

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la purificación de un anticuerpo que contiene una glutamina N-terminal y/o un ácido glutámico N-terminal, comprendiendo el procedimiento una etapa de incubación de dicho anticuerpo en condiciones que promueven la conversión de la glutamina y/o ácido glutámico N-terminal de dicho anticuerpo a ácido piroglutámico N-terminal en donde el procedimiento para la purificación comprende las etapas de cromatografía con una proteína A con una resina adecuada y una cromatografía de intercambio iónico con una resina adecuada, en donde dicha incubación tiene lugar a una temperatura de 20 – 45°C con un pH en el rango de 3.5 – 9.0 por 4 a 120 horas y en donde la conversión de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal a ácido piroglutámico alcanza del 50% al 100%.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el anticuerpo es un anticuerpo anti-CD20.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el anticuerpo anti-CD20 comprende una secuencia de cadena ligera idéntica a la secuencia SEQ ID NO: 1 y una secuencia de cadena pesada idéntica a la secuencia SEQ ID NO: 2.
4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en el que la incubación tiene lugar por 12 a 96 horas.
5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en el que la conversión se lleva a cabo en medios celulares o en un tampón.
6. El procedimiento de la reivindicación 5 en el que la concentración del tampón se selecciona del intervalo de 20 mM a 150 mM.
7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en el que la etapa de conversión comprende la conversión no enzimática de la glutamina y/o el ácido glutámico N-terminal en ácido piroglutámico.
8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7 en el que la proteína tiene de 1 a 4 residuos de glutamina N-terminal y/o de 1 a 4 residuos de ácido glutámico N-terminal antes de la conversión.
9. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en el que el procedimiento comprende las etapas:
  - (a) captura de la proteína A con una resina adecuada,
  - (b) una inactivación viral a un pH en el intervalo de 3,0-4,0,
  - (c) una cromatografía de intercambio aniónico,
  - (d) la conversión de la glutamina y/o ácido glutámico N-terminal de la proteína en ácido piroglutámico,
  - (e) una cromatografía de intercambio catiónico con una resina adecuada y una elución en gradiente para separar las isoformas del producto,
  - (f) una filtración viral y
  - (g) una ultrafiltración/diafiltración (UF/DF).

10. El procedimiento de la reivindicación 9 que comprende una etapa de enfriamiento pasivo durante 12 a 72 horas después de la etapa (d).
11. Un procedimiento para preparar una proteína que tiene un ácido piroglutámico N-terminal como principio activo farmacéutico para un producto farmacéutico, comprendiendo el procedimiento un procedimiento de purificación de cualquiera de las reivindicaciones 1-10.

REF: Expediente No. **15-261.580**, solicitud de patente de invención a favor de **MABXIENCE S.A.** Título: **UN PROCEDIMIENTO PARA AUMENTAR LA FORMACIÓN DE ÁCIDO PIROGLUTÁMICO DE UNA PROTEÍNA.**

**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 No. 8686 relacionado con la patentabilidad de la presente invención y notificado el 14 de junio de 2017.

De manera respetuosa, me permito expresar nuestro desacuerdo con la objeción relacionada con el título, puesto que la solicitud se refiere en términos generales a la conversión de ácido glutámico y/o glutamina N-terminal en ácido piroglutámico en una proteína, en ningún caso se hace referencia únicamente a anticuerpos o en específico a rituximab, como explicaremos más adelante. Por lo que, el título de la presente solicitud es una generalización razonable del alcance de la presente invención.

Inicialmente, me permito señalar que la reivindicación 1 ha sido modificada, de manera que presenta la combinación de las anteriores reivindicaciones 1, 2, 5, 8 y 9. Por lo cual, consideramos relevante que a la reivindicación se le introdujo la característica técnica esencial relacionada con la etapa de captura (cromatografía) de la proteína A con una resina adecuada, la cual se encuentra debidamente sustentada en la descripción (página 14, líneas 24 – 32) como sigue:

*“La cromatografía de afinidad con proteína A se refiere a la separación o purificación de sustancias y/o partículas usando la proteína A, donde la proteína A generalmente se encuentra inmovilizada en una fase sólida. El proceso de cromatografía de afinidad con proteína A va seguido generalmente de etapas de cromatografía de intercambio iónico y/o de interacciones hidrófobas y/o en modo mixto. Dichos procesos generalmente incluyen también al menos dos etapas de reducción de virus, generalmente la reducción a pH bajo en elución de la etapa de afinidad e implementación de un filtro de virus en una posición adecuada del proceso.”.*

De acuerdo a lo anterior, se resuelve la objeción relacionada con la definición del procedimiento reclamado, puesto que se puede entender que el procedimiento de purificación reclamado posee dos etapas esenciales: una etapa de incubación y una etapa de captura por cromatografía, para las cuales, además se especifican las condiciones técnicas esenciales para llevarlas a cabo, es decir, la temperatura, pH y tiempo.

Las modificaciones anteriores se realizaron con el propósito de aclarar que la conversión de la glutamina y/o ácido glutámico N-terminal lleva lugar durante un proceso de purificación y no se basa en la obtención de piroglutamato N-terminal en el anticuerpo puro/aislado, lo que en síntesis indica que el piroglutamato se produce durante dicho proceso de purificación.

