

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

ABOGADOS

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

Señor

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COME

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 05-007268-A-00009-0000

Fecha: 2010-12-01 17:02:11 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 412 REPOSPRESRECU Folios: 9

Re: **P1.-GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.-Solicitud de Patente de Invención en Fase Nacional PCT para "COMPOSICIONES DE VACUNAS QUE COMPRENDEN LIPOOLIGOSACÁRIDOS".-Clase A61K 39/095.- Expediente número 05-007.268A.-**

Yo, **ALICIA LLOREDA RICAURTE**, mayor, vecina de esta ciudad, abogada titulada e identificada con la cédula de ciudadanía número 39.690.713 de Usaquén, Representante Legal en Bogotá, para todos los asuntos relacionados con la Propiedad Industrial de la sociedad **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.-** organizada y existente de conformidad con las leyes de Bélgica, domiciliada en Rixensart, Bélgica, atentamente manifiesto a usted que interpongo **RECURSO DE REPOSICIÓN** contra la Resolución Número **59708**, dictada por el señor Superintendente de Industria y Comercio el 29 de Octubre de 2010 y notificada por Edicto fijado el 10 de Noviembre del mismo año, en cuanto hace a la negación del privilegio de patente de invención para **las reivindicaciones 3 a 23** de la solicitud en referencia.

I. FUNDAMENTO MI RECURSO EN LOS SIGUIENTES HECHOS Y ARGUMENTOS TÉCNICOS Y JURÍDICOS

(1) Por medio de la Resolución Número **59708** se ha negado el privilegio de patente solicitado para la invención de la referencia, con base en una supuesta falta de Nivel Inventivo de la solicitud teniendo en cuenta la existencia del documento **W001/09350 (D1)**.

(2) De la lectura de la referida Resolución Número **59708** es evidente el análisis erróneo que hace ese Despacho del arte previo citado y la falta de consideración con respecto tanto del aporte que brinda la presente invención, así como de las características particulares que esta posee, en particular con respecto a la materia reclamada en **las reivindicaciones 3 a 23**.

(3) Así mismo, de la lectura de la Resolución impugnada, es también claro que ese Despacho no repara en los argumentos esgrimidos en mi memorial de 20 de Mayo de 2010, los cuales establecieron de forma incontrovertible el nivel inventivo

que conlleva la solicitud denegada frente al estado del arte más próximo, y por lo tanto ese Despacho afirma que *"con la información divulgada en D1 un experto medianamente versado en la materia puede realizar la invención tal como es reivindicada en la solicitud estudiada"*.

Sobre este particular, me permito dirigir la atención de ese Despacho a los siguientes argumentos técnicos, por medio de los cuales se puede afirmar sin lugar a dudas que la materia revelada en la invención denegada **y que es reclamada en las reivindicaciones 3 a 23**, es merecedora del privilegio de patente solicitado ya que, contrario a la posición de esa Oficina, dicha materia sí cumple con el requisito de nivel inventivo tal como es exigido en el Artículo 18 de la Decisión 486 de 2000, como me permito demostrar a continuación, siendo también dichos argumentos prueba de la violación del mencionado Artículo por parte de la SIC al negar el privilegio de patente solicitado.

(4) **La solicitud denegada, en sus reivindicaciones 3 a 23 brinda un aporte significativo al estado de la técnica que no es evidente a partir del arte previo.**

En primera instancia, me permito resaltar que la solicitud denegada en una de sus realizaciones preferidas proporciona una preparación de vesículas de *Neisseria* las cuales han sido obtenidas de una cepa en la que la proteína de membrana externa **FrpB** ha sido regulada a niveles más bajos de expresión y preferiblemente suprimida, tal como lo reclama la reivindicación 3 actualmente presentada.

Esta regulación ha mostrado ser beneficiosa, toda vez que potencia el efecto de antígenos de protección cruzada particularmente en preparaciones de vesículas que han sido obtenidas a partir de cepas de *Neisseria* desarrolladas en condiciones limitantes de hierro (página 5, descripción de la presente solicitud).

Dicho **efecto sorprendente** es evidente a partir del ejemplo 10 de la página 40 de la descripción de la solicitud denegada, donde se comprueba que la supresión de FrpB mejora la cobertura de la vacuna de vesículas producida.

Así mismo las reivindicaciones 4 y 5 se refieren a la preparación de vesículas de la reivindicación 3 y a la cepa de *Neisseria* a partir de la cual se producen estas vesículas (dado que el presente Recurso pretende demostrar la patentabilidad de las reivindicaciones 3 a 23, se entiende que la reivindicación 5 depende únicamente de la reivindicación 3).

