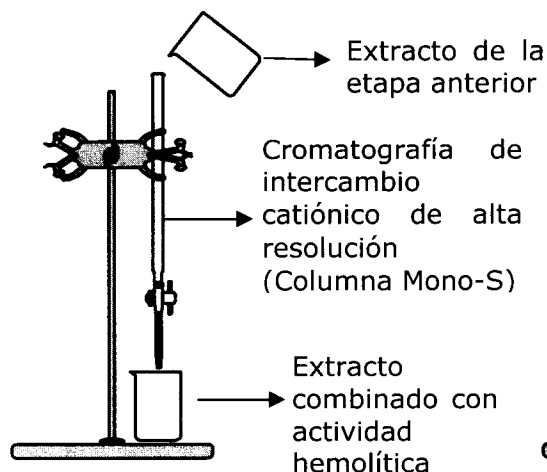
Frente a este particular, me permito dirigir la atención del señor Examinador a los siguientes argumentos por medio de los cuales se demuestra que la materia objeto de la solicitud que se encuentra actualmente en trámite no se deriva de forma obvia a partir de la información revelada en los documentos D1 y D3:

i) Si bien en el citado documento D1 se revela el proceso de purificación de una neumolisina, es claro también que dicho proceso de purificación de neumolisina se realiza en dos etapas: la primera corresponde en efecto a una purificación por medio de la técnica de cromatografía de interacción hidrofóbica **y una segunda etapa del proceso que SI se realiza con un gradiente de sal, pero utilizando otro tipo de técnica cromatográfica diferente como es la cromatografía de intercambio aniónico;** y

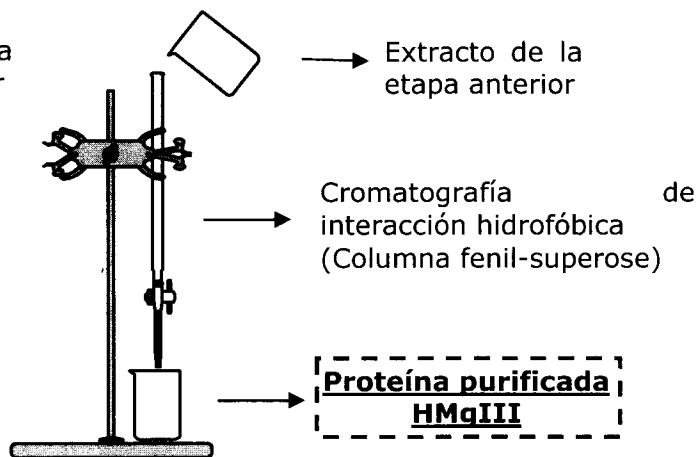
ii) de otra parte, es preciso señalar que dentro de las enseñanzas del documento D3, **no se hace ningún tipo de sugerencia específica para que la persona medianamente versada en la materia incluya dentro del proceso de purificación un detergente que permita mejorar el desempeño de la cromatografía de interacción hidrofóbica**, toda vez que en dicha anterioridad se sugieren de forma muy general tres tipos diferentes de aditivos y no se hace ningún énfasis en la importancia de cada uno.

En este orden de ideas cabe aquí preguntarse: ¿qué motivaría a la persona medianamente versada en la materia a escoger del citado documento D1 únicamente la técnica de cromatografía de interacción hidrofóbica y no el proceso de dos etapas que es revelado allí?, ¿por qué incluir un gradiente de sal en el proceso, si dicho gradiente revelado en D1 es necesario en la etapa de cromatografía de intercambio aniónico y no en la etapa de cromatografía de interacción hidrofóbica?, y finalmente ¿qué motivaría a la persona medianamente versada en la materia a incluir específicamente un detergente en dicho sistema cromatográfico si en D3 se sugieren tres diferentes tipos de aditivos (alcoholes miscibles en agua, detergentes y sales caotrópicas) y no mencionan cual de ellos es más útil experimentalmente?

3) Etapa



4) Etapa



Siendo evidente de lo anterior que **dicho proceso revelado por la anterioridad D2 no sugiere exclusivamente el uso de una técnica como la cromatografía de interacción hidrofóbica para lograr la purificación de las citolisinas**. En este sentido, resulta evidente afirmar que dicho documento sugiere un proceso de cuatro etapas que incluye tres técnicas cromatográficas diferentes como lo son exclusión por tamaño (filtración en gel), intercambio catiónico e interacción hidrofóbica.

Así, para la persona medianamente versada en la materia no resultaría obvio ni evidente el uso de una sola técnica de purificación como la cromatografía de interacción hidrofóbica para la purificación de citolisinas, toda vez que **la anterioridad citada revela que son necesarias al menos 4 etapas para lograr la purificación de una proteína de tipo citolisina**.

