

CUESTA & ASOCIADOS, ABOGADOS
Calle 72 # 10 – 07 Of. 603
Phone: 2113097 Fax: 2554538
Bogotá, D.C., Colombia
www.cuestalawyers.com
RESPUESTA REQUERIMIENTO ART. 45
EXP: 13-112934



CUESTA & ASOCIADOS LTDA
ABOGADOS / ATTORNEYS AT LAW

Señor
José Luis Salazar López
Director de Nuevas Creaciones
Superintendencia de Industria y Comercio
Dirección de Nuevas Creaciones
E. S. D.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-112934-00003-0000

Fecha: 2013-11-22 15:52:50 Dep. 2020 DIR.NUEVASCREAC
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 15

Asunto	:	No. de Radicación	13-112934
Trámite	:	Patente de Invención	011
Evento	:	Registro	001
Actuación	:	Respuesta a Requerimiento Artículo 45.	519

Oficio	:	10657
Folios	:	15
Anexos	:	1

JUAN CARLOS CUESTA QUINTERO, identificado con C.C. 79.339.809, y titular de la tarjeta profesional No. 43.273 del Consejo Superior de la Judicatura, obrando como apoderado del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET); y Universidad Católica de Córdoba, para la creación denominada "VACUNA QUE COMPRENDE UN PROTOZOO MODIFICADO QUE EXPRESA AL MENOS DOS PROTEÍNAS VARIABLES DE SUPERFICIE (VSP) Y EL PROCESO DE OBTENCIÓN", por medio de este documento doy respuesta en tiempo oportuno al Oficio No. 14599, notificado por fijación en lista de fecha 13 de agosto de 2013, de conformidad con lo establecido en el artículo 45 de la Decisión 486 de la Comunidad Andina de Naciones, en los siguientes términos.

1. REQUISITOS DE FORMA.

- 1.1. El señor examinador, se refiere a que la reivindicación 7 no es patentable, de acuerdo con el Art 14, puesto que hace referencia al uso del protozoo modificado para la fabricación de una vacuna. Sobre este respecto, diferimos respetuosamente del señor examinador pues se debe precisar que está cláusula no se está reivindicando el USO sino "AL MENOS DOS PROTEÍNAS VARIABLES DE SUPERFICIE DIFERENTES DE UN PROTOZOO" y ello es un producto tangible. Dentro del preámbulo se está indicando el contexto técnico de lo que se desea proteger: "PARA LA PREPARACIÓN DE UNA VACUNA"; y, no por ello la cláusula se refiere al uso. Debe ser claro que si la intención de una reivindicación es un producto, también lo es que dicho producto debe definirse dentro de un contexto técnico y ello no indica que se pretenda proteger el uso. Tal sería, que un preámbulo no podría referirse entonces a una "COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA" pues determinaría, según esta errónea apreciación, que al agregar el término "FARMACÉUTICA", estaría intentado proteger su uso. Según este ejemplo, lo que se intenta proteger es un producto "AL MENOS DOS PROTEÍNAS VARIABLES DE SUPERFICIE DIFERENTES DE UN PROTOZOO" y su contexto técnico es



que es “PARA LA PREPARACIÓN DE UNA VACUNA”. Separado a ello, está la parte característica, que define lo que se desea proteger. No obstante, para aclarar esta reivindicación, se ha redefinido claramente el preámbulo de la parte característica en el nuevo capítulo reivindicatorio y se ha eliminado cual referencia fuera de contexto que no defina la materia sobre la cual se busca protección.

- 1.2. El señor examinador afirma que la reivindicación 4 no es clara porque pretende definir un producto a partir de su proceso de obtención, por lo que sugiere definir la vacuna en términos de sus componentes y proporciones, y el proceso en términos de la secuencia de pasos necesarios para que una persona normalmente versada en la materia pueda reproducirlo. Para tal efecto presentamos, un nuevo capítulo reivindicatorio que corrija tal referencia errónea en el preámbulo de la cláusula.
- 1.3. De igual forma, el señor examinador, se refiere a que las reivindicaciones 1 a 3 no son claras porque no especifican la estructura de las proteínas de superficie de un protozoo que hacen parte de la vacuna y que la solicitud se refiere a material biológico, por lo que agrega que es necesario presentar el Certificado de Depósito para el protozoo modificado.
- 1.4. Sobre este requerimiento, el solicitante querría atraer la atención del examinador al hecho que, en su opinión, que la estructura de las proteínas de superficie de un protozoo que hacen parte de la vacuna, si está descrito dentro de la solicitud, pues según la memoria tal y como se presentó originalmente, define los métodos para obtener el microorganismo modificado según la invención y se define la reproducibilidad técnica de la generación de un organismo de Giardia con expresión de múltiples VSPs por silenciamiento de RdRP y/o Dicer, de manera que puede ser encontrada en los ejemplos 1 y 3 en combinación. Particularmente, el uso de microorganismos que expresan solo un VSP y microorganismos silenciados que expresan diferentes VSPs contemporáneos (RAS, DAS, RAS+DAS), se describe en un modelo animal (murino-Gerbils). Es por tanto posible demostrar que los animales que fueron inmunizados por organismos expresando solo un VPS, presentan protección ante organismos que se caracterizan por el mismo VPS y no uno diferente. Por lo contrario, los animales que fueron inmunizados a través de organismos que expresan una combinación de diferentes VSPs, presentan una protección diferente. La información técnica de este proceso se describe en el Ejemplo 3.
- 1.5. De igual forma, el certificado de presentación del microorganismo en la Institución Biológica reconocida según el tratado de Budapest no es necesario, en el presente caso, ya que hay información técnica suficiente en la memoria tal y como se presentó originalmente explicando en gran detalle cómo obtener el microorganismo. Esto basado en los que indica el artículo 51 de la Decisión 486 de la CAN, que define que:

