



No. 14-093195- -00006-0000

Fecha: 2016-06-29 16:56:33 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act. 523 RESPUESTA Folios: 12

Señor Director
NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

5V

Trámite : 002
Evento : 001
Actuación : 523

Referencia : Expediente No. 14.093.195
Asunto : Solicitud de patente para: "ENZIMA ESTERASA MODIFICADA
ENANTIOSELECTIVA Y PROCESO PARA LA OBTENCIÓN DE LA
MISMA"
Solicitante : CORPORACIÓN CORPOGEN Y PONTIFICIA UNIVERSIDAD
JAVERIANA
Fecha de solicitud : 30 de abril de 2014

RESPUESTA A PRIMER EXAMEN DE PATENTABILIDAD

LUZ CLEMENCIA DE PAÉZ, identificada como aparece al pie de mi firma, en mi condición de apoderada de la sociedad solicitante de la patente de la referencia, doy respuesta al Oficio 3375, notificado por fijación en lista el 05 de abril de 2016.

I. MODIFICACIONES AL PLIEGO REIVINDICATORIO

En respuesta al examen de patentabilidad el solicitante decide aportar un nuevo capítulo reivindicatorio conformado por 26 reivindicaciones en las que se han incluido las siguientes modificaciones:

1. La reivindicación 1 fue modificada de manera que se eliminaron los literales b), c), d) y e).
2. La materia de la reivindicación 4 fue incorporada en la reivindicación 1.

"EXCELENCIA LEGAL EN UN MUNDO SIN FRONTERAS"

BOGOTÁ - Edificio Siski - Carrera 4 No. 72 - 35 - Código Postal 110221 - Tel. (57-1) 347 3611 - Fax (57-1) 211 8650 - Fax In U.S.A: (1-305) 675 7743 - COLOMBIA
MEDELLÍN - San Fernando Plaza - Carrera 43 A No. 1 - 50 - Torre Protección Oficina 852 - Código Postal 050021 - Tel: (57-4) 520 4760 / (57-4) 326 0789 / (57) 317 365 8663 / (57) 318 532 2365 - COLOMBIA
BARRANQUILLA - Calle 64 No. 50-20 - Oficina 201 - Código Postal 080002 - Barrio El Prado - Tel. (57-5) 3 51 64 40 - COLOMBIA

3. Las reivindicaciones 2 a 4 fueron eliminadas.

4. El pliego reivindicatorio fue modificado de manera que las reivindicaciones fueron reenumeradas y en consecuencia, las dependencias fueron modificadas.

Estas modificaciones se ajustan al artículo 34 de la Decisión 486 de 2000 y no constituyen una ampliación de la protección que correspondería a la divulgación contenida en la solicitud inicial.

A pesar de eliminar materia del pliego reivindicatorio originalmente presentado, mi representada no renuncia a la protección que pueda obtener sobre dicha materia y se reserva el derecho de presentar una solicitud divisional que la contenga durante el trámite de la presente solicitud.

II. EN CUANTO A LA SUPUESTA FALTA DE CLARIDAD

1. La reivindicación 1 fue modificada de manera que la enzima reivindicada se encuentra definida por su secuencia de aminoácidos. Por lo tanto, la objeción ha sido superada.

2. Por otro lado, las expresiones referentes a porcentajes de identidad han sido eliminadas del pliego reivindicatorio.

3. Con respecto a la objeción de la reivindicación 6 por referirse a parámetros, amablemente señalamos nuestro desacuerdo debido a que de acuerdo con la práctica actual de Patentes en Colombia, la definición por parámetros es permitida. Específicamente, la Guía para Examen de Solicitudes de Patente de Invención y Modelo de Utilidad, establece lo siguiente en relación a Definición por parámetros:

“Una reivindicación de producto, por ejemplo un compuesto químico, se puede caracterizar por su estructura y elementos, por su fórmula química, como un producto de un proceso, o excepcionalmente por sus parámetros... El examinador no permitirá la caracterización de un compuesto químico solamente por sus parámetros, a menos que la

invención no se pueda definir de otra manera... Lo mismo se aplica a una característica vinculada a un procedimiento, que es definido por parámetros."