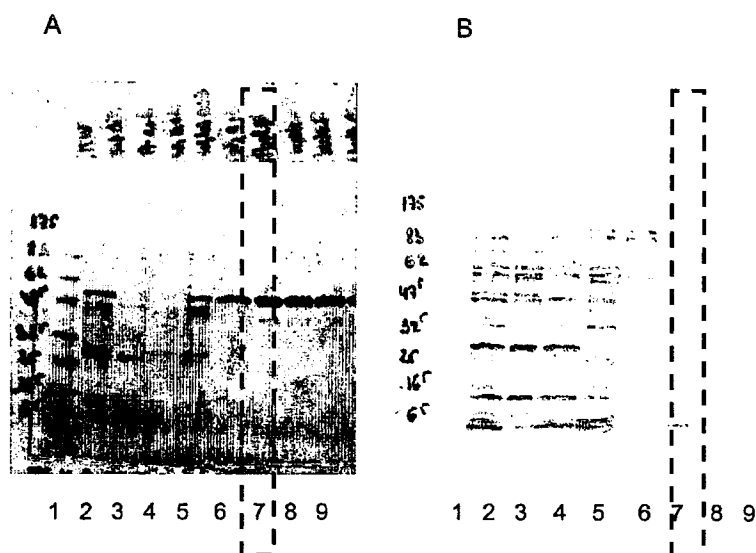
De otra parte, considero de gran importancia señalar nuevamente que si bien el citado documento D3 menciona la utilidad de los aditivos para mejorar el desempeño de la cromatografía de interacción hidrofóbica, **sin embargo como resalté anteriormente allí se mencionan tres diferentes tipos de aditivos (alcoholes miscibles en agua, detergentes y sales caotrópicas)** de los cuales se menciona el mecanismo de acción en el proceso de purificación de proteínas a través de dicha técnica cromatográfica, pero no se menciona cual resulta más útil experimentalmente que los demás.

Siguiendo con la misma línea de argumentación me permito dirigir la atención del señor Examinador a las enseñanzas del Manual Andino del Examinador, que con relación a la combinación de documentos en la evaluación del Nivel Inventivo de una solicitud de patente señala que:

" La pregunta a contestar es si teniendo en cuenta el estado de la técnica en su conjunto existe **alguna indicación que lleve a la persona versada en la materia a modificar o adaptar el estado de la técnica** más cercano para resolver el problema

En contraste, el nivel inventivo de la presente solicitud queda demostrado al observar el ejemplo 1 de la memoria descriptiva, en donde con proceso de cromatografía en columna de una sola etapa se obtiene una citolisina de muy alta pureza. La pureza de dicha citolisina queda demostrada al observar la figura 1, línea 7 (SDS-PAGE) en donde se observa una citolisina altamente purificada. Así las cosas, la figura 1 (Panel A) muestra el grado de purificación de la proteína obtenido en el ensayo de SDS-PAGE y posterior teñido con azul de Coomassie mientras que en la misma figura 1 (Panel B) se observa la ausencia de proteínas contaminantes del ensayo de Western Blot con anticuerpos contra E. coli. La siguiente imagen ilustra mejor los resultados señalados:

Figura 1



Este resultado se obtiene al utilizar una alta concentración de sal y la adición de un detergente en el buffer de carga. Dichos cambios conducen a una unión más fuerte entre la neumolisina y la columna debido a que **bajo éstas condiciones se forma un agregado soluble en el cual las unidades de proteína forman una estructura pseudo-porosa que continua unida a la fase estacionaria de fenil-sefarosa** bajo condiciones a las cuales muy pocas proteínas pueden retenerse. En este sentido, es preciso resaltar que con el método sugerido por el solicitante **se logra la separación de neumolisina de una pureza entre 98-100%.**

De conformidad con lo anterior, me permito señalar al señor Examinador que **el solicitante ha encontrado que para producir dicho agregado soluble es necesario que exista una concentración alta de sal y de la presencia del detergente.** En este sentido, los autores de la presente invención han encontrado de forma sorprendente que **dicho agregado soluble de citolisina se enlaza de forma muy fuerte a la columna, permaneciendo así incluso bajo la presencia de concentraciones de detergente que**

JOSE LLORED CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

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

Señor Superintendente,

Alicia Lloreda Ricaurte

ALICIA LLORED RICAURTE

T. P. 53.215

NOTARIA DEL CIRCULO DE BOGOTÁ D.C.
EXPOSICIÓN DE MOTIVOS
EXPOSICIÓN DE MOTIVOS

El presente es el documento de la solicitud de patente de invención de la persona física *Alicia Lloreda Ricaurte* identificada con cédula No. *39690.713* del Consejo Superior de la Judicatura, quien autentica la firma puesta por ella en este escrito.

Alicia Lloreda Ricaurte

C.C. No. 39.690.713 de Usaquén

[Firma]



REIVINDICACIONES

① Un proceso para purificación de una citolisina bacteriana, que comprende los pasos de:

- cualquier tipo cel. sustentado*
- a) cultivar un cultivo de células que expresan citolisina bacteriana;
 - b) preparar un extracto a partir del cultivo que contiene citolisina bacteriana;
 - c) enlazar la citolisina bacteriana de agregado soluble contenida en el extracto, en presencia de detergente, a un material de cromatografía de interacción hidrofóbico, bajo condiciones de sal alta (preferiblemente sal 0.6-2 M); *concentración?*
 - d) eluir la citolisina bacteriana en presencia de detergente bajo condiciones de sal baja (preferiblemente sal 0-0.2M).