Ahora bien, respecto a la objeción por el uso de la expresión “y/o” me permito aclarar que la glutamina o el ácido glutámico pueden estar presentes en el enlace N-terminal de una proteína, por ejemplo, los anticuerpos están compuestos de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, por lo tanto, están compuestos de 4 subunidades (es decir, polipéptidos), como se indica en la descripción (página 5, líneas 6 - 9):

*“Los anticuerpos están constituidos generalmente por unidades estructurales básicas, cada una de las ellas con dos cadenas pesadas grandes y dos cadenas ligeras pequeñas unidas a través de puentes disulfuro e interacciones no covalentes.”.*

En consecuencia, los dos polipéptidos de cadena pesada pueden tener un residuo de glutamina o un ácido glutámico N-terminal. Por lo tanto, un anticuerpo puede tener 4 residuos de glutamina N-terminales o 4 residuos de ácido glutámico N-terminales o una mezcla de glutamina y ácido glutámico en dichos residuos. Por lo tanto, la expresión “y/o” es completamente clara y precisa.

Por otra parte, de manera respetuosa me permito disentir de la objeción sobre las anteriores reivindicaciones 2 y 3 (ahora reivindicación 1 y 2), puesto que los términos “*anticuerpo*” y “*anticuerpo anti-CD20*” son completamente claros y precisos y tienen un alcance bien conocido por un versado en la materia, como a continuación explicamos.

El término “*anticuerpo*”, que ahora es parte de la definición del procedimiento de purificación de la reivindicación 1, es ampliamente conocido en el campo técnico y, además, presenta una robusta definición en la descripción de la presente solicitud (página 10, líneas 27 – 32), como se muestra a continuación:

*“El término “anticuerpo” tal y como se usa en el presente documento se refiere a una molécula de inmunoglobulina compuesta por cuatro cadenas de proteína, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por puentes disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviado en el presente documento como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada (CH).”.*

Además, el término “*anticuerpo anti-CD20*”, que ahora hace parte de la nueva reivindicación 2, también es ampliamente conocido en el campo técnico y un versado en la materia entendería que dicho anticuerpo se caracteriza específicamente por ser capaz de unirse a una proteína CD20. De manera adicional, la descripción (página 15, líneas 17 y 18) indica que “*ejemplos adecuados de anticuerpos anti-CD20 incluyen Rituximab, Ofatumumab, Veltuzumab u Ocrelizumab*”.

De acuerdo a lo anterior, un versado en la materia estaría en la capacidad de entender el alcance de los términos “anticuerpo” y “anticuerpo anti-CD20”, y, por lo tanto, dichos términos son completamente claros y precisos y permiten definir la materia que es objeto de purificación mediante el procedimiento reclamado.

Adicionalmente, me permito aclarar que no habría motivación alguna para restringir el procedimiento de las nuevas reivindicaciones 1 y 2 a un anticuerpo en específico como lo sugiere el examinador, puesto que, como explicaremos a continuación, dicho procedimiento puede ser utilizado en diferentes clases de proteínas, entre ellas diferentes anticuerpos.

El examinador indica que extrapolar los resultados encontrados en los ejemplos 1 – 5 de la descripción de la presente solicitud se considera especulativo, conclusión con la cual respetuosamente disentimos, puesto que el examinador falla en apreciar la característica clave que hace que los resultados obtenidos en los ensayos con rituximab puedan ser extrapolados a otros anticuerpos e incluso a otro tipo de proteínas. De acuerdo a la descripción (página 4, líneas 20 – 25), la modificación postraducciona l relacionada con la ciclación (o conversión) de una glutamina y/o ácido glutámico N-terminal en ácido piroglutámico puede ocurrir en las proteínas (en general):

*“Las modificaciones postraduccionales asociadas con proteínas terapéuticas incluyen la carboxilación, hidroxilación, amidación y sulfatación, formación de puentes disulfuro y procesamiento proteolítico, así como glucosilación, isomerización, oxidación, ciclación de una glutamina o ácido glutámico N-terminal en ácido piroglutámico, fragmentación y agregación.”* (subraya añadida).

Adicionalmente, la descripción de la presente solicitud (página 15, líneas 1 – 11) menciona ejemplos de proteínas que pueden ser objeto del proceso de purificación que aquí se reclama:

*“En una realización de la presente invención la proteína se selecciona de una enzima, una hormona o un anticuerpo. Ejemplos adecuados de una proteína incluyen cualquier proteína que contiene uno o más residuos de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal, incluyendo, bacteriorodopsina, fibrinógeno, colágeno, quininas, neurotensina, gastrina, apelina y orexina A, un anticuerpo o fragmentos de anticuerpos. Ejemplos de anticuerpos incluyen, sin limitación, Trastuzumab, Infliximab, Basiliximab, Daclizumab, Adalimumab, Omalizumab, Gemtuzumab, Rituximab, Bevacizumab, Cetuximab, Ofatumumab, Veltuzumab, Ocrelizumab, Panitumumab, Ranibizumab, Ibritumomab, Tiuxetan, Abciximab, Eculizumab, Alemtuzumab, Ozogamicina, Efalizumab, Palivizumab, Natalizumab, Omalizumab y Tocilizumab.”*

Por lo anterior, es evidente que las proteínas (es decir, una enzima, una hormona o un anticuerpo) que se mencionan en la presente solicitud comparten la característica de incluir dentro de su estructura uno o más residuos de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal, de manera que las reivindicaciones se encuentran total y debidamente soportadas en la descripción, a pesar de que los ensayos se hubieran hecho en un solo ejemplo como lo es rituximab.

Además, la **GUÍA PARA EXAMEN DE SOLICITUDES DE PATENTE DE INVENCION Y MODELO DE UTILIDAD** de su despacho indica que:

*“Un sólo ejemplo o un número razonable de ejemplos, modos de realización alternativos o variaciones que habilitan a la persona del oficio normalmente versada en la materia para que, junto con sus conocimientos generales, pueda poner en práctica la invención en toda el área reivindicada y no sólo algunas especies particulares reivindicadas, sin que requiera de un esfuerzo inventivo. En tal caso, la presentación de ejemplos relativos a todas las especies particulares de la invención no será condición necesaria para la suficiencia, siempre y cuando dichas especies se mencionen en la descripción.”.*

De manera que, con base en los argumentos proporcionados anteriormente, es claro que los ejemplos 1 – 5 presentados en la presente solicitud son suficientes para que una persona versada en la materia pueda poner en práctica la invención en toda el área reclamada, es decir, en las proteínas tal como se divulgan y, por lo tanto, no se requiere la presentación de ejemplos de todas las especies (todas las proteínas o todos los anticuerpos), puesto que un versado en la materia seleccionaría las proteínas que cumplen con la característica de poseer uno o más residuos de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal para realizarles el proceso de purificación tal como indica la presente solicitud.

