

As. 123.204

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-010531-A-00003-0000

Fecha: 2013-07-24 15:55:09 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 12

Señor

DIRECTOR DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E.

S.

D.

REF: Expediente No. **09-10531-A-** solicitud de patente de invención a favor de **COLUMBIA UNIVERSITY** Título **ENZIMAS COCAINA ESTERASA MUTANTES**

RESPUESTA A EXAMEN DE FONDO

JUAN PABLO CADENA SARMIENTO, portador de la tarjeta profesional No. 57.492 del C.S.J., obrando como apoderado de la sociedad solicitante me permito dar respuesta al oficio número 4825 relacionado con la patentabilidad de la presente invención y notificado por fijación en lista el 12 de Marzo de 2013.

Con el ánimo de subsanar las objeciones planteadas por el señor Examinador, nos permitimos presentar un nuevo pliego reivindicatorio compuesto por trece (13) reivindicaciones, en donde no se amplía en ningún momento la materia inicialmente divulgada, y se encuentra enteramente sustentado en la descripción. Adjuntamos el recibo correspondiente a las reivindicaciones adicionales.

En relación con la objeción emitida sobre el título, nos permitimos solicitar el cambio del mismo por "**ENZIMAS COCAINA ESTERASA MUTANTES**".

Ahora bien, las reivindicaciones 20 y 21 han sido eliminadas en el nuevo pliego reivindicatorio con el fin de superar la objeción de excepción a la patentabilidad impuesta por su Despacho.

Claridad

El nuevo pliego reivindicatorio corresponde a una justa generalización de las enseñanzas de la descripción, al tener en cuenta que el mismo se centra en los polipéptidos de cocaína esterasa que se encuentran debidamente soportados por la presente descripción. Así las cosas, damos por superada la objeción impuesta sobre la descripción de la presente solicitud.

Teniendo en cuenta lo anterior, la nueva reivindicación 1 ha sido modificada de tal manera que revela:

1. Un polipéptido de cocaína esterasa (CocE) mutante aislado que comprende:

una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, que presenta por lo menos una sustitución seleccionada del grupo que consiste de T172R; G173Q; L169K; F189K;

en donde el polipéptido mutante CocE tiene actividad esterasa con termoestabilidad incrementada a 37°C comparado con el CocE de tipo silvestre que presenta la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1.

Así las cosas, la presente invención revela polipéptidos de secuencia SEQ ID NO: 1 que comprenden sustituciones específicas, las cuales confieren una termoestabilidad incrementada a la estructura aminoacídica sin afectar la actividad esterasa de la misma. En este sentido, consideramos que es completamente claro que las sustituciones reveladas son las que confieren propiedades superiores al polipéptido CocE, y por tanto, se proporciona la caracterización estructural que diferencia la presente invención de las divulgaciones del arte previo.

De manera adicional, la reivindicación 1 proporciona una caracterización técnica funcional del polipéptido de la presente invención, estableciendo que el mismo tiene actividad esterasa con termoestabilidad incrementada a 37°C en comparación con el CocE de tipo silvestre, lo cual se constituye como la ventaja de la presente invención, y por tanto hace parte de las características esenciales de la misma.

En relación con el ácido nucleico reivindicado por la presente solicitud, consideramos que la materia revelada es completamente clara para el normalmente versado en la materia a

la luz de las enseñanzas del pliego reivindicatorio y de los conocimientos generales del estado del arte. De esta manera, el pliego reivindicatorio y la descripción de la presente solicitud proporcionan el sustento requerido para el desarrollo y el empleo de un ácido nucleico que codifique el polipéptido CocE mutante revelado.