De otra parte, las reivindicaciones 6 a 23 se refieren a una preparación de vesículas de membrana externa de una cepa Gram-negativa y a las composiciones

inmunogénicas o de vacuna que comprenden dicha preparación, en la cual dentro de la vesícula se integra una proteína de membrana externa conjugada a LOS.

Dichas vesículas de la invención son ventajosas tal como se demuestra en el ejemplo 7 de la página 35 de la descripción de la solicitud, cuyos resultados revelan cómo entre mayor sea el entrecruzamiento con LOS de las vesículas, es menor la reactividad de estas (lo que hace vacunas más seguras), aún cuando la antigenicidad de las vesículas se mantiene.

De forma similar, el ejemplo 8 de la página 37 muestra que la inmunogenicidad de las vesículas entrecruzadas se mejora sobre aquellas que no han sido entrecruzadas.

En este sentido me permito resaltar que este comportamiento de las preparaciones de vesículas de la presente invención no podría de ninguna manera ser deducido a partir de las enseñanzas del arte previo, y por lo tanto la solicitud denegada no es evidente con respecto al estado del arte más cercano.

(5) El documento D1 no revela específicamente ni la regulación ni la conjugación empleadas en las vesículas que son objeto de las reivindicaciones 3 a 23 actualmente presentadas.

De otra parte, a pesar del hecho que el documento D1 revela vacunas inmuno-protectivas no tóxicas de vesículas de bacterias Gram-negativas que son adecuadas para uso pediátrico, provenientes entre otras de *N. meningitidis*, *M. catarrhalis* y *H. influenzae* dicho documento no hace referencia específica a una preparación de vesículas de *Neisseria* proveniente de una cepa FrpB(-) ni a una con conjugación intravesícula, como las que son objeto de las reivindicaciones 3 a 23 de la invención.

Así, el citado documento D1 revela de forma general procedimientos para la extracción de dichas vesículas y modificaciones genéticas sobre los cromosomas bacterianos tendientes a la regulación tanto a mayores como a menores niveles de expresión de antígenos y a la detoxificación de la mitad de Lípido A de los LPS.

Ahora bien, **aún cuando respecto a *N. meningitidis* D1 resalta la regulación a bajos niveles de expresión de proteínas de membrana externa como PorA, PorB, Opa, Opc, PilC, este documento no hace referencia particular a la regulación de la proteína FrpB, ni a una posible utilidad de dicha regulación.**

De esta forma, el ejemplo 3 de la página 48 de D1 se refiere específicamente a suprimir el polisacárido capsular y una mutación PorA (-), mientras que el ejemplo 4

de la página 49 muestra una regulación a niveles superiores de NspA, revelando cepas [Cps(-) PorA(-)] y [Cps(-) PorA(-) NspA (+)].

Así mismo, el ejemplo 14 de la página 68 de D1 muestra una cepa [Cps(-) PorA(-) D15/Omp85(+)], mientras que en los ensayos biológicos de protección (ejemplo 19, página 74) y de inmunogenicidad (ejemplo 20, página 75) se emplean cepas: [Cps(-) PorA(+)], [Cps(-) PorA(-)], [Cps(-) PorA(-) NspA (+)], [Cps(-) PorA(-) Omp85 (+)] y [Cps(-) PorA(-) Hsf (+)].

Es así como el documento D1 sólo hace referencia de forma general a la proteína FrpB, por ejemplo señalando que dentro del estado del arte esta es una de las proteínas incluidas dentro de las formulaciones de vacunas de vesículas, pero que su papel dentro de la respuesta inmunológica no es aún claro:

"Muchos componentes de membrana externa están presentes en estas vacunas, como PorA, PorB, Rmp, Opc, Opa, FrpB y la contribución de estos componentes a la protección observada todavía necesita una definición adicional". (Página 4, líneas 24 a 26, D1).

Por otro lado, el documento D1 señala de manera particular la preferencia de regular el gen FrpB a altos niveles de expresión:

*"Uno o más de los siguientes genes (que codifican antígenos protectivos) se prefieren a mayores niveles de expresión por medio de un proceso b) y/o i) cuando se lleva a cabo en una cepa Neisserial, incluyendo gonococcus y meningococcus, (particularmente N. meningitidis B): NspA (WO 96/29412), similar a Hsf (WO99/31132) ... **FrpB (WO96/31618)** ..."* (Página 30, líneas 1 a 7, D1, resaltado fuera de texto)

Ese pertinente resaltar que el documento WO96/31618 citado en esta sección de D1 hace referencia específica a la importancia de tener el antígeno FrpB dentro de una vacuna, es decir, que de ninguna manera estaría señalando la supresión de el gen que codifica este antígeno.