“51. El alcance de la protección conferida por la patente estará determinado por el tenor de las reivindicaciones. La descripción y los dibujos, o en su caso, el material biológico depositado, servirán para interpretarlas.”



1.6. Así las cosas, la interpretación de las reivindicaciones, están basadas en definiciones que se referencian bajo el capítulo descriptivo, donde:

Página 27:

Para determinar si los trofozoítos de Giardia modificados que expresan todo el repertorio de VSPs podían utilizarse como vacunas se realizaron estudios en un modelo experimental de Giardiasis en jerbo. Primero se generaron trofozoítos de aislamientos de WB que expresan el repertorio completo de VSPs noqueando la expresión de Giardia Dicer (DAS) o Giardia RdRP (RAS) tal como se muestra en los ejemplos.

Página 27:

La figura 11 muestra que los trofozoítos en el que Dicer (Fig. 11a) o RdRP (Fig. 11b) han sido silenciados expresan en su superficie muchas VSPs, por ejemplo tal como se visualizan en los ensayos de inmunofluorescencia directa que muestran co-localización (amarillo) de VSP9B10 (verde) y VSP1267 (rojo).

Página 27:

El porcentaje de células que expresan diferentes VSPs en su superficie se determinó mediante el uso de un panel de anticuerpos monoclonales dirigidos contra diferentes VSP (Tabla 3).

Tabla 3

Mab	WB9B10	DAS	RAS	DAS + RAS
Control	0	0	0	0
9B10	99	78	67	75
5C1	0	96	51	93
6E7	0.1	89	93	84
G10/4	0	0	0	0
9C9	0	0	0	0
1B2	0	66	92	91
7B8	0	89	74	84
6F8	0	87	46	71
7G8	0	90	89	88
1B4	0	77	52	68

Estos porcentajes demuestran que las células expresan simultáneamente una gran cantidad de VSPs en su superficie (> 100%).

Página 28:

Estas poblaciones de Giardia fueron utilizadas inicialmente para infectar a los jerbos SPF. La infección se inició mediante la inoculación orogástrica de los trofozoítos y la liberación de quistes, que indican claramente la infección de los animales.

Página 28 penúltima línea a página 30:

*Los animales infectados presentaron durante la segunda semana de infección algunos episodios de diarrea y algunos de ellos perdieron peso. A fin de evitar la posibilidad de que algunos animales pudieran estar infectados de forma crónica con una pequeña cantidad de trofozoítos, la mitad de los animales fueron tratados con metronidazol para curar completamente cualquier posible infección indetectable. Para determinar si la infección primaria con trofozoítos que expresaban una VSP particular (VSP9B10 y VSP1267) o con trofozoitos que expresaban el repertorio completo de VSPs (DAS, RAS, DAS + RAS) protegía a los animales de infecciones posteriores, los mismos animales fueron inoculados con una población clonal de los trofozoítos que expresaban una VSP específica (VSP9B10 o VSP1267) 2 meses después de la auto-curación de la infección primaria. Las Fig. 12b y 12c muestran los resultados de la eliminación de los quistes de los animales previamente infectados con WB9B10 o WB1267, respectivamente. Las Fig. 12d y 12e muestran los resultados de los animales previamente infectados con trofozoítos DAS o RAS, respectivamente. Los resultados indican claramente que (a) los animales infectados con trofozoítos que expresaban una única VSP eran refractarios a una segunda infección con células que expresaban la misma VSP, lo que sugiere el desarrollo de una fuerte respuesta inmune durante la infección original contra una determinada proteína de superficie (Fig. 12a y 12b), (b) los animales infectados con células que expresaban una VSP particular, eran fácilmente re-infectados con trofozoítos que expresaban un VSP diferente, lo que sugiere que, de forma similar a lo observado en las infecciones humanas, las re-infecciones son comunes después de la cura o el tratamiento con medicamentos (Fig. 12b y 12c). (c) Por el contrario, los animales que fueron infectados con poblaciones trofozoítos que expresaban todo el repertorio de VSPs estaban protegidos frente a infecciones posteriores con poblaciones clónales que expresaban sólo una VSP en su superficie (Fig. 12d y 12e). Los mismos desafíos experimentales se realizaron a los 2, 4, 6 y 12 meses de la infección original y los resultados fueron idénticos (Tablas 4 y 5).
Tabla 4: Desafío con trofozoitos del clon WB9B10 y porcentaje de jerbos infectados (entre paréntesis).*