Así las cosas, dado lo anterior, es muy importante señalar que los fragmentos objetados por el señor Examinador por referirse a parámetros, es permitido pues la presente invención en la reivindicación 6 (nueva 3) se encuentra caracterizada por sus características técnicas esenciales en la reivindicación 1 junto con sus parámetros. Además, es importante señalar que dichos parámetros permiten que se limite aún más la invención y sea más clara para la persona versada en la materia. Por lo tanto, la objeción se da por superada.

4. Adicionalmente, con respecto a la objeción hacia las reivindicaciones 7 a 11, atentamente señalamos a su Despacho que es preciso aclarar que de acuerdo a la práctica actual de patentes en Colombia, los fragmentos objetados por definir resultados a alcanzar pueden aparecer en las reivindicaciones acompañados de las características técnicas de la invención, y en este caso se hacen indispensables para que un técnico medio pueda entender a cabalidad la invención; lo anterior para garantizar que una persona normalmente versada en la materia pueda reproducir la invención.

Con respecto a lo anterior, el "INSTRUCTIVO EXAMEN DE SOLICITUDES DE PATENTES DE INVENCION Y MODELO DE UTILIDAD" de su Despacho enuncia:

"El resultado a alcanzar no es una característica técnica de la invención. Puede aparecer en la reivindicación, pero siempre acompañando las características técnicas que definen la invención." (Subraya incluida en el texto).

De acuerdo con lo anterior, los fragmentos objetados pueden y deben estar en las reivindicaciones, ya que resultan esenciales para que una persona del oficio normalmente versada en la materia entienda correctamente la invención. Además, es importante señalar que estas expresiones acompañan a la característica técnica esencial de la invención, la enzima modificada, que se encuentra definida en la reivindicación 1, lo cual permite que se limite aún más la invención y sea más clara para la persona versada en la materia. Por lo tanto, la objeción se da por superada.

III. ESTADO DE LA TÉCNICA

Su Despacho determinó 3 documentos como relevantes para realizar el análisis de patentabilidad de la presente patente de invención:

1. D1, referido al documento Brazilian Journal of Chemical Engineering, Vol. 23, No. 03, pp. 291 - 300, titulado "Review-alternatives for the separation of drug enantiomers: ibuprofen as a model compound" que se relaciona con métodos de resolución de enantiómeros con actividad terapéutica, que pueden comprender enzimas esterasas.
2. D2, referido al documento Appl Microbiol Biotechnol (2003) 60:523–533, DOI 10.1007/s00253-002-1158-6 titulado "Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems" que se relaciona con una revisión de proteínas de TAG de fusión útiles en la separación de diversas proteínas que presentan actividad terapéutica.
3. D3, referido al documento Rev. Mex. Ing. Quím vol.10 no.2 México ago. 2011 titulado "Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*" que se relaciona con métodos de producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*.

IV. EN CUANTO A LA SUPUESTA FALTA DE NOVEDAD

1. Con respecto a la objeción por falta de novedad de la reivindicación 24 frente a D1, respetuosamente señalamos a su Despacho que el método para preparar ácidos ópticamente activos (S)-profenos comprende también la materia de la reivindicación 1, es decir, para poder llevar a cabo dicho método se debe hacer uso de la enzima modificada enantioselectiva con actividad esterasa en el paso b) a unas condiciones que son particulares y específicas para esta enzima, lo cual hace nuevo el método de la reivindicación 24 (nueva 21). Lo anterior es claro, debido a que el método de D1 no se lleva a cabo con la enzima modificada de la presente invención. Por otra parte, D1 es un documento que hace una revisión sobre métodos de separación de enantiómeros y no presentan procedimientos ni detalles de las metodologías ni condiciones como sí se hace en la reivindicación 24 (nueva 21). A este respecto, es muy importante señalar que la Tabla 1 de D1 menciona enzimas comerciales que no tienen ninguna relación con la enzima objeto de la patente.