En este sentido la descripción establece, entre otra información, lo siguiente,

*"Moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas de fusión CocE mutantes se encuentran igualmente dentro de la invención. Tales ácidos nucleicos pueden elaborarse preparando un constructo (por ejemplo, un vector de expresión) que exprese la proteína de fusión CocE mutante cuando se introduzca en un hospedero apropiado. Por ejemplo, tal a constructo puede hacerse ligando un primer polinucleótido que codifica la proteína CocE mutante fusionada sin alteración en el marco de lectura ("**in frame**") con un segundo polinucleótido que codifica otra proteína de tal modo que la expresión del constructo en un sistema de expresión adecuado produzca una proteína de fusión."*

Por tanto, al tener en consideración la totalidad del sustento dado por la descripción, el normalmente versado en la materia se encuentra en capacidad de comprender cómo generar una secuencia de aminoácidos que codifique un polipéptido mutante CocE termoestable, sin requerir de la aplicación de una excesiva experimentación.

En lo que se refiere a la composición farmacéutica reivindicada, consideramos que la misma se encuentra debidamente definida por los componentes esenciales que permiten dar solución al problema técnico propuesto. Por tanto, no consideramos que exista falta de claridad o concisión.

Finalmente, las reivindicaciones relacionadas con (i) la encapsulación del polipéptido en un glóbulo rojo, y (ii) un método de detección han sido eliminadas del pliego reivindicatorio.

En consecuencia, el nuevo pliego reivindicatorio es claro y conciso, y por tanto, solicitamos respetuosamente la aceptación del mismo.

Nivel inventivo

La presente invención centra sus enseñanzas en el desarrollo de mutantes termoestables del polipéptido CocE que se caracterizan por ser altamente eficientes, termoestables y de larga duración, con el fin de generar protección en contra de los efectos tóxicos y reforzantes de la cocaína, al considerar que la CocE de tipo silvestre presenta una disminución de la estabilidad al ser sometida a altas temperaturas.

En este sentido, la presente solicitud revela mutantes CocE diseñados y generados mediante el incremento de la estabilidad termodinámica a través de la disminución del ΔG (desdoblado $\rightarrow$ plegado) del polipéptido CocE, o disminución de la tasa de desdoblamiento a través del incremento de la energía libre de activación del proceso de desdoblamiento de CocE, en donde para dicho diseño se aplicó una estrategia de enfoque triple, que básicamente comprende: (i) diseño racional mediante mutagénesis dirigida al sitio, asistida por computador, (ii) mutagénesis aleatorio del gen CocE y detección selectiva de gran productividad, y (iii) mutagénesis del organismo hospedero de CocE, seguida por selección genética. Lo anterior se encuentra debidamente expuesto en el párrafo [0076] y en ejemplo 3 de la descripción.

De esta manera, la estrategia multienfoque previamente citada permitió superar la falencia del arte previo en la generación de enzimas CocE con termoestabilidad incrementada, al tener en cuenta que las sustituciones reveladas (T172R, G173Q, L169K, F189K) permiten la obtención de polipéptidos que presentan una vida media prolongada, y que no se encuentran enseñados, ni sugeridos, por las referencias del arte previo.

Ahora bien, de acuerdo con el análisis llevado a cabo por el señor Examinador las referencias D1 a D4 afectan el nivel inventivo de la presente invención, toda vez que las divulgaciones de las mismas hacen obvia la generación de los polipéptidos acá reivindicados.

En este sentido, notamos que **D1 (Bresler M. et al.)** centra sus divulgaciones en el polipéptido CocE de tipo silvestre, sin hacer mención alguna de la generación de sustituciones puntuales sobre la estructura del mismo. En consecuencia, la referencia D1 solamente contiene enseñanzas relacionadas con polipéptidos CocE de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1), y por tanto es completamente silenciosa frente a la generación de un péptido CocE mutante que presente una modificación puntual en su secuencia de aminoácidos

con el fin de aumentar la termoestabilidad del mismo, pero sin repercutir en la actividad esterasa característica, mediante la aplicación de la estrategia de enfoque triple como la previamente expuesta.

En relación con la referencia **D2 (Larsen et al.)**, notamos que la misma centra sus enseñanzas en un polipéptido CocE bacteriano de tipo silvestre, con el fin de revelar la estructura cristalográfica del mismo. Así las cosas, dicha referencia es igualmente silenciosa frente al desarrollo de péptidos mutantes que presenten sustituciones aminoacídicas específicas que les confieran termoestabilidad aumentada.