Infección primaria con	Cantidad de jerbos	MNZ	Desafío al mes 2 (% de infección)	Desafío al mes 4 (% de infección)	Desafío al mes 12 (% de infección)
Ninguno	30	Si	30+ (100%)	N/A	N/A
Ninguno	30	No	30+ (100%)	N/A	N/A



WB9B10	30	Si	30- (0%)	N/A	N/A
WB9B10	30	No	29- 1+ (3.3%)	N/A	N/A
WB1267	30	Si	30+ (100%)	N/A	N/A
WB1267	30	No	29+ 1k (100%)	N/A	N/A
WBA6	30	Si	30+ (100%)	N/A	N/A
WBA6	30	No	30+ (100%)	N/A	N/A
Dicer-AS	90	Si	27- 3+ (10%)	30- (0%)	30- (0%)
Dicer-AS	90	No	29- 1k (0%)	28- 2k (0%)	27- 3k (0%)
RdRP-AS	90	Si	29- 1+ (3.3%)	29- 1k (0%)	29- 1k (0%)
RdRP-AS	90	No	28- 2+ (6.6%)	28- 2k (0%)	29- 1k (0%)
Dicer-AS & RdRP-AS	90	Si	28- 1+ 1k (3.3%)	30- (0%)	29- 1+ (3.3%)
Dicer-AS & RdRP-AS	90	No	29- 1k (0%)	29- 1+ (3.3%)	30- (0%)

Tabla 5: Desafío con trofozoítos del clon WB1267 y porcentaje de jerbos infectados (entre paréntesis).

Infección primaria con	Cantidad de jerbos	MNZ	Desafío al mes 2 (% de infección)	Desafío al mes 4 (% de infección)	Desafío al mes 12 (% de infección)
Ninguno	30	Si	30+ (100%)	N/A	N/A
Ninguno	30	No	30+ (100%)	N/A	N/A
WB9B10	30	Si	30+ (100%)	N/A	N/A
WB9B10	30	No	30+ (100%)	N/A	N/A
WB1267	30	Si	30- (0%)	N/A	N/A
WB1267	30	No	29- 1+ (3.3%)	N/A	N/A
WBA6	30	Si	30+ (100%)	N/A	N/A
WBA6	30	No	30+ (100%)	N/A	N/A
Dicer-AS	90	Si	28- 2+ (6.6%)	28- 1+ 1k (3.3%)	30- (0%)
Dicer-AS	90	No	29- 1+ (3.3%)	29- 1d (0%)	29- 1k (0%)
RdRP-AS	90	Si	29- 1+ (3.3%)	29- 1+ (3.3%)	29- 1+ (3.3%)
RdRP-AS	90	No	28- 1+ 1k (3.3%)	28- 2k (0%)	30- (0%)
Dicer-AS & RdRP-AS	90	Si	28- 2+ (6.6%)	29- 1+ (3.3%)	29- 1k (0%)
Dicer-AS & RdRP-AS	90	No	30- (0%)	30- (0%)	30- (0%)

Ejemplo 1, página 38:

RdRP clonación, secuenciación, y actividad: Por RT-PCR, la síntesis de ADNc se realizó mediante el ARN total extraído de trofozoítos y oligo (dT) 20 como cebadores. el alineamiento de RdRPs de varios organismos, en relación con el uso de cordones conocidos en Giardia, permitió el diseño de cebadores moderadamente degenerados: RdRP_F: (5'-TA (T / C), GT (T / C) TTT AC (T / C) GAT GGC G (C / G) A GG) -3 ') SEQ ID N° 133 y SEQ ID N° 134; y RdRP_R: (5'-TCA CC (A / G) TCC AGG TC (G / A) CTG CC) -3 ') SEQ ID N° 135 y SEQ ID N° 136. El producto de PCR generado con los oligonucleótidos se sometió a electroforesis, purificado por gel, marcado radiactivamente por el cebado al azar, y utilizado para una comparar con una biblioteca de DNA de G. lamblia en λ gt22a como se reportó en (Elbashir, S. M., Lendeckel, W. & Tuschl, T.Genes Dev 15, 188-200 (2001). La revisión de la biblioteca λ ZAP gDNA se realizó como describe