Así mismo, la reivindicación 15 del documento D1 claramente hace referencia a que el gen FrpB es uno de los genes que se prefiere regulado a **mayores niveles de expresión**:

*"15. La preparación de vesículas de la reivindicación 14, obtenible mediante el empleo de al menos el proceso b) y/o i), **donde uno o más genes son regulados a mayores niveles de expresión** de una lista que comprende: NspA, similar a Hsf, Hap, PorA, PorB, OMP85, PilQ, PldA, **FrpB**, TbpA, TbpB, FrpA, FrpC, LbpA, LbpB,*

FhaB, HasR, lipo02, Tbp2 (lipo28), MltA (lipo30) y ctrA." (Página 103, líneas 12 a 15, D1, resaltado fuera de texto).

En vista de lo anterior, **partiendo de las enseñanzas de D1 la persona versada en la materia no tendría ninguna motivación para obtener preparaciones de vesículas a partir de una cepa específicamente regulada a niveles bajos de expresión y en preferencia suprimida, de FrpB, máxime cuando D1 al contrario señala la importancia de tener dicho antígeno regulado a niveles mayores de expresión.**

Así mismo, a partir de D1 no podría de ninguna manera predecirse la mejorada respuesta inmunológica que se produce por vesículas obtenidas de cepas FrpB(-), la cual permite un mayor cubrimiento de la vacuna de vesículas obtenida como es demostrado en el ejemplo 10 de la página 40 de la solicitud denegada, toda vez que dicho documento ni si quiera considera útil la posibilidad de suprimir este gen, sino que al contrario, claramente enseña que es preferible regularlo a mayores niveles de expresión.

De forma similar, **el documento D1 no sugiere de ninguna manera una preparación de vesículas la cual tenga al menos una proteína de membrana externa conjugada a LOS**, como la que es objeto de las reivindicaciones 6 a 23 de la invención denegada, por lo que la persona versada en la materia partiendo de las enseñanzas de este documento no encontraría ninguna motivación para producir específicamente vesículas conjugadas intravesículas.

Sobre este particular la Resolución número **59708** señala que *"ya que la solicitud plantea hacer preparaciones de vesículas a partir de cepas bacterianas gram-negativas (Neisseria, Moraxella catarrhalis, Haemophilus influenzae no tipificable) (Reivindicación 6) y debido a que dichas cepas carecen de polisacáridos capsulares, éstas no requieren las modificaciones en la expresión de los mismos y, por ello, la preparación de vesículas derivadas de estas cepas también se encuentra cubierta por la información divulgada en D1"*.

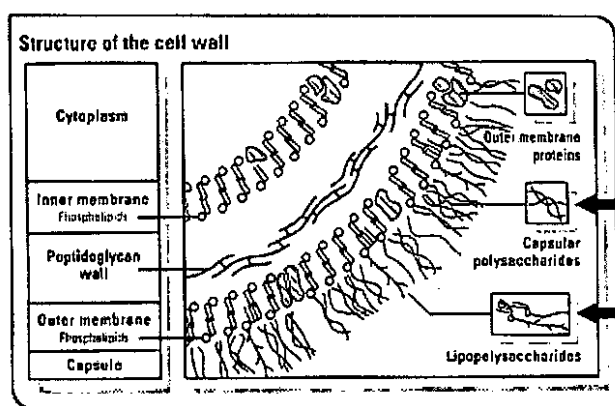
En relación con el anterior señalamiento me permito resaltar que este constituye una prueba fehaciente de la mala interpretación que realiza ese Despacho del estado del arte y de la invención denegada.

En primer lugar, para la persona versada en la materia sería un hecho conocido que las cepas empleadas tanto en D1 como en la solicitud en estudio si poseen polisacáridos capsulares (*Neisseria* y *Haemophilus influenzae*);

"Las cápsulas consisten generalmente de polisacáridos ácidos. La biosíntesis y expresión superficial ha sido estudiada con los polisacáridos **de E. coli, Neisseria meningitidis y Haemophilus influenzae.**"¹

Así mismo, dentro del campo técnico de la invención sería evidente que la reivindicación 6 de manera específica se refiere **a la conjugación intravesícula de LOS** y no a la modificación en la expresión de los polisacáridos capsulares, la cual de ninguna manera está revelada en D1.