2. En consecuencia de lo anterior, la materia de la reivindicación 24 (nueva 21) es novedosa frente a D1 y por lo tanto, se supera la objeción.

V. EN CUANTO A LA SUPUESTA FALTA DE NIVEL INVENTIVO

1. En primer lugar, es preciso señalar que D2 corresponde a un documento que hace una revisión sobre proteínas de fusión etiquetadas (tag protein fusions), donde se describen los diferentes sistemas que existen: Argtag, calmodulin-binding peptide, cellulose-binding domain, DsbA, c-myc-tag, glutathione S-transferase, FLAGtag, HAT-tag, His-tag, maltose-binding protein, NusA, Stag, SBP-tag, Strep-tag, thioredoxin. Estos son protocolos comerciales, pero no enseñan ni sugieren las condiciones de funcionamiento para obtener la pureza de la enzima. Para lograr la purificación a través del uso de alguno de estos sistemas es necesario realizar un trabajo adicional de estandarización de las condiciones de operación y funcionamiento óptimo para lograr efectivamente la pureza de la enzima. Cualquiera de estos sistemas se puede usar para purificar una enzima pero no garantizan el éxito de la purificación y la estabilidad de la enzima. Esto se alcanza desarrollando evaluaciones particulares con la enzima y el sistema utilizado.

2. Por otro lado, con respecto a D3 es importante indicar que si bien *E. coli* es el hospedero más empleado para realizar producción de enzimas recombinantes, es importante aclarar que las condiciones específicas de funcionamiento de enzima-hospedero son particulares y están en función de la enzima que se quiere clonar en el hospedero. Para ello, mi representada tuvo que tener en cuenta muchas variables como tiempo de agitación, velocidad de agitación, temperatura de incubación, concentración del inductor, etapa de crecimiento del cultivo del hospedero para realizar la inducción, etc. En consecuencia, es de vital relevancia que mi representada identificó todas estas variables en el proceso de obtención de la enzima y que son particulares a la enzima.

A este respecto, se incluyen particularidades desarrolladas en el curso de la presente invención, que fueron producto de pruebas de ensayo y error:

El fragmento una vez liberado se ligó a un vector pET21a(+) (Novagen, Alemania). Este fragmento es unido a una cola de HisTag en la región C-terminal, esta cola es adquirida

debido a que el vector se lo confiere. La ubicación del HisTag, permite un correcto plegamiento de la molécula y por tanto, se obtiene una mayor eficiencia en su purificación. La cepa *E. coli* BL21 (DE3) se transformó con el DNA ligado al vector. Las células se cultivaron a 37°C a 200 r.p.m hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 a 600 nm. La inducción de la producción de la proteína recombinante se realizó con IPTG a una concentración mayor a 0.05mM y menor a 1 mM. El cultivo de *E. coli* BL21 (DE3) se incubó a una temperatura superior a 20°C y menor de 40°C, la agitación se mantuvo entre 100 y 200 rpm. La inducción se llevó a cabo por un periodo entre 6 y 12 horas, tiempo en el cual las células fueron concentradas por una centrifugación a 8000 g por 15 minutos a 4°C. El pellet se congeló a -20°C. Posteriormente, el pellet fue resuspendido en buffer de lisis (50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, Triton X-100 0.01% (v/v), pH 8.0) con 1mg/ml de lisozima. Subsecuentemente, la célula fue desintegrada por ultrasonificación. Las células lisadas obtenidas se incubaron por 15 minutos en un rango de temperatura entre 50 y 70°C, para remover proteínas termolábiles. El extracto se centrifugó a 10000 g por 25 min a 4°C, el sobrenadante se transvasó en un recipiente limpio y estéril. A partir de éste, se realizaron cargas de un ml en columnas cromatográficas de separación por afinidad al Ni²⁺ preempacadas Protino TED 2000®, y cada vez que se adicionaba un ml de la muestra se realizaba un lavado de la columna con la solución de lavado (50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, pH 8.0). Además, se adicionó NaCl a una concentración superior a 50 e inferior a 800mM y se empleó Triton X-100 en una concentración entre 0.01% y 1% (v/v), pH 8.0. El uso de NaCl y Triton X-100, ayudó a prevenir interacciones hidrofóbicas y por lo tanto, uniones inespecíficas de otras proteínas. Una vez cargada toda la muestra en la columna, se realizaron de tres a cinco lavados con la solución de lavado en ausencia de NaCl y Triton X-100. Los diferentes lavados, permitieron liberar de la columna aquellas proteínas o residuos de las células lisadas que no estuvieran modificadas con la cola Histag. Debido a que la proteína modificada presentaba la cola Histag se generó una fuerte interacción entre la proteína y los iones Ni²⁺, lo cual permitió su retención y posterior elución con la solución eluyente (50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, entre 100 y 250mM de imidazole, pH 8.0). Finalmente, la proteína purificada fue recuperada en un vial limpio y estéril.