(Elbashir, S. M., Lendeckel, W. & Tuschl, T. *Genes Dev* 15, 188-200 (2001). Los fragmentos de ADN fueron clonados en *pBluescript SKII+* y secuenciados automáticamente. 3 5'-RACE se realizó utilizando un kit comercial de Invitrogen y los cebadores 5'-CTT GTG CAT AGT AAA CAA AG-3' SEQ ID N° 137 y 5'-CAA ATG GTC GAT GCT GGG-3' SEQ ID N° 138.

Página 47, líneas 24 en adelante:

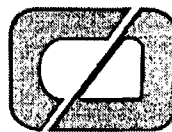
Para el análisis funcional de *gRdRP*, *gDicer*, y *gAgo*, y *VSP9B10* cebadores sentido específico que contiene un sitio *Eco RV* y cebadores antisentido con un sitio *Nco I* se utilizaron para amplificación mediante PCR de una parte de la ORF de cada gen. Productos de PCR fueron purificados, restringidos, y clonados en el vector *pTubHAPac*. Así, los genes fueron inversamente insertados dentro de *pTubHAPac*, dando la construcción antisentido que se utilizó para la inhibición de la expresión (Touz, M. C., Gottig, N., Nash, T. E. & Lujan, H. D. *J. Biol. Chem.* 277, 50557–50563 (2002). Las secuencias fueron siempre confirmadas por secuenciación. El silenciamiento de los genes fue confirmado por RT-PCR y qRT-PCR utilizando cebadores específicos para el gen indicados anteriormente sobre el ARN total extraído de trofozoitos transfectados comparados con las células control transfectadas con el vector solamente o con el mismo vector que expresa una señal HA de cada molécula.

Página 46, penúltima línea en adelante:

La transfección de trofozoitos de *G. lamblia* fue realizada por electroporación como ya se ha descrito 38. Las células fueron incubadas en hielo por 10 minutos, cultivadas en medio de crecimiento durante la noche a 37°C y seleccionados como células resistentes a puromicina.

Ejemplo 3

Parásitos: La cepa WB de *Giardia lamblia* (ATCC 30957) fue aislada de un paciente sintomático que se cree que ha adquirido la Giardiasis en Afganistán (Antigenic analysis of *Giardia lamblia* from Afghanistan, Puerto Rico, Ecuador, and Oregon. Smith PD, Gillin FD Kaushal NA and Nash TE. *Infect. Immun.* 1982 May; 36(2): 714-9), y la cepa GS/M fue aislada de un paciente sintomático de los EE.UU. (Antigenic analysis of *Giardia lamblia* from Afghanistan, Puerto Rico, Ecuador, and Oregon. Smith PD, Gillin FD Kaushal NA and Nash TE. *Infect. Immun.* 1982 May; 36(2): 714-9), los clones derivados de la cepa WB, y los trofozoitos transgénicos fueron cultivados a 37°C en medio TYI-S-33 suplementado con 20% de suero adulto (Invitrogen), bilis de bovino (Sigma), y una solución antibiótico/antimicótico (Invitrogen) en tubos de cristal de borosilicato de 12 ml con tapa a rosca



(Methods for cultivation of luminal parasite protists of clinical importance. Clark CG, Diamond LS. Clin Microbiol Rev. 2002 Jul; 15(3):329-41). Los clones de Giardia que expresaban diferentes proteínas de superficie se obtuvieron mediante dilución limitante en placas de cultivo 96 pozos (DeltaLabs) en una cámara anaeróbica (BD) y seleccionados por ensayos de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos monoclonales específicos.

Página 50, segundo párrafo:

Generación de trofozoítos transgénicos que expresan todo el repertorio de VSPs: Las secuencias complementarias de los genes que codifican para las enzimas de Giardia RdRP y Dicer se clonaron en el plásmido pTubHA.pac (Sorting of encystation-specific cysteine protease to lysosome-like peripheral vacuoles in Giardia lamblia requires a conserved tyrosine-based motif. Touz MC, Lujan HD, Hayes SF, Nash TE. J Biol Chem. 2003 Feb 21;278(8):6420-6. Epub 2002 Dec 3. Esto permitió la expresión constitutiva y estable de los genes en los trofozoítos de G. lamblia debido a la presencia del promotor de la α -tubulina y de la selección con el antibiótico puromicina. Los genes que codifican las enzimas Dicer y RdRP fueron amplificados por PCR a partir del cDNA del clon WB/9B10 usando Platinum HiFi Taq ADN polimerasa (Invitrogen), usando sondas de oligonucleótidos que contienen los sitios de restricción NcoI y EcoRV y luego clonado en el vector. Los cebadores fueron DAF: 5'-AGT TGA AAC TAT CAT GGT TGC TCC CGA A-3' SEQ ID N° 141, DAR: 5'-CCA CCA TGG TTG AAC GCC GAA TCC AAC-3' SEQ ID N° 142, RAF: 5'-GCG ATA GGT TGC AGT TCC ATG ACG TTC TTG A-3' SEQ ID N° 143, y RAR: 5'-CCA CCA TGG TCG CTA CCT TAG CAT CAT CC-3' SEQ ID N° 144. Las construcciones fueron verificadas por digestión con enzimas de restricción y secuenciación posterior. La verificación del silenciamiento de estas enzimas se realizó por qRT-PCR como fue descrito más arriba.

Página 50, último párrafo y siguiente:

Transfección de Giardia lamblia: La transfección de Giardia se llevó a cabo por electroporación esencialmente como informó (Transient transfection and expression of firefly luciferase in Giardia lamblia. Yee J, Nash TE. Proc Natl Acad Sci USA. 1995 Jun 6;92(12):5615-9). En pocas palabras, cultivos de trofozoítos del clon WB/9B10 creciendo a confluencia en tubos de 12-ml (aproximadamente 10^7 células), se resuspendieron en 0,3 ml de medio TYI -S-33 completo, en cubetas de 0,4 cm. Luego 10-15 μ g del plásmido fueron añadidos a un volumen final de 100 μ l. La mezcla se incubó durante 10 minutos en hielo. Las células fueron electroporadas a 350V, 1000 μ F y 700 Ω en un electroporador BTX. Después de la incubación sobre hielo durante 10 minutos, las



células fueron transferidas a un tubo que contenía 12 ml de medio completo y se incubó durante la noche a 37°C en anaerobiosis. Al día siguiente, el medio fue complementado con puromicina y los trofozoítos fueron incubados durante 7-10 días a 37°C. Para obtener líneas de células clonales, se llevó a cabo dilución limitante en placas de 96 pocillos.

Página 41 línea 33 en adelante.

Para estudiar la expresión de los diferentes genes durante la diferenciación de trofozoítos de Giardia o en los experimentos de silenciamiento se usó RT-PCR con los siguientes pares de cebadores específicos: gDicer (645 bp): HL160, 5'-TGG CGG CGT CGT ATC AGT TAT -3' (SEQ ID N° 123), HL161, 5'-TCC CCG CAC GCA AGA AGA A-3' (SEQ ID N° 124); gAgo (912 bp): HL164, 5'-ATT GCC CCC TAC GGT GTC-3' (SEQ ID N° 125), HL165, 5'-CTC TGC CGG CCT TCC TAC-3' (SEQ ID N° 126), gRdRP (569 bp): HL187, 5'-CAT GGG TTG CAG TTT CTT GAC GA-3' (SEQ ID N° 127), HL188, 5'-AGC CCC TTA TCT GTT GCC TCC TTC-3' (SEQ ID N° 128); y el control de la expresión diferencial de CWP1 (533 bp): HL183, 5'-TCG CCC TGG ATG TTT CGG ACA T-3' (SEQ ID N° 129), HL184, 5'-AGG CGG GTG AGG CAG TA-3' (SEQ ID N° 130), y la expresión constitutiva de GDH (407 pb): HL185, 5'-AGT GGG GCG GGT CTT TAC TCA-3' (SEQ ID N° 131) ; HL186, 5'-TGT TCG CGC CCA TCT GGT AGT TCT -3' (SEQ ID N° 132).

Página 42, líneas 12 en adelante:

Los productos de estas reacciones también fueron aislados, marcados, y utilizados como sondas para Northern blot, tal como se indica a continuación. Hibridación Northern: El ARN total (10-15 µg) se fraccionó en un gel de agarosa-formaldehído al 1,2%, añadieron a un Hybond N+ (GE) y fijado con un Crosslinker UV (UVP) por los procedimientos estándar. El fragmento conservado C-terminal (anti-sentido cebador R2) fue marcado radiactivamente con el polinucleótido quinasa T4 utilizando γ -[32P]-ATP (5'-End Labelling System Promega). grdrp, así como otros fragmentos de ADN, fueron uniformemente marcados por el "cebado aleatorio (Prime-A-Gene sistema de etiquetado Promega).

Página 49, líneas 28:

Los clones de Giardia que expresaban diferentes proteínas de superficie se obtuvieron mediante dilución limitante en placas de cultivo 96 pozos (DeltaLabs) en una cámara anaeróbica (BD) y seleccionados por ensayos de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos monoclonales específicos.