Es pertinente resaltar que para dicha persona versada en la materia sería igualmente claro que los polisacáridos capsulares son entidades diferentes a los lipooligosacáridos:



Esquema de la membrana celular de meningocócica ²

Consecuentemente, la presente solicitud reclama una modificación superficial en las vesículas por la conjugación de LOS **a las proteínas de membrana externa presentes en las mismas vesículas:**

"Así, un aspecto adicional de la invención es una preparación de vesículas de una cepa bacterial Gram-negativa en la membrana externa la cual es integrada a una proteína de membrana externa conjugada a LOS. Aunque LOS puede ser adicionado a una preparación de vesícula para su conjugación, **se prefiere que el LOS esté naturalmente presente en la superficie de la preparación de vesícula.**" (Página 13, descripción de la solicitud, resaltado fuera de texto).

"De este modo los inventores han encontrado que una composición que comprende vesículas **en la que LOS presente en las vesículas se ha conjugado con una forma intra- vesícula a las proteínas de membrana externa también presentes en la vesícula** puede formar la base de una vacuna para el tratamiento o prevención de enfermedades ocasionadas por el organismo a partir del cual se han

¹ Lengeler, Joseph Editor "Biology of the Prokaryotes" Thieme, Germany, 1999, página 564.

² http://www.chori.org/Principal_Investigators/Moe_Gregory_R/moe_research.html

derivado las vesículas, siendo dicha vacuna sustancialmente no tóxica y es capaz de inducir una respuesta bactericida T dependiente contra LOS en su ambiente nativo." (Página 14, descripción de la solicitud, resaltado fuera de texto).

De esta forma, **las revelaciones de D1 de ninguna manera indican o sugieren las vesículas que son objeto de las reivindicaciones 6 a 23 de la solicitud denegada.**

A este respecto la Resolución impugnada también afirma que *"específicamente, en D1 también se menciona la preparación de vesículas que integran proteínas de membrana externa conjugada a LOS derivados de bacterias Gram-negativas (Pág.25 proceso f y h)."*

Dicha afirmación es nuevamente prueba de la incorrecta interpretación que realiza ese Despacho del arte previo. En primer lugar, como se expuso anteriormente, la invención denegada proporciona vesículas en las cuales los LOS se han conjugado con las proteínas de membrana externa presentes en la misma vesícula. Para este fin, se emplean reactivos como el EDAC/NHS (Clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida), como se enseña en el ejemplo 4 de la página 32 de la descripción de la solicitud.

Contrario a esto, el proceso descrito dentro de la página 25 de D1, revela la detoxificación de LOS por el anclaje de péptido cíclico externo, la polimixina B:

"Proceso f) – Anclaje de proteínas homólogas y heterólogas a vesículas de membrana externa mientras se reduce la toxicidad de LPS.

*Un aspecto adicional de esta invención cubre el uso de **secuencias genéticas que codifican péptidos de polimixina B** (o análogos de los mismos), como medio para dirigir proteínas de fusión a la membrana externa. **Polimixina B es un péptido cíclico compuesto por aminoácidos no codificados por tRNA (producido por organismos actinomicetales Gram-negativos) que se une fuertemente a la parte del lípido A de los LPS presentes en la membrana externa"** (Página 25, líneas 11 a 17, D1, resaltado fuera de texto).*

Por lo tanto, es evidente que el proceso revelado en D1 es **totalmente distinto** al que se emplea en la presente solicitud para la conjugación de LOS en las vesículas que hacen parte de las preparaciones reclamadas en las reivindicaciones 6 a 23.

Consecuentemente, dado que D1 es completamente silencioso con respecto al entrecruzamiento de LOS intravesícula, empleando reactivos de entrecruzamiento como el EDAC, a partir de estas revelaciones la persona versada en la materia no

podría de ninguna manera suponer que esta conjugación particular proporcionaría composiciones con menor reactogenicidad y una inmunogenicidad adecuada, tal como ha sido comprobado por el solicitante y se revela dentro de la descripción de la solicitud.

En vista de todo lo anterior, es evidente que las enseñanzas de D1 de ninguna manera conducirían a la persona versada en la materia a las preparaciones de vesículas que son objeto de las reivindicaciones 3 a 23 de la solicitud denegada.

(6) **Dado que D1 no dirige de forma evidente a la persona versada en la materia a obtener la materia reclamada por las reivindicaciones 3 a 23 de la invención denegada, estas reivindicaciones se ajustan totalmente a lo preceptuado por el Artículo 18 de la Decisión Andina 486 de 2000.**

En virtud de los hechos discutidos anteriormente, se ha establecido que la persona versada en la materia partiendo de las enseñanzas de D1, no podría de ninguna manera obtener específicamente una preparación de vesículas de *Neisseria* provenientes de una cepa FrpB(-), ni una preparación de vesículas de una bacteria Gram-negativa con una conjugación de LOS intravesícula como las que son reclamadas por las reivindicaciones 3 a 23 de la solicitud denegada.