Por otra parte, me permito señalar que la reivindicación 4 es nueva y presenta una modalidad correspondiente a las condiciones de incubación de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 3, adición al pliego reivindicatorio que se encuentra totalmente soportado en la descripción (página 17, líneas 3 - 6), como sigue:

*“Períodos de tiempo adecuados para la conversión de los residuos de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal en ácido piroglutámico están en el intervalo de 4 a 120 horas, tal como de 12 a 96 horas, tal como de 24 a 72 horas, por ejemplo, de 8 a 48 horas.”.*

Respecto a la objeción sobre las reivindicaciones 5, 6 y 9 – 11, me permito indicar que el término ciclación se ha cambiado a “conversión” en la reivindicación 1, de manera que es completamente claro que la conversión de la que se habla en las nuevas reivindicaciones 5, 7 y 8 corresponde a la conversión de la glutamina y/o ácido glutámico N-terminal de dicho anticuerpo a ácido piroglutámico N-terminal (como se menciona en la reivindicación 1). Adicionalmente, me permito señalar que el uso del término conversión es totalmente claro en vista de la descripción de la presente solicitud y del conocimiento general en el campo técnico, puesto que un versado en la materia sabría que la glutamina y/o el ácido glutámico N-terminal se convierten por ciclación produciendo el ácido piroglutámico N-terminal.

Ahora bien, de manera respetuosa me permito expresar nuestro desacuerdo con la objeción sobre los términos “medios celulares” y “tampón”, puesto que éstos corresponden a generalizaciones adecuadas de la modalidad específica que se reclama en la nueva reivindicación 5 (antes reivindicación 6). Como un versado en la materia sabría, existen diferentes condiciones para la producción de las proteínas y aún más, sabría que existen diferentes condiciones que conducen a la conversión óptima de los residuos sin resultar en degradación o modificaciones postraduccionales no deseadas.

Sumado a lo anterior, la nueva reivindicación 5 es dependiente de las reivindicaciones 1 – 4, de manera que un versado en la materia podría entender que los medios celulares y tampones adecuados para llevar a cabo la purificación de la proteína y, en específico la conversión de los residuos nombrados anteriormente, deben cumplir las condiciones que se establecen en la reivindicación 1, es decir, temperatura de 20 – 45°C con un pH en el rango de 3.5 – 9.0.

Además, la presente descripción indica que un tampón puede ser: *“tampón fosfato, un tampón Tris-HCl o un tampón de carbonato amónico”* (página 17, líneas 18 – 19) y que, los *“medios adecuados particulares para la conversión no enzimática de los residuos de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal en ácido piroglutámico son medios que comprenden una concentración de tampón de 5 a 150 mM, tal como de 10 a 125 mM, tal como de 25 a 100 mM. El tampón también puede contener una sal, tal como NaCl, que tiene una concentración en el intervalo de 5 a 150 mM, tal como de 10 a 125 mM, tal como de 25 a 100 mM, tal como de 50 to 85 mM”* (página 18, líneas 1 – 6).

Asimismo, me permito recordar que no es necesario que las reivindicaciones reclamen las características del procedimiento tal cual se presenta en los ejemplos, puesto que éstos, como se indicó anteriormente, sirven tan solo para guiar al versado en la materia en la realización del procedimiento, por lo que la materia no debería restringirse, siempre y cuando, la reivindicación presente una generalización adecuada de esta, caso que ocurre con la presente solicitud.

Por otra parte, es evidente que, por medio de esta solicitud, se reclama un procedimiento que permite obtener una proteína con ácido piroglutámico N-terminal durante la purificación y no posterior a esta, por medio del establecimiento de condiciones específicas, como las incluidas en la reivindicación 1, además, un versado en la materia estaría en la capacidad de reproducir las demás etapas del procedimiento, dado que éstas son ampliamente conocidas en el arte.

Ahora bien, respecto a la anterior reivindicación 9, me permito señalar que su contenido ha sido incluido en la nueva reivindicación 1 y, en este sentido, de manera respetuosa disiento de la objeción sobre esta, puesto que el porcentaje de conversión es una característica esencial de los hallazgos encontrados con la presente invención, puesto que ningún otro procedimiento del arte previo había logrado un porcentaje de ácido piroglutámico N-terminal en las proporciones que aquí se reclaman.

Sin embargo, si pese a los presentes argumentos el examinador considera que dicha característica se trata de un resultado a alcanzar, la GUÍA PARA EXAMEN DE SOLICITUDES DE PATENTE DE INVENCION Y MODELO DE UTILIDAD de su despacho indica que el resultado a alcanzar puede aparecer en la reivindicación, pero siempre acompañando las características técnicas que definen la invención, razón por la que evidentemente dicha característica se puede incluir en la reivindicación 1, puesto que en esta reivindicación se incluyen todas las características técnicas esenciales del procedimiento mediante el cual se puede obtener dicho porcentaje de ácido piroglutámico N-terminal.

Por otra parte, me permito señalar que el término “a/ menos” fue eliminado del pliego reivindicatorio y se incluyó un rango específico equivalente a un porcentaje de conversión del 50 – 100%, de manera que, dicha modificación resuelve la objeción por falta de claridad.