Página 49, líneas 28 en adelante:



Inmunofluorescencia y microscopía confocal: Los trofozoítos se desprendieron de los tubos por enfriamiento durante 20 minutos en hielo. Las células fueron recogidas y se resuspendieron en un medio de crecimiento, aplicados a portaobjetos de vidrio y se incubaron a 37°C en una cámara húmeda durante 1 hora para permitir que los trofozoítos se volvieran a adherir. Las preparaciones fueron lavadas con medio tibio tres veces más dos lavados en PBS tibio. Las células entonces fueron hechas permeables mediante la fijación con 1:1 acetona / metanol durante 30 minutos a -20°C y se bloquean en 1X PBS/0.05% Tween 20, BSA 2,5% durante 30 min. Las células fueron incubadas primero con Mab contra distintos VSPs diluidos en 1X PBS/0.05 Tween 20, BAS 2,5% durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra los diferentes VSPs fueron: mAb 9B10 (anti VSP-9B10B), mAb 5C1 (anti-VSP 1267), mAb 6E7 (anti-VSP A6), mAb 1B2 (anti-VSP S1), mAb 2D5 (anti-VSP S2), mAb 2E1 (anti-VSP S3), mAb 2G10 (anti-VSP S4), mAb 6F8 (anti-VSP S5), mAb 7A9 (anti-VSP S6), mAb 7B8 (anti-VSP S7), mAb 7C2 (anti-VSP S8), mAb 7C9 (anti-VSP S9), mAb 7C10 (anti-VSP S10), mAb 7D4 (anti-VSP S11), mAb 2D4 (anti-VSP S12), mAb 3B8 (anti-VSP S13), mAb 4A2 (anti-VSP S14), mAb 7F4 (anti-VSP S15), Mab 7H2 (anti-VSP S16). Después de la incubación con el anticuerpo monoclonal correspondiente, los portaobjetos se lavaron dos veces con 1x PBS/0.05 Tween 20, y después fueron incubados con un segundo anticuerpo de cabra anti-inmunoglobulina de ratón marcado con FITC o TRITC en una dilución 1/200 durante 1 hora en solución de bloqueo. Los núcleos fueron contrastados con DAPI. Se obtuvieron imágenes confocales mediante un microscopio láser LSM5 Zeiss Pascal confocal equipado con un láser argón/helio/neón, y un objetivo de inmersión en aceite X100 (apertura numérica = 1,4) (Zeiss Plan Aplanachromat). Se tomaron secciones confocales de 0,3 micras paralelas al cubreobjetos (secciones z). Las imágenes fueron obtenidas utilizando una cámara Zeiss junta al dispositivo y procesada con el LSM y el software Adobe Photoshop. Porcentaje de células que expresan un VSPs particular se calculó mediante el recuento de 500 células en los experimentos por triplicado o por Citometría de Flujo.

Página 25 segundo párrafo.

Silenciamiento de RdRP, Dicer y AGO en Giardia: Debido a que el silenciamiento de un gen específico no es posible en Giardia a causa de su poliploidía y la presencia de dos núcleos, se realizaron pruebas directas para mostrar la participación de componentes característicos de RNAi en la variación antigénica por noqueo de la expresión Dicer, RdRP y AGO de Giardia mediante la expresión constitutiva en trofozoítos de parte de sus transcritos antisentido. Cuando se llevó a cabo una reducción de la expresión de la RdRP (RdRP-AS) o Dicer (Dicer-AS) (Fig. 9), se



generaron trofozoitos que expresan más de un VSP en su superficie, según lo determinado por inmunofluorescencia, utilizando anticuerpos monoclonales específicos (Fig. 10a y Tabla 2), citometría de flujo (Figura 10b) y Western Blot (Fig. 10c).

Página 26.

Tabla 2.

Análisis cuantitativo de la expresión de vsp en Giardia con RdRP (RdRP-AS) y Dicer (Dicer-AS) noqueados o silenciados.

VSP	Ninguno	Simulado	Giardia RdRP-AS	Giardia Dicer-AS
VSP9B10	99±0.5	98±1.2	90±0.6	18±2.0
VSP1267	0	0.5±0.1	96±0.2	22±0.9
VSPA6	0	0	48±2.3	17±1.3
VSPS1	0	0	62±4.1	36±2.1
VSPS2	0	0	33±1.1	28±3.9
VSPS7	0	0	73±0.3	65±4.4

De acuerdo con lo anterior, se demuestra que es posible silenciar RdRP y Dicer y se prueba que se expresan 6 VSPs diferentes (véase la Tabla 2), mediante el uso de anticuerpos específicos.