En vista de lo anterior, es importante tener en cuenta que mi representada tuvo que llevar a cabo experimentación adicional para llegar al método de la presente invención, lo cual implica nivel inventivo para la presente invención.

3. Por otro lado, tal como se encuentra divulgado en el Ejemplo 9 de la presente solicitud tal como fue presentada originalmente, la enzima modificada de la invención presenta una alta enantioselectividad en comparación con la enzima de D1. Lo cual es un indicio de nivel inventivo y así, la presente invención tiene altura inventiva. Por lo tanto, la objeción a este respecto es superada.

4. Finalmente, tal como ya se ha mencionado, D1, D2 y D3 son documentos muy generales, y precisamente por esto no dan las pautas precisas, ni enseñan ni sugieren cómo lograr mantener estable y purificada una enzima.

5. Por lo tanto, un técnico con conocimientos medios en la materia no estaba en condiciones de plantearse el problema, tampoco de resolverlo en la forma en que se reivindica y tampoco de prever el resultado, por lo que la presente solicitud posee la altura inventiva para que se le conceda el privilegio solicitado.

6. En consecuencia de lo anterior, la invención de la presente solicitud tiene nivel inventivo en vista de los documentos D1, D2 y D3 del estado de la técnica citados por el Examinador.

VII. PETICIÓN

1. Puesto que se ha dado respuesta a todas las objeciones formuladas por la Dirección de Nuevas Creaciones, se solicita proceder al otorgamiento de la solicitud de patente.

2. De manera subsidiaria, y en caso de que la Dirección de Nuevas Creaciones tenga observaciones adicionales a la patentabilidad del invento, solicito emitir un nuevo requerimiento en el marco del artículo 45 de la Decisión 486 de 2000.