2. El proceso de la reivindicación 1, que además comprende los pasos de:

- Etapas adicionales*
- e) remover el detergente de la citolisina bacteriana
 - f) solubilizar la citolisina bacteriana mediante la adición de un desnaturalizante.
 - g) remover el desnaturalizante de la citolisina bacteriana.

3. El proceso de la reivindicación 1 o 2, en donde la citolisina bacteriana es neumolisina neumocócica. *Subir a RV1.*

4. El proceso de las reivindicaciones 1-3, en donde el paso b) involucra el rompimiento mecánico de las células.

5. El proceso de las reivindicaciones 1-4, en donde el paso b) involucra el tratamiento con detergente.

6. El proceso de las reivindicaciones 1-5, en donde el mismo detergente está presente en los pasos c) y d).

7. El proceso de la reivindicación 5, en donde el mismo detergente está

8. El proceso de las reivindicaciones 1-7, en donde el detergente está presente en una concentración entre 0.1 y 5% (p/v).

Subir RV 1.

9. El proceso de cualquier reivindicación anterior, en donde el paso b) involucra la centrifugación de material de célula deteriorado y recolección de un sobrenadante como el extracto del paso c).

10. El proceso de cualquier reivindicación anterior, en donde el material de cromatografía de interacción hidrofóbico usado en el paso c) contiene grupos aromáticos.

11. El proceso de la reivindicación 10, en donde el material de cromatografía hidrofóbico es fenil-sefaroza.

Subir RV 1.

12. El proceso de cualquier reivindicación anterior, en donde el detergente presente en la solución usada en el paso c) y/o paso d) es un detergente alifático.

13. El proceso de cualquier reivindicación anterior, en donde el detergente es lauroil sarcosinato de sodio.

Subir RV 1.

14. El proceso de cualquier reivindicación anterior, en donde las condiciones de sal alta del paso c) contienen sal entre 0.6 M y 2M.

15. El proceso de cualquier reivindicación anterior, en donde la solución usada en el paso c) y/o d) contiene una sal seleccionada del grupo consistente de cloruro de sodio, cloruro de magnesio, cloruro de amonio, sulfato de sodio, sulfato de magnesio, sulfato de amonio, fosfato de sodio, fosfato de magnesio, fosfato de amonio.

16. El proceso de cualquier reivindicación anterior, en donde las condiciones usadas en el paso c) y/o paso d) están entre pH 6-8, preferiblemente alrededor de pH 7.

17. El proceso de cualquier reivindicación anterior, en donde las

18. El proceso de la reivindicación 17, en donde las condiciones usadas en el paso d) contienen sal 0-40 mM.
19. El proceso de cualquier reivindicación anterior, en donde el paso e) involucra la remoción de detergente mediante diafiltración o diálisis.
20. El proceso de la reivindicación 19, en donde la diafiltración/diálisis es contra un amortiguador bajo en sal de pH 8-10, preferiblemente alrededor de pH 9.
21. El proceso de las reivindicaciones 2-20, en donde el paso f) involucra la desnaturalización de citolisina bacteriana mediante la adición de un desnaturalizante, y el paso g) involucra el repliegue de la citolisina bacteriana mediante la remoción gradual del desnaturalizante.
22. El proceso de las reivindicaciones 2-21, en donde el desnaturalizante usado en el paso f) es clorhidrato de guanidina.
23. El proceso de la reivindicación 22, en donde se usa clorhidrato de guanidina 5-8 M.
24. El proceso de la reivindicación 22 o 23, en donde la citolisina bacteriana es contactada con urea 5-9 M durante el paso f).
25. El proceso de la reivindicación 24, en donde el paso f) involucra contactar la citolisina bacteriana con clorhidrato de guanidina 5-8 M, seguido del intercambio del clorhidrato de guanidina por urea 5-9M.
26. El proceso de las reivindicaciones 21-25, en donde un agente reductor está presente durante al menos parte de los pasos f) y g).
27. El proceso de la reivindicación 26, en donde el agente reductor es DTT 0.1-10 mM, preferiblemente DTT alrededor de 1 mM.
28. El proceso de la reivindicación 2-27, en donde el paso g) involucra la

46 154
148

29. El proceso de la reivindicación 28, en donde la diafiltración o diálisis es contra una solución de pH 7-9.

30. El proceso de cualquier reivindicación anterior, que comprende un paso adicional de destoxificación de la citolisina bacteriana mediante tratamiento químico con un reactivo de reticulación. *paso adicional.*

31. El proceso de la reivindicación 30, en donde el tratamiento químico involucra el uso de un agente de reticulación que es reactivo con grupos amina y sulfhidrilo.