Ahora bien, el documento **D3 (Lehman et al.)** corresponde con una referencia que proporciona una serie de herramientas y reportes aislados relacionados con la termoestabilidad de proteínas particulares, pero que es silencioso frente a polipéptidos como CocE u otros que presenten actividad esterasa.

En este sentido, D3 establece que el diseño racional revelado puede ser efectivo con proteínas pequeñas que exhiban alta homología y una pronunciada diferencia en termoestabilidad, pero a su vez refiere la existencia del problema de "identificar las mutaciones termoestabilizantes relevantes en conjuntos de proteínas más grandes y de menor homología". De esta manera, es fundamental aclarar que el polipéptido CocE no es similar en tamaño y homología a las proteínas de choque frío de *Bacillus* que ilustran el diseño racional enseñado por D3.

En este orden de ideas, dicha referencia concluye que es poco probable que se provea información útil para la predicción exacta de mutaciones termoestabilizantes, ya que la misma se encuentra seriamente limitada en sus enseñanzas al no poder afirmarse que el mismo enfoque podría ser necesariamente exitoso con otras proteínas. Por tanto, consideramos que no puede asegurarse que el normalmente versado en la materia alcanzaría el éxito en el aumento de la termoestabilización de CocE mediante la aplicación de los enfoques dados en D3, tal como lo consigue mediante la aplicación de la metodología empleada en la presente invención.

Finalmente, la referencia **D4 (Marshall et al.)** es similar en contenido a la referencia D3, y por tanto la misma tampoco contempla al polipéptido CocE ni proteínas similares con actividad esterasa. Así, D4 revela técnicas diferentes que pueden ser usadas de manera genérica para alterar las propiedades fisicoquímicas de las proteínas, pero es silenciosa

frente a la viabilidad de la metodología expuesta para la generación de una enzima CocE termoestable como la acá reivindicada.

De esta manera, es evidente que ninguna de las referencias D1 a D4, contempla ni sugiere la realización de mutaciones puntuales (T172R; G173Q; L169K; F189K) sobre la CocE de tipo silvestre, con la aplicación de un diseño con estrategia de enfoque triple que consta de (i) diseño racional mediante mutagénesis dirigida al sitio, asistida por computador, (ii) mutagénesis aleatorio del gen CocE y detección selectiva de gran productividad , y (iii) mutagénesis del organismo hospedero de CocE, seguida por selección genética, por lo que la presente invención debe considerarse inventiva a la luz del arte previo.

A pesar de lo anterior, notamos que el señor Examinador considera que dadas las divulgaciones de las referencias D1 y D2, el normalmente versado en la materia aplicaría las técnicas reveladas por las referencias D3 y D4 con el fin de llegar a las sustituciones exactas reveladas por la presente invención.

Al respecto, consideramos que el señor Examinador falló al proporcionar la argumentación requerida para demostrar cómo las referencias en mención sugerían abiertamente el desarrollo de las mutaciones puntuales reivindicadas en la presente solicitud dentro de los 574 residuos aminoacídicos comprendidos dentro de la SEQ ID NO: 1.

Lo anterior es fundamental al tener en cuenta que el Instructivo de Patentabilidad establece claramente que para determinar la obviedad de una invención debe demostrarse que el arte previo indica abiertamente a la persona medianamente versada en la materia, enfrentada al problema técnico, cómo modificar o adaptar el estado de la técnica más cercano para resolver el problema, de la forma reivindicada, sin realizar una actividad inventiva, lo cual en definitiva no sucede en el presente caso, pues como se expuso previamente existe una gama de posibilidades de sustitución demasiado alta.