Dentro de este contexto me permito referirme al señalamiento que hace el Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina con respecto a las definiciones de "obvio" y "evidente" en la evaluación del Nivel Inventivo de una solicitud de patente³:

"Resulta pertinente, a los efectos del artículo 4 de la Decisión 344, definir qué se entiende por "obvio" y por "evidente" a fin de determinar qué se debe entender por nivel inventivo.

Lo obvio es aquello que salta a la vista de manera clara y directa; lo "que se encuentra o pone delante de los ojos, muy claro o que no tiene dificultad". Mientras que lo evidente consiste en la "certeza clara y manifiesta de la que no se puede dudar; cierto, claro, patente y sin la menor duda". De forma que algo que resulte obvio no es necesariamente evidente; empero lo que es evidente, es también obvio.

En este orden de ideas, se puede concluir que una invención goza de nivel inventivo cuando a los ojos de un experto medio en el asunto de que se trate, se necesita algo más que la simple aplicación de los conocimientos técnicos en la materia para llegar a ella, es decir, que de conformidad con el estado de la técnica el invento no sea consecuencia clara y directa de dicho estado."

³ Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina, PROCESO 192-IP-2005

De este señalamiento es claro que para la legislación Andina, para que exista afectación del requisito de nivel inventivo de una solicitud de patente es necesario que la invención allí revelada sea derivable de forma clara y directa del arte previo, y que las enseñanzas de este arte previo sin lugar a dudas conduzcan a dicha invención.

Ahora bien, para el caso que nos compete se ha demostrado que a partir de las enseñanzas de D1, no "salta a la vista de manera clara y directa" realizar una regulación a menores niveles de expresión, preferiblemente suprimir, la expresión del gen FrpB, ni realizar una conjugación de una proteína de membrana externa con LOS. Así mismo se ha establecido de las revelaciones de este documento de ninguna manera se tiene "certeza clara y manifiesta" de que preparaciones de vesículas obtenidas en estas condiciones proporcionarían vacunas que eliciarían respuestas inmunes ventajosas con respecto a las existentes en el arte previo.

En vista de lo anterior, es claro que **las reivindicaciones 3 a 23** de la solicitud denegada se ajustan totalmente a los lineamientos establecidos por el Artículo 18 de la Decisión Andina 486 de 2000, y por lo tanto la Resolución Número **59708** incurriría en una contravención a dicho Artículo al negar el privilegio de patente a reivindicaciones de una solicitud que si conllevan Nivel Inventivo.

En conexión con este hecho me permito muy respetuosamente señalar que en su análisis de Nivel Inventivo de las mencionadas reivindicaciones 3 a 23 ese Despacho incurre en lo que dentro del ámbito de las patentes se conoce como "hindsight", o análisis "Ex post facto", toda vez que conociendo de antemano la invención se están seleccionado y combinando partes específicas de las enseñanzas contenidas dentro del documento citado de manera que permitan construir la materia reclamada por la presente solicitud, **en sus reivindicaciones 3 a 23**, lo cual de ninguna manera sería evidente para la persona versada en la materia en el momento en el cual se desarrolló la invención.

En este sentido vale la pena resaltar que al tener conocimiento de la invención es de esperarse que dicha selección y combinación particular de las enseñanzas de D1 parezca obvia, toda vez que ya se sabe de antemano que efectivamente estos elementos en combinación resuelven el problema planteado; sin embargo, esta información no era conocida por el inventor en el momento de desarrollar la invención, por lo que no podría tener certeza de la utilidad de realizar estos pasos.

En vista de lo anterior, dado que la única motivación que tendría la persona versada en la materia de reunir estas características particulares enseñadas en D1 sería la misma invención como ha sido revelada, es evidente el Nivel Inventivo que conlleva dicha solicitud.

II. CONCLUSIÓN

Por último, me permito señalar a ese Despacho que los hechos discutidos anteriormente en este escrito han establecido de forma incontrovertible que **las reivindicaciones 3 a 23** de la presente solicitud sí cumplen con el requisito **Nivel Inventivo** de acuerdo con lo establecido por el Artículo 18 de la Decisión Andina 486, dado que a partir de las enseñanzas del citado documento D1 no sería posible obtener de manera evidente las características particulares que distinguen las preparaciones de vesículas objeto de las mencionadas reivindicaciones 3 a 23 de la solicitud denegada.