32. El proceso de la reivindicación 30, en donde el reactivo de reticulación contiene uno o más químicos seleccionados del grupo consistente de formaldehído, glutaraldehído, N-hidroxisuccinimido ésteres y GMBS.

33. El proceso de cualquier reivindicación anterior, que comprende un paso adicional de conjugar la citolisina bacteriana a un polisacárido capsular bacteriano.

FORMULACION. 34. El proceso de cualquier reivindicación anterior, que comprende un paso adicional de formular la citolisina bacteriana en una composición de vacuna con un excipiente farmacéuticamente aceptable. *System? Product.*

35. El proceso de la reivindicación 34, en donde la citolisina bacteriana es formulada con proteína A enlazante de colina, o un fragmento inmunológico de esta.

36. El proceso de la reivindicación 34 o 35, en donde la citolisina bacteriana es formulada con uno o más de PhtA, PhtB, PhtD o PhtE, o un fragmento inmunogénico de estas.

37. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 34-36, en donde la citolisina bacteriana es formulada con un antígeno de *Haemophilus influenzae* no clasificable (NtHi).

47 155
140

38. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 34-37, en donde la citolisina bacteriana es formulada con un antígeno de *Moraxella catarrhalis*.

39. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 34-38, en donde la citolisina bacteriana es formulada con un antígeno de RSV.

40. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 34-39, en donde la citolisina bacteriana es formulada con un antígeno del virus de parainfluenza.

41. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 34-40, en donde la citolisina bacteriana es formulada con un antígeno del virus de influenza.

156
150

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

Abogada
Alicia Lloreda

ASUNTO	Radicación	05-90928
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	430
	Oficio	12311
	Folios	005

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

<u>Descripción:</u>	Folios: 61 a 102 como se radicó inicialmente.
<u>Reivindicaciones:</u>	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 Folios: 151 a 155 modificadas el 06/09/2010
<u>Figuras:</u>	Folios: 109 a 113 como se radicó inicialmente.
<u>Prioridad:</u>	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.

157
158
159

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 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
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

5. Análisis de patentabilidad (artículo 14 D486)

5.1. Nivel inventivo (artículo 18 D486)

La reivindicación 1 y dependientes reclaman un proceso para la purificación de una citolisina bacteriana que comprende los pasos de:

- a) cultivar células que expresan citolisina bacteriana;
- b) preparar un extracto a partir del cultivo que contiene citolisina bacteriana;
- c) enlazar la citolisina bacteriana de agregado soluble contenida en el extracto, en presencia de detergente, a un material de cromatografía de interacción hidrofóbica, bajo condiciones de alta concentración de sal (preferiblemente 0.6-2 M);
- d) eluir la citolisina bacteriana en presencia de detergente bajo condiciones de baja concentración de sal (preferiblemente sal 0-0.2 M).

de esta reivindicación se desprende el resto de la invención, en la cual se especifica las condiciones para cada paso del proceso, el tipo de detergente utilizado y demás.

En el estado de la técnica se conocían métodos de purificación para citolisina bacteriana, tal como el presentado en Gilbert, *et al.* (D1), en el cual se realiza:

- la purificación de la misma proteína de la solicitud, la pneumolisina (ver resumen)
- se usa la misma técnica cromatográfica, la cromatografía de interacción hidrofóbica (ver resumen; pág 1233 columna der);
- se utilizan concentraciones altas de sal para elucidar la citolisina, específicamente se utiliza un gradiente de sal de 0-1 M de NaCl (ver pág 1233, columna der);

158
152
150

6. Conclusión:

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

N°	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
D3	Queiroz, J. <i>et al.</i> , Journal of Biotechnology 87 (2001): 143-159	1-41	Nivel inventivo
D4	WO 96/05859	34-41	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 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
07 JUL 2010

CONCEPTO TÉCNICO No. 3129	EXAMINADOR TÉCNICO Código No.202052
-------------------------------------	---

JOSE LLORED CAMACHO & CO.

ABOGADOS

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 05-090928- -00009-0000

Fecha: 2010-12-23 16:56:08 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act: 444 RESPUESTAREQUE Folios: 9

Señor

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRI.

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 C07K 14/315.-Expediente número 05-090.928.-

1. Me refiero al auto dictado por ese Despacho notificado por fijación en lista de 1 de Octubre de 2010.

2. Con el fin de responder las objeciones expuestas por el Señor Examinador en su Concepto Técnico No. **3129** en relación con los requisitos de Claridad y Nivel inventivo, me permito presentar las siguientes modificaciones y argumentos técnicos por medio de los cuales se superan completamente dichas objeciones.