VIII. ANEXOS

1. Nuevo pliego reivindicatorio conformado por 26 reivindicaciones.

Señor Director,


LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ

C.C. 35.456.344 de Usaquén

T.P.A. No. 23.555

COLO-21131-0801-0001-7
SGD\SGD\ID-288985\WPC21131
No. M-2016-288985\SGD

REIVINDICACIONES

1. Una enzima modificada enantioselectiva con actividad esterasa caracterizada porque, la secuencia codificadora es seleccionada del grupo consistente de:
 - a) una secuencia aminoácida que comprende la SEQ ID N°2, en donde esta secuencia, tiene además una cola de 5 a 10 residuos histidina.
2. La enzima modificada enantioselectiva de la reivindicación 1, caracterizada porque la cola de histidina comprende 6 residuos de histidina.
3. La enzima modificada enantioselectiva con actividad esterasa de la reivindicación 1 caracterizada porque presenta una actividad enantioselectiva óptima a intervalos de temperatura de 45 – 75 °C y pH 6 – 11.
4. La enzima modificada enantioselectiva de cualquiera de las reivindicaciones precedentes caracterizada porque realiza la hidrólisis de cadenas acilo (C₂-C₁₂).
5. La enzima modificada enantioselectiva de la reivindicación 4 caracterizada porque realiza la hidrólisis de cadenas acilo preferentemente (C₆-C₁₀), esencialmente *p*-nitrofenil (*p*NP) caproato.
6. La enzima modificada enantioselectiva de la reivindicación 4 o 5 caracterizada porque además hidroliza triacil-glicerol como tributirina y triocaprilina.
7. La enzima modificada enantioselectiva de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes caracterizada porque es estable en presencia de DMSO y glicerol.
8. La enzima modificada enantioselectiva de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes caracterizada porque su actividad se ve incrementada con la adición de Fe⁺³ al igual que Mn.
9. La enzima modificada enantioselectiva de la reivindicación 8 caracterizada porque la concentración de hierro óptima esta entre 6 y 10 mM.

10. La enzima modificada enantioselectiva de la reivindicación 1 caracterizada porque mejora la termoestabilidad en presencia de Fe^{+3} .
11. La enzima modificada enantioselectiva de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes caracterizada porque presenta una actividad selectiva sobre mezclas racémicas por enantiomeros (S) de tipo profenos.
12. La enzima modificada enantioselectiva de la reivindicación 11 caracterizada porque presenta una actividad selectiva sobre mezclas racémicas por enantiomeros (S) de ibuprofeno o naproxeno.
13. Un polinucleótido caracterizado porque comprende la secuencia SEQ ID N° 1 o equivalente y un extremo 5' modificado por la adición de residuos de His.
14. Un vector recombinante que comprende el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 13.
15. Una célula huésped transformada con el polinucleótido de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14.
16. La célula huésped de la reivindicación 15 donde la célula es *E. coli*.
17. Un método para obtener la enzima enantioselectiva modificada de las reivindicaciones precedentes que comprende las siguientes etapas:
 - a) Insertar el fragmento de SEQ N°1 o equivalente en un vector;
 - b) Insertar la cola His-Tag en un extremo del inserto,
 - c) Transformar una célula huésped con el vector,
 - d) Sobre expresar la proteína en la célula huésped,
 - e) Concentrar las células huésped y lisarlas,
 - f) Purificar la proteína,
 - g) Concentrar la proteína,
 - h) Almacenar proteína en buffer a pH 8-10.

11

18. El método de la reivindicación 17 caracterizado porque la cola de histidina comprende 5 a 10 residuos de histidina.
19. El método de las reivindicaciones 17 y 18 caracterizado porque la célula huésped es *E.coli*.
20. El método de las reivindicaciones 17 a 19 caracterizado porque la purificación se realiza por una técnica cromatográfica.
21. Un método para preparar ácidos ópticamente activos (S)- profenos, que comprende las etapas de:
- a) proporcionar un profeno o tri-acil-glicerol que contiene (R) y (S) racematos,
 - b) llevar a cabo una resolución dinámica sobre dicho profeno por reacción de dicho profeno con la esterasa de la reivindicación 1 que tiene (S)-estereoselectividad en presencia de un disolvente orgánico y una base a una temperatura de 45 a 75°C, en el que dicha esterasa escinde el enlace (S)-éster de dicho profeno, y dicha base promueve la racemización rápida simultánea de (R)-éster y (S)-éster, y
 - c) en el que dicha reacción tiene un rendimiento de conversión mayor de 50% de dicho profeno a dicho éster (S).
22. Un método para la producción de la proteína caracterizado porque comprende el uso de la célula huésped de acuerdo a la reivindicación 15.
23. Una composición caracterizada porque comprende:
- a. la proteína enantioselectiva de SEQ N°2 o equivalentes, y
 - b. un agente de preservación.
24. La composición de la reivindicación 23 caracterizada porque la proteína tiene una cola de histidina.
25. La composición de la reivindicación 23 o 24 caracterizada porque además comprende DMSO.

26. La composición de las reivindicaciones 23 a 25 caracterizada porque además comprende glicerol.