Ahora, respetuosamente me permito expresar nuestro desacuerdo respecto a la objeción sobre la anterior reivindicación 10 (ahora reivindicación 7), puesto que la indicación de que la conversión es no enzimática es completamente clara para un versado en la materia, puesto que (i) es evidente que dicha aclaración se refiere a un disclaimer o limitación negativa y (ii) la descripción (página 16, líneas 23 – 24) define una conversión no enzimática como sigue:

*“En general, la conversión no enzimática tiene lugar a temperaturas elevadas, durante períodos de tiempo adecuados y también las variaciones de pH pueden contribuir a la conversión”.*

De acuerdo a lo anterior, un versado en la materia estaría en la capacidad de entender que las condiciones que se definieron en las reivindicaciones 1 – 6, es decir, las reivindicaciones de las cuales depende la nueva reivindicación 7, corresponden a las condiciones para dicha conversión no enzimática, por lo que, es completamente clara la manera en que se lleva a cabo y es posible comprender el alcance de la materia reclamada.

Por otra parte, respetuosamente me permito expresar nuestro desacuerdo con la objeción sobre la anterior reivindicación 12 (ahora incluida en la reivindicación 1), puesto que sí se establece un orden en el que se llevan a cabo las etapas en el procedimiento de purificación y un versado en la materia, basado en la divulgación de la presente solicitud y de su conocimiento general en el área técnica, podría entender dicho orden.

También, respetuosamente me permito disentir de la objeción por el uso del término “resina adecuada”, puesto que éste puede ser fácilmente entendido por una persona versada en la materia en el contexto de la presente invención. Teniendo en cuenta los argumentos hasta aquí expuestos, un versado en la materia sabría que la variedad de proteínas que pueden ser purificadas mediante el presente procedimiento haría que la resina para las cromatografías pudiera ser diferente, de manera que el uso del término “una resina adecuada” es completamente claro y entendible con base en esto. Adicionalmente, la presente descripción (página 20, líneas 17 – 24) indica cuáles podrían ser unos ejemplos de resinas mediante las cuales puede llevarse a cabo la cromatografía, como se indica a continuación:

*“Sin embargo, un medio o filtro, resina con proteína A incluye, pero sin limitarse a, MabSelect™ Sure de GE Healthcare y ProSep Ultra Plus™ de Millipore. Un ejemplo no limitativo de una columna adecuada empaquetada con MabSelect™ que se puede usar para purificaciones más extensas puede ser, por ejemplo, una columna de 20 cm x 21 cm, cuyo volumen de lecho es de aproximadamente 6,6 L. Independientemente de la columna, la columna se puede empaquetar usando una resina adecuada tal como MabSelect™ o ProSep Ultra Plus™.”*

Por las razones anteriormente expuestas, es evidente que un versado en la materia estaría en la capacidad de seleccionar la resina que más se ajuste a cada procedimiento de purificación dependiendo el tipo de proteína y en específico, de su carga.

Ahora bien, respetuosamente me permito disentir de la objeción sobre la anterior reivindicación 13 (ahora reivindicación 9), puesto que, contrario a la afirmación del examinador, las características de cada etapa del proceso son bien conocidas para un versado en la materia. Adicionalmente, puede observarse que la nueva reivindicación 9 es dependiente de las reivindicaciones 1 – 8, en las cuales se definen las etapas del método, y esta corresponde a una modalidad específica de dicho procedimiento. Como se explicó

anteriormente, un versado en la materia estaría en la capacidad de seleccionar la resina para llevar a cabo las cromatografías dependiendo del tipo de proteína a purificar, las condiciones del método de inactivación vírica, cómo se lleva a cabo la conversión en ácido piroglutámico y las filtraciones finales por las cuales se completa el proceso de purificación.

Además, de manera respetuosa también me permito expresar nuestro desacuerdo con la objeción sobre la anterior reivindicación 14 (ahora reivindicación 10), puesto que el término “enfriamiento pasivo” es completamente claro para un versado en la materia en vista de su conocimiento general en la materia y de la descripción de la presente solicitud (página 23, líneas 2 – 5) que indica:

*“un proceso de enfriamiento pasivo, es decir, uno en el que no se usan componentes mecánicos que consuman energía como bombas y ventiladores para disminuir la temperatura.”*

Por lo tanto, una persona del oficio normalmente versada en la materia estaría en la capacidad de seleccionar un método de enfriamiento que no requiera componentes mecánicos para llevar a cabo dicha etapa.

Finalmente, de manera respetuosa me permito disentir de la objeción sobre la anterior reivindicación 15 (ahora reivindicación 11), puesto que dicha reivindicación es concisa, ya que se relaciona un método para preparar una proteína como principio activo para un producto farmacéutico, lo cual, claramente no es una repetición de las reivindicaciones anteriores.

## **Descripción**

La descripción divulga totalmente la invención, de manera que la información presentada permite a una persona versada en la materia reproducir el método reclamado. Específicamente, no tan sólo el ejemplo 5 menciona la etapa de incubación, los demás ejemplos también la nombran de manera implícita, por ejemplo, el ejemplo 4, que indica que “la solución de Rituximab de AEX-FT (D83) se diluyó dos veces con NaCl 50 mM (dando lugar a NaCl ~ 50 mM final – panel superior) o con agua para inyectables (AI) (dando lugar a NaCl ~ 25 mM final – panel inferior) y se mezcló con fosfato sódico de una solución stock concentrada para preparar una solución final de 30, 60 ó 90 mM, que se ajustó hasta pH 6,2 o pH 5,8 con ácido acético. Estas soluciones se incubaron durante 2 días a 37 °C”.