3. **MODIFICACIONES A LA SOLICITUD**

Inicialmente me permito manifestar que el solicitante ha decidido modificar de la siguiente manera el capítulo reivindicatorio:

• En la reivindicación 1:

- se ha reemplazado la frase 'citolisina bacteriana' por la nueva frase 'neumolisina neumocócica', de conformidad con lo establecido, por ejemplo, en la reivindicación 3 presentada originalmente;
- se ha definido que el detergente es lauroil sarcosinato de sodio y está presente en una concentración entre 0,1% y 5% (p/v), de conformidad con lo establecido, por ejemplo, en las reivindicaciones 8 y 13 presentadas originalmente;
- se ha definido que el material cromatográfico es fenil-sefarosa, lo anterior de acuerdo con lo mencionado en la reivindicación 11 presentada originalmente;

lo tanto cumple a cabalidad con los requisitos establecidos en el artículo 34 de la Decisión 486 de 2000.

4. **Claridad de las Reivindicaciones**

Ahora bien, el señor Examinador ha objetado la claridad del capítulo reivindicatorio aduciendo lo siguiente:

- *"La reivindicación principal hace referencia a un proceso de purificación de una citolisina bacteriana. Para definir claramente este proceso en la reivindicación independiente debe:*
 - a. *Indicarse todas las etapas que lo conforman en la reivindicación principal o indicarse si estas etapas son opcionales con reivindicaciones dependientes. Esto debe aclararse respecto a las reivindicaciones 2 y 30:*
 - b. *Especificar todos los elementos que lo componen:*
 - i. *tipo de soporte estacionario (reivindicación 11),*
 - ii. *tipo de detergente empleado (reivindicación 13) y concentración del mismo (reivindicación 8),*
 - iii. *tipo de citolisina bacteriana purificada (reivindicación 3),*
 - iv. *tipo de sales empleadas (reivindicación 15) y,*
 - v. *demás especificaciones necesarias para las etapas complementarias (reivindicaciones 21-29, 31, 32)"*

Atendiendo a lo anterior y de conformidad con lo mencionado en el numeral 3 del presente memorial, me permito manifestar que la reivindicación 1 ha sido modificada con el objetivo de definir la proteína específica a purificar, así como el detergente, el material cromatográfico y la sal que pueden ser empleados como parte del proceso reivindicado.

Así mismo, en dicha reivindicación 1 se han incluido cuatro (4) nuevos pasos como parte del proceso de purificación, los cuales permiten especificar aún más las características técnicas de dicho proceso. Sin embargo, en este punto resulta de gran importancia aclarar que tales nuevos pasos son opcionales, toda vez que, por ejemplo, si el detergente es retenido la proteína se mantiene ventajosamente en forma de agregados solubles. Por su parte, la conjugación de la neumolisina purificada únicamente es necesaria para la producción de formulaciones de vacuna, sumado a que es bien sabido que la neumolisina es un buen inmunógeno y

Finalmente, en vista de lo anteriormente mencionado me permito manifestar que el nuevo capítulo reivindicatorio de la solicitud cumple a cabalidad con las disposiciones de patentabilidad establecidas en el artículo 30 de la Decisión 486 de 2000, toda vez que es claro, conciso y presenta pleno sustento en la descripción de la solicitud.

5. **Análisis del nivel inventivo de la solicitud**

De otro lado, el señor Examinador ha objetado el nivel inventivo de la solicitud en cuestión basándose en las enseñanzas de los siguientes documentos:

(D1) → **Gilbert R., et al., J. Mol. Biol. (1998) 284: 1223-1237**

(D3) → **Queiroz, J. et al., *Journal of Biotechnology* 87 (2001): 143-159**

(D4) → **WO 96/05859**

En este sentido, el señor Examinador argumenta básicamente que en el documento D1 se enseñan métodos de purificación para citolisina bacteriana, y que la única diferencia entre dicha anterioridad y la solicitud en estudio es el proceso simplificado de elucidación de la proteína que se revela en la solicitud mediante el uso del detergente. Sin embargo, de acuerdo con el señor Examinador, la optimización de la técnica de cromatografía por interacción hidrofóbica por medio de la utilización de detergente para incrementar la pureza de proteínas ya había sido sugerida por D3. Por lo tanto, el señor Examinador asevera que el experto en la materia habría podido realizar la extracción de pneumolisina a partir de una técnica como la divulgada en D1 y optimizarla a partir de la información divulgada en D3, sin requerir de una actividad inventiva.

Por otra parte, de acuerdo con el señor Examinador el uso de la pneumolisina para la preparación de compuestos inmunógenos, incluso en moléculas conjugadas, ya había sido divulgado en el documento D4, a tal punto que la única diferencia entre dicha anterioridad y la solicitud es que D4 utiliza un método de purificación diferente para obtener la pneumolisina, lo cual, sin embargo, no le confiere actividad inventiva.

Visto lo anterior y con el ánimo de demostrar ante ese Despacho el inequívoco carácter inventivo de la invención en cuestión frente a las enseñanzas de los documentos D1, D3 y D4, a continuación me permito señalar los siguientes aspectos técnicos:

162
156

la neumolisina mediante un único paso cromatográfico, hecho que es demostrado, por ejemplo, mediante los resultados experimentales revelados en la figura 1 de la solicitud de patente en cuestión, donde en el Panel A se muestra el grado de purificación de la neumolisina empleando azul de Coomassie, mientras que en el Panel B se muestra la ausencia de proteína contaminante utilizando un procedimiento de manchado Western que emplea anticuerpos anti E.Coli.