De esta forma, se demostró que el documento D1 al contrario alejaría del objeto de las reivindicaciones 3 a 5, toda vez que no se refiere de ninguna manera a vesículas obtenidas a partir de una cepa FrpB(-), sino que muestra cómo el gen de esta proteína de membrana externa se prefiere regulado a niveles altos de expresión.

Así mismo, se estableció que el documento D1 es totalmente silencioso con respecto a preparaciones de vesículas con una conjugación de una proteína de membrana externa con LOS, como las reclamadas por las reivindicaciones 6 a 23 de la solicitud denegada, por lo que la persona versada en la materia no encontraría ninguna motivación para realizar dicha conjugación.

En vista de estos hechos, se ha comprobado claramente el Nivel Inventivo que conllevan **las reivindicaciones 3 a 23** de la solicitud denegada frente al estado del arte más próximo.

III. SOLICITUD

En vista de todo lo anterior, ruego a usted proceder a estudiar nuevamente la solicitud a la luz de las argumentaciones presentadas y revocar la Resolución impugnada para conceder el privilegio de patente solicitado **para las reivindicaciones 3 a 23 actualmente presentadas**.

IV. PODER

En este punto me permito mencionar ante este Despacho que el documento que acredita mi calidad de Representante Legal en Bogotá para asuntos relativos a la Propiedad Industrial de la sociedad peticionaria fue presentado junto con la solicitud original No. 05-007.268 el 28 de Enero de 2005.

V. ANEXO

Anexo me permito presentar copia de la portada y la página 564 del documento Lengeler, Joseph Editor "Biology of the Prokaryotes" Thieme, Germany, 1999, referenciado en el texto.

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

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

VI. DOMICILIO

Mi dirección es Calle 72 No. 5-83, Piso 6º., Bogotá D.C., Colombia.

Del Señor Superintendente,



ALICIA LLOREDA RICAURTE

T. P. 53.215

NOTARIA 41 DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ D.C.
DEPARTAMENTO DE CUNDINAMARCA
REPÚBLICA DE COLOMBIA

El Notario 41 del círculo de Bogotá, da fe de que compareció personalmente: Alicia Lloreda Ricaurte
identificada (o) con: 39.690.713 y tarjeta
profesional de abogado No. 53215 del Consejo
Superior de la Judicatura, quien autentica la firma puesta por ella
(el) mismo en este escrito.
(Art. 84 C. P. C. Decreto. 2282/69 mod. 38)

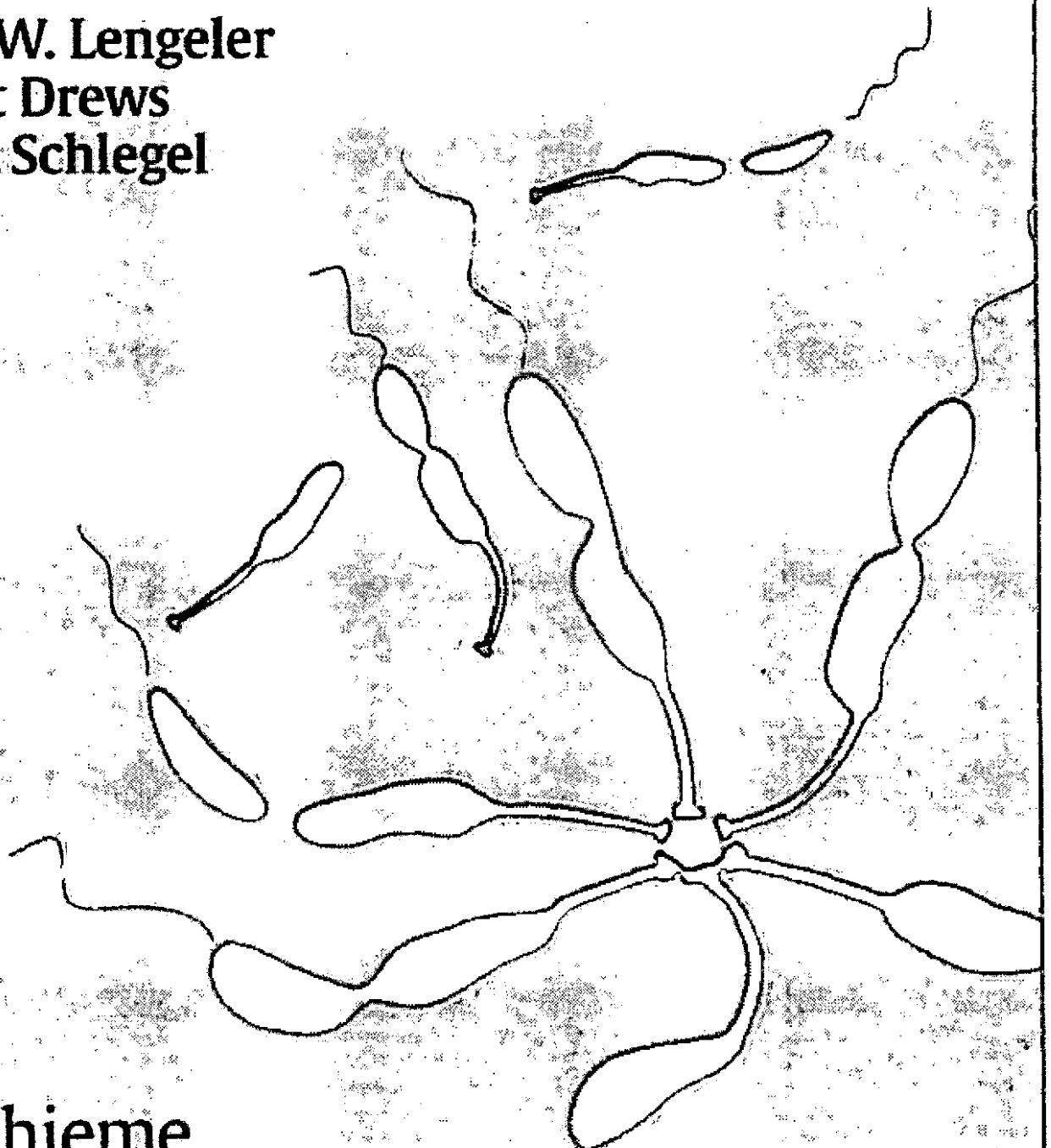
Bogotá, D.C. 17 NOV. 2010
Alicia Lloreda Ricaurte
ALICIA LLOREDA RICAURTE
C.C. No. 39.690.713 de Usaquén
FIRMA DE LA (EL) COMPARECIENTE