En este sentido, consideramos que el versado en la materia enfrentado a las enseñanzas de las referencias D3 y D4 no cuenta con una expectativa real de éxito para llegar a las enseñanzas de la presente invención, toda vez que las técnicas de carácter general divulgadas por dichas referencias no se relaciona directamente con los péptidos CocE. No obstante lo anterior, consideramos que de aplicar las técnicas descritas por dichas referencias, los resultados obtenidos no se compararían, en términos de termoestabilidad

alcanzada, con los efectos derivados de las sustituciones acá reivindicadas. En otras palabras, el normalmente versado en la materia enfrentado a la necesidad de generar polipéptidos CocE con termoestabilidad aumentada y basado en las enseñanzas de las referencias D1 a D4, requeriría de la aplicación de una experimentación excesiva que se basaría en un acercamiento de ensayo y error.

En consecuencia, no existe ninguna expectativa de éxito al tomar como punto de partida las divulgaciones de las referencias D1 a D4, y por tanto, no hay obviedad alguna en la materia revelada por la presente invención.

Finalmente, queremos hacer énfasis en un aspecto relacionado con las enseñanzas de la referencia D2 en cuanto a la vida media plasmática del polipéptido CocE. En este sentido, D2 establece lo siguiente,

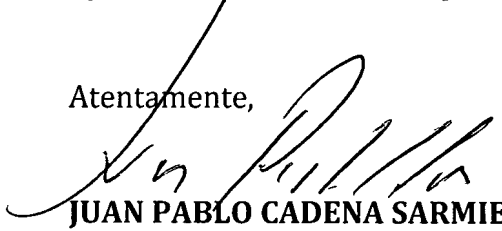
*"Dos de los parámetros in vivo más importante que deben abordarse son la toxicidad y la vida media plasmática de la enzima. **Vidas medias plasmáticas cortas serían suficientes para limpiar la cocaína del sistema de un paciente que experimenta una sobredosis, evitando una respuesta inmune adversa humoral y celular.** La vida media plasmática puede ser alargada, si es necesario, por modificaciones covalentes de CocE con poli etilenglicol (PEG), el cual enmascararía la enzima ante el sistema inmune"*

Así las cosas, D2 enseña que una enzima CocE con baja vida media plasmática es deseable para lograr evadir respuestas inmunes adversas, lo que se consideraría como una desmotivación para el versado en la materia en cuanto a la generación de técnicas para prolongar la vida media plasmática del polipéptido CocE. Además, en cuanto a la pegilación D2 establece que "si es necesario" la enzima puede pegilarse para extender la vida media plasmática, mientras que en contraste la presente invención revela que la pegilación de CocE se lleva a cabo con el fin de generar una mejora de la termoestabilidad, adicional a la conseguida con las mutaciones generadas.

Por tal razón, D2 no brinda una guía tal para que el normalmente versado en la materia pueda realizar las sustituciones específicas acá reivindicadas, con el fin de obtener un polipéptido termoestable, pues dicho versado no contaría con las herramientas para conocer los residuos críticos que deben ser objeto de modificación.

En vista de lo anteriormente expuesto, respetuosamente solicitamos el retiro de las objeciones de la presente solicitud y la concesión del privilegio solicitado, ya que en opinión del solicitante cumple con todos los requisitos establecidos en la decisión 486.

Atentamente,



JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

T.P. No. 57.492 del C.SJ.

C.C. 80.410.337 de Usaquén

Calle 70 A No. 4 - 41

123204 9

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0038197
		Bogotá D.C., Abril 23 de 2013 - 16:26:25

RECIBIDO DE : BRIGARD & CASTRO S.A.					NI 860.047.372
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	426513264	23/04/2013	33.520.000.00

*** Conceptos Pagados ***				
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
3	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	90.000.00
				\$90.000.00
=====				

SON: **NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 09-010531-A-00003-0000
Fecha: 2013-07-24 15:55:09 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 12