(c) De acuerdo con lo anterior, es claro que el solicitante de la presente invención logró desarrollar un proceso de purificación que permite optimizar el enlace de la citolisina a una columna cromatográfica de fenil-sefarina mediante el uso de altas concentraciones de sal y adicionando lauroil sarcosinato de sodio al buffer de carga. Específicamente, es claro que dichas modificaciones permitieron mejorar el enlace de la neumolisina a la columna cromatográfica debido a que bajo esas condiciones se forma un agregado soluble en el que las unidades de proteína adquieren una estructura de poro que les permite enlazarse a la fenil-sefarosa bajo condiciones en las que muy pocas proteínas lo hacen.

Por lo tanto, es claro que el proceso de purificación de neumolisina revelado en la solicitud de patente en cuestión presenta un inequívoco carácter inventivo frente a las enseñanzas del documento D1.

Frente a las enseñanzas del documento D3:

(a) Ahora bien, el documento Queiroz, J. et al., *Journal of Biotechnology* 87 (2001): 143-159 divulga básicamente una revisión general del proceso de interacción cromatográfica hidrofóbica de proteínas. Sin embargo, es claro que en dicha anterioridad no se enseña y tampoco se sugiere un proceso de purificación de neumolisina citocócica que implique el empleo de lauroil sarcosinato de sodio en una concentración entre 0,1% y 5% p/v, así como el empleo de sal a una concentración entre 0,6 - 2M seleccionada entre cloruro de sodio, cloruro de magnesio, cloruro de amonio, sulfato de sodio, sulfato de magnesio, sulfato de amonio, fosfato de sodio, fosfato de magnesio y fosfato de amonio. Así mismo, en D3 tampoco se menciona la capacidad de la neumolisina para formar agregados solubles en la presencia de detergente y a altas concentraciones de sal.

(b) De conformidad con lo anterior y a partir de la atenta lectura de D3 es claro que dicho documento simplemente enseña de manera general algunas opciones para alterar los procesos cromatográficos que implican

En este punto resulta de gran importancia destacar una vez más ante ese Despacho que en la columna derecha de la página 150 del documento D3 claramente se menciona que la eventual adición de detergente promueve la elución de las proteínas unidas a la columna cromatográfica, de manera que para la persona medianamente versada en la materia la adición de detergente tan sólo representa un mecanismo para limpiar la columna luego de su uso, eluyendo todo el material que permanece enlazado incluso luego de llevar a cabo eluciones a bajas concentraciones de sal.

función de la gente según D3 es #.

En consecuencia, es claro que la persona medianamente versada en la materia que hubiera pretendido mejorar las condiciones de enlace entre la neumolisina neumocócica y fenil-sefaroza dentro de una columna cromatográfica no habría encontrado en el documento D3 indicación técnica alguna sugiriéndole el aumento en la concentración de sal y la adición de lauroil sarcocinato de sodio (detergente) al buffer de carga.

(c) Adicionalmente, considero de gran importancia resaltar que el método de purificación de neumolisina divulgado en el documento D1 es una versión ligeramente modificada del proceso desarrollado por T. J. Mitchell en 1989, el cual, sin embargo, ha sido utilizado durante los últimos años como método estándar para la purificación de dicha proteína. Visto lo anterior, la pregunta que surge es la siguiente:

Si resulta obvio obtener los resultados experimentales descritos en la solicitud de patente en cuestión a partir de las enseñanzas del estado de la técnica anterior, ¿por qué desde el año 1989 nadie había realizado las modificaciones necesarias en el proceso descrito por J. T. Mitchell para optimizar la purificación de neumolisina?

La respuesta a dicha pregunta es que el novedoso proceso revelado en la presente invención, el cual permite de manera sorprendente llevar a cabo la purificación de neumolisina citocócica mediante un proceso cromatográfico de un sólo paso y haciendo uso de altas concentraciones de sal y lauroil sarcosinato de sodio como detergente, no habría podido ser desarrollado por una persona medianamente versada en la materia sin poner en práctica su habilidad inventiva.

Como consecuencia de lo anteriormente expuesto, me permito manifestar que el nuevo capítulo reivindicatorio de la solicitud en cuestión es inventivo.

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

En vista de lo anterior, ruego a usted proceder a estudiar nuevamente la solicitud a la luz las modificaciones y los argumentos presentados y conceder el privilegio de patente solicitado.