Página 26, penúltimo párrafo:

Tal como se puede observar en la figura 10b los clones mostraron claros patrones de expresión de una sola VSP, mientras que trofozoitos RdRP-AS y Dicer-AS evidenciaron la expresión de más de una VSP por trofozoito. Tal como se muestra en la figura 10c el anticuerpo monoclonal específico anti-VSP9B10 reconoce sólo una banda en el clon 9B10 y en los trofozoitos de modificados, mientras que el anticuerpo monoclonal 12F1 de la invención reacciona con muchas especies proteicas en los trofozoitos modificados, indicando que muchas VSPs se pueden expresar en forma simultánea en las Giardia cuando el camino de ARNi se ha interrumpido o silenciado.

- 1.7. Por tanto, el uso de microorganismos que expresan solo un VSP y microorganismos silenciados que expresan diferentes VSPs contemporáneos (RAS, DAS, RAS+DAS), se describe en un modelo animal (murino-Gerbils). Es por tanto posible demostrar que los animales, que fueron inmunizados por organismos expresando solo un VPS, presentan protección ante organismos que se caracterizan por el mismo VPS y no uno diferente. Por lo contrario, los animales que fueron inmunizados a través de organismos que expresan una combinación de diferentes VSPs, presentan una protección diferente.
- 1.8. En vista de lo anterior, si se utiliza un anticuerpo específico, capaz de reconocer una región conservada de VSPs según la invención, por lo que es



posible demostrar por WB, que los trofozoitos capaces de silenciar RdRP o Dicer expresan múltiples VSPs.

- 1.9. No obstante lo anterior, en respuesta a tales requerimientos, nos permitimos presentar a ese despacho un nuevo capítulo reivindicatorio con el fin de precisar y limitar la invención dentro de la Norma. Las modificaciones propuestas en las reivindicaciones se establecen conforme lo solicita el señor examinador en su escrito, de manera que estos cambios y la nueva redacción de las reivindicaciones, no implican una adición a la invención inicialmente propuesta, sino que hace referencia a las indicaciones del señor examinador con el fin de precisar y aclarar la invención.

2. ANÁLISIS DE PATENTABILIDAD.

- 2.1. Respecto al examen de patentabilidad, el señor examinador hace referencia al siguiente documento del estado de la técnica:

D1 – US6221366 del 24 de Abril de 2001.

- 2.2. Conforme se ha definido en el Oficio, el señor examinador alega que la materia descrita en las reivindicaciones 1 a 6, no son nuevas pues lo contenido está revelado con anterioridad en el documento D1.
- 2.3. Sobre este respecto, el documento D1 (US6221366) cómo cita el examinador, divulga una vacuna que comprende exotoxinas derivadas de un protozoo. D1 describe vacunas y métodos para evitar o tratar infecciones intestinales protozoicas en un animal, así como nuevas toxinas que podrían usarse en dichas vacunas. Las vacunas y métodos para evitar o tratar giardiasis, en particular, también se proporcionan. D1 también abarca métodos para preparar y métodos para usar nuevas toxinas, anticuerpos, cepas de vacuna y composiciones que resultan de o son utilizadas en dichos métodos.
- 2.4. Por su parte, D1 proporciona cepas de vacunas de protozoos intestinales y toxinas de dichos protozoos. Se describe que el cultivo de protozoos intestinales en un medio que contiene bilis les hace protectivamente inmunogénicos cuando se usan para vacunar animales. Además, dicho cultivo en un medio que contiene bilis proporciona para la producción, in vitro, una toxina. Esta toxina puede ser utilizada para la inmunización contra la infección de protozoos intestinales o para crear anticuerpos neutralizadores de toxinas.
- 2.5. Por el contrario, la presente invención se refiere a protozoos parásitos modificados que comprenden la expresión simultánea en su superficie de una o más proteínas de superficie variable (VSP). En una realización preferida de la presente invención, los protozoos comprenden la expresión de superficie simultánea de todo el repertorio de proteínas de superficie variable. Los protozoos muestran una expresión reducida del gen Dicer, RNA-dependiente RNA-polimerasa (RdRP) o ambos, donde el gen RdRP o el Dicer han sido silenciados, o una mezcla de los mismos. Los protozoos pueden ser cualquier protozoo que muestre un mecanismo de variación antigénica, donde el



mecanismo de variación antigénica puede ser no regulado mediante el silenciamiento de cualquiera de sus componentes. Se proporciona una vacuna contra las infecciones producidas por protozoos que comprenda al menos un protozoo modificado que exprese en su superficie al menos dos proteínas variables de superficie (VSP). La vacuna, según la presente invención, se caracteriza, por tanto, por comprender más de una proteína variable de superficie de un protozoo y excipiente y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables. En una realización preferida los protozoos comprenden la expresión simultánea del repertorio completo de proteínas variables de superficie en su superficie. Los protozoos muestran la expresión reducida de las enzimas del Dicer, RNA-dependiente RNA-polimerasa (RdRP) o ambas, donde el gen RdRP o el Dicer han sido silenciados, o una mezcla de los mismos. Los protozoos pueden ser cualquier protozoo que muestre un mecanismo de variación antigénica. La vacuna también puede comprender excipientes y/o adyuvantes.