El anterior ejemplo también concluye que “los resultados mostraron (Figura 5) que después de 2 días de incubación a 37 °C, una concentración más alta de fosfato daba lugar a una reducción ligeramente mayor en los post-picos y a un mayor aumento del pico principal. De modo similar, un pH 6,2 promovía una conversión ligeramente mejor que el pH 5,8. No se observaron diferencias aparentes entre usar NaCl 25 o 50 mM. (...) Estos resultados confirmaron las observaciones previas obtenidas en el modelo estático más pequeño, salvo que la cinética de conversión era ligeramente más rápida con fosfato 90 mM en el modelo de matraz agitado.”.

De manera que, un versado en la materia podría entender cuáles son las condiciones por las cuales se obtiene una conversión más rápida y en mayor proporción, de acuerdo a los resultados mostrados en los ejemplos, en particular en el ejemplo 4. Por lo que, cuando en el ejemplo 5 se indica “incubar” de manera general, como señala el examinador, un versado en la materia, con base en los anteriores ejemplos, sabría las condiciones para llevar a cabo dicha etapa.

Adicionalmente, el ejemplo 4 concluye que “*como se puede ver en la Tabla 1, las fracciones combinadas 1 a 6 corresponden al 96% de la proteína totalmente eluida, es decir, Rituximab y el % de pre-pico, pico principal y post-picos (16,3; 63,0; 20,7) son bastante similares a la preparación de Rituximab comercializada (20,2; 66,5; 13,4). En otras palabras, la composición de isoformas de Rituximab de las fracciones combinadas 1 a 6 recuerda mucho a la preparación de Rituximab comercializada.*”, encontrando que al llevar el proceso hecho a pequeña escala (como se observa en los ejemplos 1 – 4) a grande escala, el anticuerpo mantiene su esencia base, es decir, asemejarse a la preparación comercial, pero en este caso, con mayor homogeneidad.

Por lo anterior, es evidente que la descripción de la presente solicitud sí divulga de manera suficientemente completa el procedimiento de la presente invención, de manera que un versado en la materia está en la capacidad de reproducirlo.

Por otra parte, se anexa la figura 5 con el fin de mejorar la calidad de la figura presentada anteriormente.

### **Novedad**

De manera respetuosa, me permito expresar nuestro desacuerdo con la objeción relacionada con la falta de novedad en la presente invención, puesto que las características del procedimiento que se divulga en esta no han sido reveladas por ningún documento del arte previo, como se explica a continuación.

Primero, consideramos que se debe tener en cuenta que el documento **D1** se relaciona con una investigación sobre la formación de ácido piroglutámico de residuos de ácido glutámico N-terminal en anticuerpos monoclonales recombinantes, adicionalmente, dicho documento divulga experimentos sobre la detección de la formación de ácido piroglutámico y el efecto de la temperatura, pH y el tiempo de la formación de dicho ácido, los anticuerpos monoclonales recombinantes utilizados en los experimentos se expresaron en células de hámster chino y fueron purificadas utilizando procesos de manufactura estándares. Sin embargo y, a diferencia del procedimiento que aquí se reclama, todos los experimentos en el documento D1 fueron llevados a cabo en anticuerpos purificados. Por lo tanto, la formación de piroglutamato toma lugar después de la purificación del anticuerpo y no durante el proceso de purificación. De acuerdo a esto, el presente pliego reivindicatorio **es nuevo** en vista del documento D1, teniendo en cuenta que el documento D1 no divulga o sugiere un método para la purificación de un anticuerpo que comprende una etapa de incubación de un anticuerpo bajo condiciones que promuevan la conversión de glutamina N-terminal y/o ácido glutámico de un anticuerpo a ácido piroglutámico N-terminal.

Por otra parte, el documento **D2** trata del desarrollo de técnicas para investigar la formación de piroglutamilo N-terminal de anticuerpos monoclonales y así poder entender los efectos de las condiciones de formulación en la formación de N-piroglutamilo. El documento D2 concluye que, bajo las condiciones evaluadas, la formación de piroglutamilo es un proceso muy lento. Por ejemplo, composiciones tampones, excipientes y surfactantes fueron estudiadas para investigar el posible impacto en la formación de pGlu (figuras 7 y 8). Los experimentos fueron llevados a cabo por 3 meses y en ningún caso la formación de N-piroglutamilo alcanzó el 50%.

Por lo tanto, El documento D2 no lleva a la conversión del 50 – 100% después de una etapa de conversión por 4 – 120 horas básicamente porque las condiciones no son las mismas como se presentan en la reivindicación 1 y no se llevan a cabo durante el proceso de purificación. En contraste con la presente invención, el documento D2 enseña

*“(...) La ciclización de Glu podría ocurrir de manera difícil en condiciones relativamente suaves tal como dentro de cultivo celular y durante los procesos de purificación y desarrollo de la formulación. El anticuerpo monoclonal (mAb) en este estudio mostró cantidades no detectables de pGlu en los materiales a granel después del proceso de purificación. (...)”.*

Además, el anticuerpo utilizado en el documento D2 no mostró formación detectable de piroglutamilo durante la expresión y después de la purificación. La tabla 1 muestra que la incubación a diferentes pH por 3 meses sólo resulta en la formación de un 20% de ácido piroglutámico a pH 5,5 y aproximadamente una formación del 50% a un pH 4,5. Además, la incubación en diferentes composiciones tampón (figuras 7 – 8) afecta ligeramente la formación de ácido piroglutámico, mostrando la mayor tasa de conversión en un tampón que contiene 10mM de histidina.