Señor Superintendente,



ALICIA LLOREDA RICAURTE

T. P. 53.215

NOTARIA 41 DEL CIRCULO DE BOGOTÁ D.C.
DEPARTAMENTO DE CUNDINAMARCA
REPUBLICA DE COLOMBIA

El Notario 41 del círculo de Bogotá, da fe de que compareció personalmente Alicia Lloreda Ricaurte
Identificada (a) con: 39 690 713 y tarjeta
profesional de abogado No. 53 215 del Consejo
Superior de la Judicatura, quien autentica la firma puesta por ella
(e) mismo en este escrito.
(v.l. 64 C. P. C. Decreto. 2622/69 mod. 36)

 09 Dic. 2010
ALICIA LLOREDA RICAURTE
C.C. No. 39.690.713 de Usaquén.

NOTARIA 41
CIRCULO DE BOGOTÁ D.C.
REPUBLICA DE COLOMBIA
NOTARIO 41 EN PROCEIMIENTO

REIVINDICACIONES

- ① Un proceso para la purificación de una neumolisina neumocócica, que comprende los pasos de:
- cultivar un cultivo de células que expresan neumolisina neumocócica;
 - preparar un extracto a partir del cultivo que contiene neumolisina neumocócica;
 - enlazar la neumolisina neumocócica de agregado soluble contenida en el extracto, en presencia de 0,1-5% (p/v) de detergente que es lauroil sarcosinato de sodio, a un material de cromatografía de fenil-sefarosa, bajo condiciones de sal alta (preferiblemente sal 0,6-2 M), donde la sal es seleccionada del grupo consistente de cloruro de sodio, cloruro de magnesio, cloruro de amonio, sulfato de sodio, sulfato de magnesio, sulfato de amonio, fosfato de sodio, fosfato de magnesio, fosfato de amonio;
 - eluir la neumolisina neumocócica en presencia de 0,1-5% (p/v) de detergente que es lauroil sarcosinato de sodio bajo condiciones de sal baja (preferiblemente sal 0-0,2M), donde la sal es seleccionada del grupo consistente de cloruro de sodio, cloruro de magnesio, cloruro de amonio, sulfato de sodio, sulfato de magnesio, sulfato de amonio, fosfato de sodio, fosfato de magnesio, fosfato de amonio;
 - opcionalmente remover el detergente de la neumolisina neumocócica;
 - opcionalmente solubilizar la neumolisina neumocócica mediante la adición de un desnaturalizante que contiene 5-8 M de clorhidrato de guanidina ó 5-9 M de úrea;
 - opcionalmente remover el desnaturalizante de la neumolisina neumocócica mediante diafiltración o diálisis; y,
 - opcionalmente destoxificar la neumolisina neumocócica mediante tratamiento químico con un reactivo de reticulación, en donde el reactivo de reticulación contiene uno o más químicos seleccionados del grupo consistente de:

166
160

formaldehído, glutaraldehído, N-hidroxisuccinimido ésteres y GMBS.

2. El proceso de la reivindicación 1, en donde el paso b) involucra el rompimiento mecánico de las células.
3. El proceso de las reivindicaciones 1-2, en donde el paso b) involucra el tratamiento con detergente.
4. El proceso de cualquier reivindicación anterior, en donde el paso b) involucra la centrifugación de material de célula deteriorado y recolección de un sobrenadante como el extracto del paso c).
5. El proceso de cualquier reivindicación anterior, en donde las condiciones usadas en el paso c) y/o paso d) están entre pH 6-8, preferiblemente alrededor de pH 7.
6. El proceso de cualquier reivindicación anterior, en donde las condiciones usadas en el paso d) contienen sal 0-0,1 M.
7. El proceso de la reivindicación 6, en donde las condiciones usadas en el paso d) contienen sal 0-40 mM.
8. El proceso de cualquier reivindicación anterior, en donde el paso e) involucra la remoción de detergente mediante diafiltración o diálisis.
9. El proceso de la reivindicación 8, en donde la diafiltración/diálisis es contra un amortiguador bajo en sal de pH 8-10, preferiblemente alrededor de pH 9.
10. El proceso de las reivindicaciones 1-9, el cual comprende los pasos f) y g), en donde el paso f) involucra la desnaturalización de la neumolisina neumocócica mediante la adición de un desnaturalizante, y el paso g) involucra el repliegue de la citolisina bacteriana mediante la remoción gradual del desnaturalizante.

11. El proceso de las reivindicaciones 1-10, en donde el desnaturalizante usado en el paso f) es clorhidrato de guanidina 5-8 M.

12. El proceso de la reivindicación 11, en donde la neumolisina neumocócica es contactada con úrea 5-9 M durante el paso f).

13. El proceso de la reivindicación 12, en donde el paso f) involucra contactar la neumolisina neumocócica con clorhidrato de guanidina 5-8 M, seguido del intercambio del clorhidrato de guanidina por úrea 5-9 M.

14. El proceso de las reivindicaciones 10-13, en donde un agente reductor está presente durante al menos parte de los pasos f) y g).

15. El proceso de la reivindicación 14, en donde el agente reductor es DTT 0,1-10 mM.

16. El proceso de las reivindicaciones 1-15, en donde el paso g) involucra la remoción del desnaturalizante mediante diafiltración o diálisis.