- 2.6. Así las cosas, La misma vacuna puede comprender el repertorio completo de las proteínas variables de superficie de protozoos, donde el protozoo se selecciona preferiblemente del grupo que comprende *Giardia*, *Plasmodium*, *Babesia* y *Trypanosoma*. Exotoxinas y Proteínas Variables de Superficie son proteínas diferentes, que expresan de manera diferente y siguen pasos muy diferentes.
- 2.7. Por tanto, no es posible de ninguna manera, teniendo la información disponible al respecto de las exotoxinas de acuerdo al documento D1, pensar en el uso de la misma información para entender el concepto de la presente invención, con respecto a las VSPs. En otras palabras, el experto en la técnica no podría de ningún modo derivar cualquier información útil del documento D1 que le hubiera permitido entender, sin ningún esfuerzo, que las VSPs fueran capaces de ser expresadas y los correspondientes genes silenciados, según la presente invención.
- 2.8. Así, basándose en los argumentos establecidos en la presente respuesta y con las modificaciones propuestas en el nuevo capítulo reivindicatorio, los solicitantes creen que el documento D1, no anticipa el objeto de la presente invención, ya que no describen un protozoo tal y como el que aquí se reclama. En conclusión, este documento no es perjudicial respecto al requisito de NOVEDAD de la invención, ni contradice cualquier disposición legal o reglamentaria.
- 2.9. En consecuencia, a la luz de todo lo anterior, me permito solicitar a ese despacho, esta solicitud sea concedida conforme el artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina respecto al nuevo capítulo reivindicatorio. Sin embargo, incluso si el examinador lo considera insuficiente en conjunto con las nuevas reivindicaciones o el razonamiento que aquí se presenta, se ruega respetuosamente que se le ofrezca una nueva oportunidad, a través un nuevo Oficio para expresarse sobre cualquier tema en controversia.



3. FUNDAMENTO DE DERECHO

Fundamento esta remisión en las normas legales siguientes:

3.1. Artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión del Acuerdo de Cartagena.

3.2. En las demás normas concordantes.

4. ANEXOS.

4.1. Invención que incluye un nuevo Capítulo Reivindicatorio corregido con base en las sugerencias del señor examinador.

5. NOTIFICACIONES

Mi mandante y yo recibiremos notificaciones en la Secretaría de la División de Signos Distintivos, y en mi oficina situada en la Calle 72 No. 10 – 07 Oficina 603 de Bogotá D.C.

El solicitante y su apoderado las recibirán en la dirección indicada por este último en la solicitud inicial.

En vista de todo lo anterior, ruego a usted estudiar nuevamente la solicitud con base en las modificaciones realizadas y proceder de conformidad.

De Usted,

Señor Superintendente,

JUAN CARLOS CUESTA Q.

C.C. 79.339.809 de Bogotá

T.P. 43.273 del C.S.J.

Proyectado por: GAG

REIVINDICACIONES

1. Vacuna, caracterizada por comprender más de una proteína variable de superficie de un protozoo y excipientes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables.
2. Vacuna de la reivindicación 1, caracterizada por comprender el repertorio completo de proteínas variables de superficie de protozoos.
3. Vacuna de la reivindicación 2, caracterizada porque los protozoos se seleccionan del grupo que comprende *Giardia*, *Plasmodium*, *Babesia* and *Trypanosoma*.
4. Una vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque una dosis de dicha vacuna comprende entre 50 y 500 µg de proteínas variables de superficie de protozoos.
5. Vacuna de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizada porque es una vacuna oral.
6. Al menos dos proteínas variables de superficie diferentes de un protozoo para la preparación de una vacuna caracterizado porque dicho protozoo tiene un mecanismo de variación antigénica.
7. Procedimiento para obtener las proteínas variables de superficie (VSP) de una vacuna que comprende el repertorio completo de dichas proteínas, donde el proceso está caracterizado porque comprende los siguientes pasos:
 - a) unir un anticuerpo que reconoce la secuencia de aminoácidos CRKGA de las VSP a un soporte sólido;
 - b) contactar el soporte sólido con un protozoo; y

c) separar el repertorio completo de proteínas variables de superficie (VSP);

siendo dicho protozoo un protozoo modificado que comprende el silenciamiento de genes seleccionados del grupo que consiste en RdRP, Dicer y ambos.

-/-