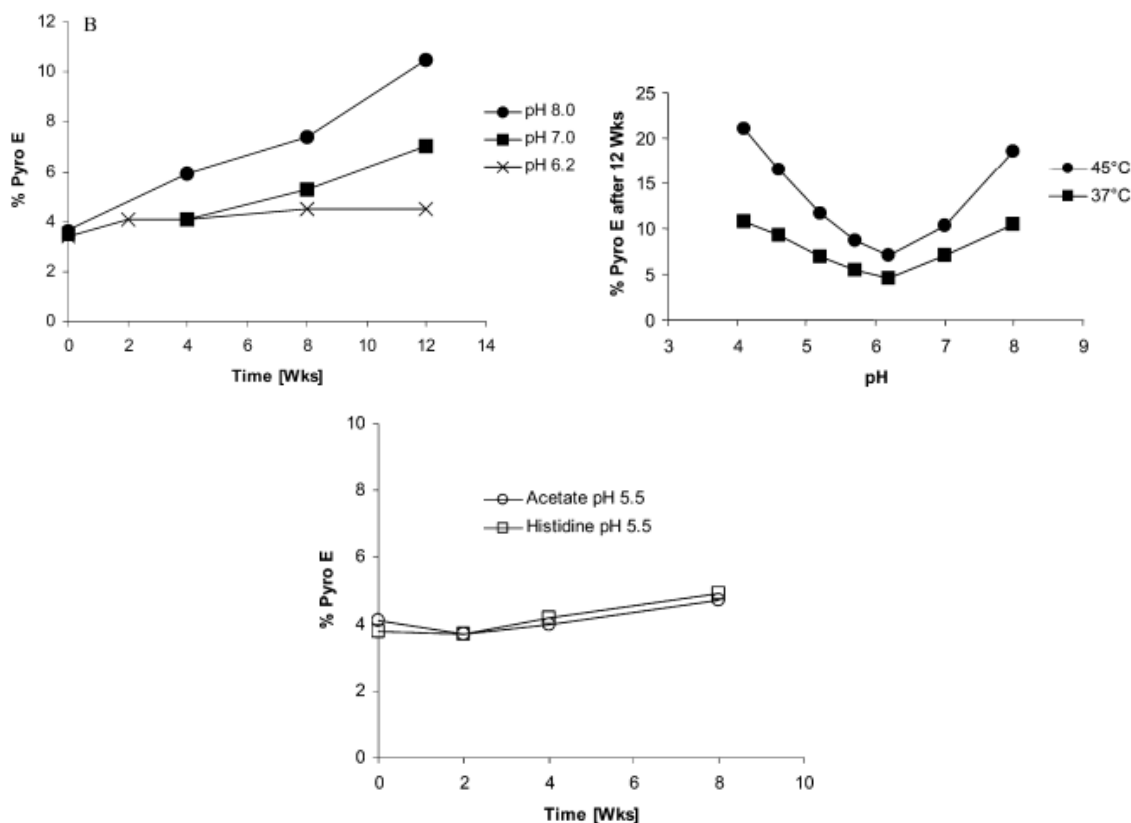
De acuerdo a esto, y, de manera similar que el documento D1, en el documento D2, la formación de piroglutamato lleva lugar después de la purificación del anticuerpo y no durante el proceso de purificación. Por lo tanto, el presente pliego reivindicatorio es novedoso en vista del documento D2, teniendo en cuenta que el documento D2 no divulga o sugiere un método de purificación de un anticuerpo que comprende una etapa de incubación de un anticuerpo bajo condiciones que promuevan la conversión de glutamina N-terminal y/o ácido glutámico de un anticuerpo a ácido piroglutámico N-terminal.

Teniendo en cuenta lo anterior, es evidente que ningún documento del arte previo divulga un proceso mediante el cual la conversión de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal se lleve a cabo **durante** la etapa de purificación de la proteína, sino que, por el contrario, los documentos del arte previo citados indican de manera clara que dicha conversión (o ciclación) se lleva a cabo **después** de la etapa de purificación de la proteína, razón por la que el procedimiento que se reclama en la presente solicitud es novedoso en vista del arte previo.

### **Nivel inventivo**

Ahora bien, respetuosamente me permito expresar nuestro total desacuerdo con la objeción relacionada a la falta de nivel inventivo del procedimiento reclamado en la presente solicitud, puesto que, de ninguna manera se habría llegado a este procedimiento con los conocimientos generales o las divulgaciones del arte previo a esta invención, como explicaremos a continuación.

Como se indicó anteriormente, el documento **D1** se relaciona con una investigación sobre la formación de ácido piroglutámico de residuos de ácido glutámico N-terminal en anticuerpos monoclonales recombinantes, adicionalmente, dicho documento divulga experimentos sobre la detección de la formación de ácido piroglutámico y el efecto de la temperatura, pH y el tiempo de la formación de dicho ácido, los anticuerpos monoclonales recombinantes utilizados en los experimentos fueron expresados en células CHO y purificados por procedimientos estándares y que pueden observarse en las figuras 8 – 10, en las que sólo el 4% (por ejemplo en la figura 10) de los anticuerpos obtenidos poseen ácido piroglutámico después de la purificación.



Figuras 8, 9 y 10 del documento D1.

Por otra parte, el efecto de la temperatura en la formación de ácido piroglutámico se muestra en la figura 7.

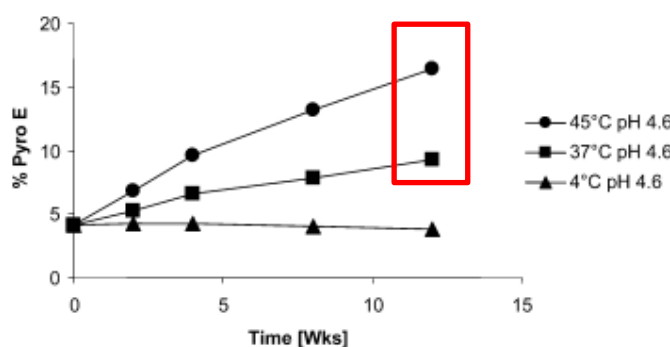


Figura 7 (documento D1)

Los resultados mostrados después de 10 semanas a 4°C indican que no ocurrió formación de ácido piroglutámico. Sin embargo, la incubación por 10 semanas a 37°C y 45°C resultan en un incremento de la formación de ácido piroglutámico de aproximadamente 10% a 15%, respectivamente (como se señala en la figura).