Jimmy Nataly
Mocho Betrán
C.C. 1015373013
VoBo.



Biology of the Prokaryotes

Edited by
Joseph W. Lengeler
Gerhart Drews
Hans G. Schlegel



Thieme

Library of Congress Cataloging-in-Publication Data

Biology of the prokaryotes / edited by Joseph W. Lengeler, Gerhart Drews, Hans G. Schlegel.

p. cm

Includes bibliographical references and index.

ISBN 3-13-108411-1.

1. Prokaryotes. I. Lengeler, Joseph W. II. Drews, Gerhart III. Schlegel, Hans Günter, 1924-
[DNLM: 1. Prokaryotic Cells--physiology. 2. Bacteria.
QW 51B615 1999]

QR41.2.B55 199

579.3-dc21

DNLM/DLC

for Library of Congress

98-36569

CIP

© 1999 Georg Thieme Verlag, Rüdigerstrasse 14,
D-70469 Stuttgart, Germany

All rights reserved. This book, including all parts thereof, is legally protected by copyright. Any use, exploitation, or commercialization outside the narrow limits set by copyright legislation, without the publisher's consent, is illegal and liable to prosecution. This applies in particular to photostat or mechanical reproduction, copying, or duplication of any kind, translating, preparation of microfilms, and electronic data processing and storage.

The right of the Authors to be identified as the Authors of this Work has been asserted in accordance with the Copyright, Designs and Patents Act 1988.

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, except as permitted by the UK Copyright, Designs and Patents Act 1988, without the prior permission of the copyright owner.

First published 1999

Distributed in the United Kingdom, Europe (outside Germany, Austria and Switzerland), the Middle East, Africa, the Indian Subcontinent and Asia by:
Blackwell Science Ltd
Osney Mead
Oxford OX2 0EL

Orders should be addressed to:
Marston Book Services Ltd
PO Box 269

Abingdon, Oxon OX14 4YN
Tel: 01235 465500
Fax: 01235 465555

Distributed in the USA by:
Blackwell Science, Inc.
Commerce Place
350 Main Street
Malden, MA 02148 5018
Tel: 800 759 6102
781 388 8250
Fax: 781 388 8255

Distributed in Australasia by:
Blackwell Science (Asia) Pty Ltd
54 University Street
Carlton, Victoria 3053
Tel: 3 9347 0300
Fax: 3 9347 5001

A catalogue record for this title is available from the British Library

Cover design by Ruth Hammelehle
Typesetting by Techset Composition Ltd., Salisbury, England
Printed in Germany by Offizin Andersen Nexö, Leipzig

ISBN-3-13-108411-1 (Thieme)
ISBN 0-632-05357-7 (Blackwell)

2 3 4 5 6

of Glc and GalNAc from their UDP-activated forms. There is no linkage region between the peptidoglycan and the teichuronic acid chain.