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de cocaína esterasa (CocE) mutante aislado que comprende:

una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, que presenta por lo menos una sustitución seleccionada del grupo que consiste de T172R; G173Q; L169K; F189K;

en donde el polipéptido mutante CocE tiene actividad esterasa con termoestabilidad incrementada a 37°C comparado con el CocE de tipo silvestre que presenta la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1.
2. Un polipéptido de cocaína esterasa (CocE) mutante aislado que comprende:

una secuencia de aminoácidos que presenta por lo menos un 95% de identidad de secuencia de la SEQ ID NO: 1, que presenta por lo menos una sustitución seleccionada del grupo que consiste de T172R; G173Q; L169K; F189K;

en donde el polipéptido mutante CocE tiene actividad esterasa con termoestabilidad incrementada a 37°C comparado con el CocE de tipo silvestre que presenta la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1.
3. El polipéptido CocE aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde la secuencia de aminoácidos del CocE mutante comprende sustituciones de T172R y G173Q.
4. El polipéptido CocE aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la secuencia de aminoácidos del mutante CocE comprende:
 - (i) una sustitución T172R;
 - (ii) G173Q; y
 - (iii) una adición de I175-G-G-A186 o T176-G-G-D185.
5. Un polipéptido de cocaína esterasa mutante aislado que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 25 (T172R); SEQ ID NO: 32 (G173Q); SEQ ID NO: 39 (T172R-G173Q); SEQ ID NO: 40 (L169K); SEQ ID NO: 44 (F189K), o un fragmento funcional de las mismas.

- 11
6. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 en donde el aumento en termoestabilidad del polipéptido CocE mutante sobre la CocE tipo silvestre es por lo menos alrededor de 2.1 kcal/mol, por lo menos alrededor de 2.2 kcal/mol, por lo menos alrededor de 2.3 kcal/mol, por lo menos alrededor de 2.4 kcal/mol, por lo menos alrededor de 2.5 kcal/mol, por lo menos alrededor de 2.6 kcal/mol, por lo menos alrededor de 2.7 kcal/mol, por lo menos alrededor de 2.8 kcal/mol, por lo menos alrededor de 2.9 kcal/mol, por lo menos alrededor de 3.0 kcal/mol, por lo menos alrededor de 3.1 kcal/mol, por lo menos alrededor de 3.2 kcal/mol, por lo menos alrededor de 3.3 kcal/mol, por lo menos alrededor de 3.4 kcal/mol, por lo menos alrededor de 3.5 kcal/mol, por lo menos alrededor de 3.6 kcal/mol, por lo menos alrededor de 3.7 kcal/mol, por lo menos alrededor de 3.8 kcal/mol, por lo menos alrededor de 3.9 kcal/mol, por lo menos alrededor de 4.0 kcal/mol, por lo menos alrededor de 4.1 kcal/mol, por lo menos alrededor de 4.2 kcal/mol, por lo menos alrededor de 4.3 kcal/mol, por lo menos alrededor de 4.4 kcal/mol, o por lo menos alrededor de 4.5 kcal/mol.
 7. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en donde el polipéptido CocE mutante tiene inmunogenicidad reducida, comparado con la CocE tipo silvestre.
 8. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 en donde el polipéptido CocE mutante tiene por lo menos alrededor de 60%, por lo menos alrededor de 65%, por lo menos alrededor de 70%, por lo menos alrededor de 75%, por lo menos alrededor de 80%, por lo menos alrededor de 85%, por lo menos alrededor de 90%, por lo menos alrededor de 95%, por lo menos alrededor de 100%, por lo menos alrededor de 105%, por lo menos alrededor de 110%, por lo menos alrededor de 115%, por lo menos alrededor de 120%, por lo menos alrededor de 125%, por lo menos alrededor de 130%, por lo menos alrededor de 135%, o por lo menos alrededor de 140% de la actividad esterasa del polipéptido CocE tipo silvestre.
 9. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en donde el polipéptido CocE mutante conserva por lo menos sustancialmente la misma, o una mayor, eficiencia catalítica del polipéptido CocE tipo silvestre.
 10. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el polipéptido CocE mutante esta pegilado.

11. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el polipéptido CocE mutante se estabiliza por un sustrato o inhibidor.
12. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido CocE mutante de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 y vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
13. Un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido CocE mutante de cualquiera de las reivindicaciones 1-11.