La figura 8, mostrada anteriormente, muestra el efecto del pH y el tiempo en la formación de ácido piroglutámico. Después de la incubación por 12 semanas se observó la formación de 10% o menos de ácido piroglutámico. Se observaron cantidades similarmente bajas de formación de ácido piroglutámico en la figura 10 por la incubación de un anticuerpo en tampones de acetato o histidina en un pH de 5.5.

Por lo tanto, de acuerdo a los resultados mostrados en el documento D1, es claro que **la formación de ácido piroglutámico N-terminal no se da durante las etapas de expresión y purificación**. Además, bajo condiciones ácidas o básicas suaves, típicamente utilizadas durante los estudios de estabilidad farmacéuticos de anticuerpos, la formación de ácido es un proceso muy lento que necesita una gran cantidad de semanas de incubación para que pueda ocurrir.

También, de acuerdo a los anteriores resultados, el documento D1 no produce una tasa de conversión del 50-100% de glutamina N-terminal a ácido piroglutámico, básicamente porque las condiciones no son las mismas que presenta el método reclamado en la reivindicación 1. En particular, porque la conversión no se realiza durante el proceso de purificación.

De acuerdo a esto, el documento D1 por sí solo no divulga información que lleve a que la materia reclamada pueda ser considerada obvia para una persona versada en la materia y no debería ser considerado el arte previo más cercano a la invención que aquí se reclama.

Por otra parte, el documento **D3** se relaciona con anticuerpos monoclonales antiCD20 optimizados que tienen variantes en la región Fc y métodos para su producción. Sin embargo, el documento D3 no describe un método de purificación que comprende una etapa de incubación de un anticuerpo bajo condiciones que promuevan la conversión de la glutamina y/o ácido glutámico N-terminal de dicho anticuerpo a ácido piroglutámico N-terminal, sino que describe, de manera general, un procedimiento para la purificación de proteínas en el cual ni siquiera tiene en cuenta la etapa de incubación. Además, contrario a las sugerencias del examinador, el presente procedimiento no pretende reclamar como novedosa e inventiva la ciclación del residuo de ácido glutámico, sino un procedimiento en el cual dicha ciclación se lleva a cabo durante la purificación, por lo cual no tiene sentido indicar que las aminopeptidasas tienen un efecto reducido por dicha ciclación.

Por su parte, el documento **D4** trata sobre una revisión de las técnicas utilizadas en procesos de manufactura de anticuerpos monoclonales y describe métodos para purificar anticuerpos. Sin embargo, el documento D4 no describe un método de purificación que comprende una etapa de incubación de un anticuerpo bajo condiciones que promuevan la conversión de la glutamina y/o ácido glutámico N-terminal de dicho anticuerpo a ácido piroglutámico N-terminal, sino que divulga el proceso de cromatografía con proteína A, sin mencionar que la inclusión de dicha etapa haría que se obtuviera la ciclación de glutamina o ácido glutámico durante la purificación o que dicha etapa es clave para la ciclación.

Ahora bien, al realizar el análisis por medio del método problema-solución es importante resaltar que el examinador falla en la interpretación de la diferencia del procedimiento reclamado con el procedimiento divulgado en el documento D1, puesto que, específicamente la reivindicación 1 difiere de aquella divulgada en el documento D1, por ejemplo, por las siguientes características:

- El método de purificación de un anticuerpo que comprende una etapa de incubación de dicho anticuerpo bajo condiciones que promuevan la conversión de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal a ácido piroglutámico N-terminal (condiciones definidas en la reivindicación 1);
- La incubación toma lugar por 4 a 120 horas;

- La conversión de glutamina o ácido glutámico N-terminal a ácido piroglutámico alcanza del 50 al 100%.

Nuestra conclusión de que el examinador falla en dicha interpretación se da porque él tan sólo evidencia que la diferencia es el tipo de proteína a ser purificado mediante el procedimiento reclamado y no aprecia las características técnicas que lo hacen diferente del arte previo y que le confieren las propiedades descritas anteriormente.

Debido a la falla en la identificación de las diferencias relevantes entre el procedimiento de la anterior reivindicación 3 (ahora incluido en la reivindicación 1), el examinador también se equivoca en indicar que no existe efecto técnico asociado a las diferencias en los procedimientos y es, en parte, porque evidentemente cambiar de una proteína a otra o especificar el tipo de anticuerpo no tiene ningún resultado esperado. Sin embargo, me permito señalar que el efecto técnico que confieren las 3 diferencias definidas anteriormente es que se puede purificar un anticuerpo teniendo unos niveles incrementados o controlados de piroglutámico N-terminal con el fin de incrementar el rendimiento de los procesos de manufactura y mejorar el problema relacionado con la heterogeneidad en las proteínas.

En vista del documento D1, el problema objetivo a ser resuelto por la presente invención se puede formular así: ¿Cómo proveer un método de purificación nuevo que dé como resultado una reducción en la heterogeneidad de producto reducida o una heterogeneidad deseada y un incremento en el rendimiento de producto?