Bacilli have the capacity to produce either teichoic acids or teichuronic acids. The pathways leading to one

or the other of these surface components are regulated by the phosphate content of the growth medium: teichoic acid is favored at a high phosphate concentration and teichuronic acid at a low phosphate concentration.

23.5 The Capsules Surrounding Many Gram-positive and Gram-negative Bacteria as a Protective Layer Consist of Acidic Polysaccharides

Many Gram-positive and Gram-negative bacteria are encapsulated (Figs. 2.6a,b). The capsules protect the bacteria against adverse influences of the surroundings. Capsules are important virulence factors of pathogenic bacteria because they counteract the host defense mechanisms. In particular, capsules prevent the lytic and/or opsonic action of the complement system, and they protect the bacteria against phagocytosis. It has occasionally been observed that capsules mediate adhesion of bacteria to surfaces *in vivo* and *in vitro*. Although capsular material, like all the other bacterial surface components, is in part released into the medium, capsules should not be confused with bacterial slime, which is not anchored to the cell surface.

The capsules consist generally of **acidic polysaccharides**. Biosynthesis and surface expression have been studied with the capsular polysaccharides of *E. coli*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella*, and group A *Streptococcus*. The capsular polysaccharides of *E. coli* are divided into group I (*Klebsiella*-like) and group II (*Neisseria*- and *Haemophilus*-like).

E. coli (group I) and *Klebsiella* capsular polysaccharides are synthesized by enzymes encoded in genes that correspond to the *rfb* genes of LPS biosynthesis. Their polymerization may or may not include the intermediary formation of undecaprenol diphosphate-bound oligosaccharides. The final acceptor of some group II capsular polysaccharides in *E. coli*, *H. influenzae*, and *N. meningitidis* is phosphatidic acid. This substituent presumably mediates surface association of the capsules through hydrophobic interactions. In *E. coli* (group II) and in *N. meningitidis*, substitution of the polysaccharide with phosphatidic acid is coupled with its translocation across the cytoplasmic membrane. The export sites of the capsular polysaccharides of Gram-negative bacteria are membrane adhesion sites.

23.5.1 Synthesis and Surface Translocation of Capsular Polysaccharides

The synthesis of *E. coli* group II, *N. meningitidis*, and *H. influenzae* capsular polysaccharides is directed from the

comparable gene clusters *kps* (*E. coli*), *cps* (*H. influenzae*), and *ctr* (*N. meningitidis*). The *kps* gene cluster is organized into three regions. A central gene region, which directs the polymerization of the capsular polysaccharide, is type-specific. It is flanked by two conserved gene regions that direct the surface expression of the capsular polysaccharides. The *cps* and *ctr* loci are similarly organized. These capsular polysaccharides are polymerized at the inner side of the cytoplasmic membrane. The translocation of the synthesized polysaccharide is mediated by an ABC-2 translocator in a reaction comparable to that shown in Figure 23.6 for LPS. Thus, the translocation of the O-specific polysaccharide to core-lipid A and that of group II capsular polysaccharide to phosphatidyl-KDO seem to be comparable reactions.

Group A *Streptococcus* produces a capsule consisting of **hyaluronic acid**, a glycosaminoglycan with the structure $[3\text{-}\beta\text{-GlcA}(1,3)\text{-}\beta\text{-GlcNAc}(1)]_n$. Synthesis and export of hyaluronic acid are combined processes. The polymerization proceeds by alternating transfer of glucuronic acid (GlcA) and GlcNAc from the UDP-activated sugars without the participation of undecaprenol phosphate as cofactor.

Since the Gram-positive streptococci have no outer membrane, the surface translocation of the capsular hyaluronic acid is a simpler process. It is assumed that the polysaccharide grows at the reducing end and is pushed out of the cell during the elongation process. A membrane-bound complex of hyaluronate synthetase (i.e., a protein with transferase activities for both GlcA and GlcNAc) and UDPGlc dehydrogenase synthesizes hyaluronic acid and concomitantly translocates it to the cell surface.

23.5.2 Regulation of Capsule Synthesis

The biosynthesis of *E. coli* (group I) and *Klebsiella* capsules is controlled by a two-component regulatory system (Chapter 20.4): *rcs* for regulation of capsule synthesis), which was first described for the synthesis of the slime or mucus (M) polysaccharide of *E. coli*. This