17. El proceso de la reivindicación 16, en donde la diafiltración o diálisis es contra una solución de pH 7-9.

18. El proceso de cualquier reivindicación anterior, que comprende el paso adicional h) de destoxificación de la citolisina bacteriana mediante tratamiento químico con un reactivo de reticulación.

19. El proceso de la reivindicación 18, en donde el tratamiento químico involucra el uso de un agente de reticulación que es reactivo con grupos amina y sulfhidrilo.

20. El proceso de cualquier reivindicación anterior, que comprende un paso adicional de conjugar la citolisina bacteriana a un polisacárido capsular bacteriano.

162

~~165~~

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

Radicación: 05-90928

**Clasificación Internacional (IPC): C07K 14/315; A61K 39/09; C12P 21/00;
Concepto Técnico: 582**

Patente de Invención	☒	Patente de Modelo de Utilidad	☐
Vía Nacional	☐		
Vía PCT (fase nacional)	☒	Cap. I	☐ Cap. II ☒
No. Sol. Internacional		PCT/EP2004/002641	
Publicación Internacional		WO 2004/081515	

Como resultado del examen definitivo de fondo, realizado con fundamento en el artículo 48 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica:

1. Documentos estudiados

<u>Descripción:</u>	Folios: 61 a 102 como se radicó inicialmente.
<u>Reivindicaciones:</u>	Folios: 26 a 31 como se presentaron en fase interna. Folios: 44 a 47 modificadas en fase internacional Folios: 103 a 108 modificadas en fase nacional Folios: 151 a 155 modificadas el 06/09/2010 Folios: 165 a 167 modificadas el 23/12/2010
<u>Figuras:</u>	Folios: 109 a 113 como se radicó inicialmente.
<u>Rta del solicitante:</u>	Folios: 140 a 150 presentada el 06/09/2010 Folios: 159 a 164 presentada el 23/12/2010
<u>Prioridad:</u>	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.

169
163

- sulfato de sodio, sulfato de magnesio, sulfato de amonio, fosfato de sodio, fosfato de magnesio, fosfato de amonio;
- e) opcionalmente remover el detergente de la neumolisina neumocócica;
 - f) opcionalmente solubilizar la neumolisina neumocócica mediante la adición de un desnaturalizante que contiene 5-8 M de clorhidrato de guanidina ó 5-9 M de úrea;
 - g) opcionalmente remover el desnaturalizante de la neumolisina neumocócica mediante diafiltración o diálisis, y;
 - h) opcionalmente destoxificar la neumolisina neumocócica mediante tratamiento químico con un reactivo de reticulación, en donde el reactivo de reticulación contiene uno o más químicos seleccionados del grupo consistente de: formaldehído, glutaraldehído, N-hidroxisuccinimido, ésteres y GMBS.

En el estado del arte no se conocía un procedimiento para purificar neumolisina neumocócica tal como el divulgado por la solicitud en estudio. Por tanto, el proceso reclamado en la reivindicación 1 y dependientes tiene novedad y cumple con los requisitos del artículo 16 de la D486.

5.2. Nivel inventivo (artículo 18 D486)

Con base en los argumentos presentados por el solicitante a favor del nivel inventivo que presenta la solicitud, esta oficina reconsideró su objeción al mismo con los documentos D1 (Gilbert R., *et.al.* J. Mol. Biol. (1998) 284: 1223-1237) y D3 (Queiroz, J. *et.al.*, Journal of Biotechnology 87 (2001): 143–159). De esta manera, el procedimiento para purificar neumolisina neumocócica representa un avance para el estado de la técnica por cuanto:

- El proceso de purificación de la invención permite lograr entre un 98 y un 100% de pureza de la neumolisina mediante un único paso cromatográfico, mientras que el proceso divulgado en D1 realiza una purificación parcial y requiere un segundo paso de purificación por intercambio aniónico;
- Las condiciones específicas de concentraciones de sal y detergente aportadas por la solicitud permiten que la neumolisina tenga una mejor capacidad de enlace con la columna cromatográfica, lo que permite incrementar la pureza de la toxina neumocócica obtenida;
- La modificación del proceso cromatográfico de interacción hidrofóbica por utilización de detergente permite obtener agregados solubles de neumolisina, con lo cual se logra la formación de unidades que adquieren una estructura de poro que les permite enlazarse de una manera óptima a fenil-sefarosa. Esta actividad específica del detergente no había sido reportada por D3.

Así, de los procesos de purificación de neumolisina reclamado por la solicitud en estudio, presenta un procedimiento simplificado y con el que se obtienen proteínas neumolisina de mayor pureza. De esta manera, el proceso reclamado presenta nivel inventivo y cumple el artículo 18 de la D486.

5.3. Aplicación industrial

La solicitud cumple con el requisito de aplicabilidad industrial por proveer un proceso para la purificación de neumolisina neumocócica que puede ser usado en la industria farmacéutica.