A manera de ejemplo, se hace referencia a los ejemplos 1 y 5 de la presente invención, los cuales presentan la solución del problema planteado. En los ensayos de estos ejemplos, como se mencionó en los argumentos a favor de la descripción de la presente solicitud, se encontró que, por el uso de una etapa de incubación a 37°C por 28 horas durante el proceso de purificación, el 96% del anticuerpo eluido totalmente, por ejemplo, el rituximab exhibió picos pre, principales y posteriores similares al rituximab comercial disponible. Como resultado, es claro que la tasa de conversión obtenida a partir de los ensayos realizados en la presente solicitud es significativamente diferente del ejemplo donde la cantidad de isoformas de picos posteriores se cuentan por encima del 50% de las isoformas de rituximab.

A diferencia de los experimentos presentados en la presente solicitud, y, como se ha indicado, en el documento 1 sólo aproximadamente el 4% de los anticuerpos obtenidos poseen un ácido piroglutámico después de la expresión y purificación. Además, la formación de ácido piroglutámico bajo diferentes condiciones, por ejemplo, temperatura, pH y tampones fue un proceso lento, tomando 12 semanas para obtener un incremento pequeño en ácido piroglutámico de aproximadamente 6-15%.

Como puede evidenciarse, el procedimiento aquí reclamado no difiere únicamente del documento D1 en la especificación del tipo de anticuerpo a ser purificado, sino que, como se ha argumentado a lo largo de esta respuesta, posee 3 diferencias significativas que lo hacen novedoso e inventivo en vista del documento D1 y los demás documentos del arte previo.

Por lo tanto, consideramos que el método reclamado en la reivindicación 1 es inventivo en vista del documento D1.

Ahora bien, la combinación del documento D3 con el documento D1 no llevaría a la persona versada en la materia a un procedimiento para la purificación de un anticuerpo que comprende una etapa de incubación de dicho anticuerpo bajo condiciones que promuevan la conversión de la glutamina y/o ácido glutámico N-terminal de dicho anticuerpo a ácido piroglutámico N-terminal. Puesto que el documento D3 en ningún caso indica el procedimiento de incubación de los anticuerpos y que la conversión en ácido piroglutámico pueda darse durante la purificación de las proteínas, adicionalmente porque se no encontró ácido piroglutámico (4%) en los resultados ni del documento D1 ni del documento D3 después de la expresión y purificación.

Además, es importante considerar también que la baja tasa de reacción de formación de ácido piroglutámico no motivaría a la persona versada en la materia a incluir una etapa de incubación de un anticuerpo bajo condiciones que promuevan la conversión de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal a ácido piroglutámico N-terminal en un proceso de purificación, puesto que la persona versada en la materia creería que esto incrementaría la degradación y la heterogeneidad del anticuerpo.

Con base en las diferencias y establecimiento del problema indicados anteriormente, la combinación de los documentos D1 y D4 no llevaría a la persona versada en la materia a un procedimiento de purificación de un anticuerpo como lo indica la reivindicación 1 (la cual ahora incluye las etapas de las cromatografías, anteriormente mencionadas en la reivindicación 12) por los mismos argumentos que se indican previamente por la combinación de D1 con D3, puesto que el documento D4 no posee ninguna sugerencia de un método de purificación que comprenda una etapa de incubación de un anticuerpo bajo las condiciones que promuevan la conversión nombrada.

De acuerdo a lo anterior, es evidente que el documento D1 no divulga información que le confiere obiedad a la materia reclamada, de manera que una persona versada en la materia pueda llegar al procedimiento reclamado de manera obvia. El documento D1 no indica ni indicaría solo o en combinación con el documento D3 o D4 cómo llegar al procedimiento aquí reclamado.

Finalmente, teniendo en cuenta los argumentos anteriores, consideramos que es claro que el documento D2 debería ser seleccionado como el arte previo más cercano y el análisis sería el mismo que para el documento D1, puesto que dicho documento menciona claramente que *“La ciclización de Glu podría ocurrir de manera difícil en condiciones relativamente suaves tal como dentro de cultivo celular y durante los procesos de purificación y desarrollo de la formulación. El anticuerpo monoclonal (mAb) en este estudio mostró cantidades no detectables de pGlu en los materiales a granel después del proceso de purificación”* y es el documento que más se aproxima al procedimiento de la presente invención. A partir de dicha indicación, es claro que la reivindicación 1 de la presente solicitud no es obvia y por lo tanto involucra nivel inventivo.

En conclusión, un versado en la materia no tendría ninguna expectativa de aumentar la tasa de conversión de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal en ácido piroglutámico, basado en las divulgaciones de los documentos D1 – D4, por el simple hecho que ninguno divulga las condiciones que aquí se reclaman durante el procedimiento de purificación y porque en el conocimiento general del versado en la materia le indicarían que realizar dicha conversión durante la purificación podría aumentarle la heterogeneidad, resultado que no es para nada esperado en la obtención de proteínas terapéuticas.

En vista de lo anteriormente expuesto, respetuosamente solicito 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.

**Anexos**

- Nuevo pliego reivindicatorio.
- Figura 5.

Atentamente,

**JUAN PABLO CADENA SARMIENTO**

T.P. No. 57.492 del C.S.J.  
C.C. 80.410.337 de Usaquén  
Calle 70 A No. 4 - 41

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la purificación de un anticuerpo que contiene una glutamina N-terminal y/o un ácido glutámico N-terminal, comprendiendo el procedimiento una etapa de incubación de dicho anticuerpo en condiciones que promueven la conversión de la glutamina y/o ácido glutámico N-terminal de dicho anticuerpo a ácido piroglutámico N-terminal en donde el procedimiento para la purificación comprende las etapas de cromatografía con una proteína A con una resina adecuada y una cromatografía de intercambio iónico con una resina adecuada, en donde dicha incubación tiene lugar a una temperatura de 20 – 45°C con un pH en el rango de 3.5 – 9.0 por 4 a 120 horas y en donde la conversión de glutamina y/o ácido glutámico N-terminal a ácido piroglutámico alcanza del 50% al 100%.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el anticuerpo es un anticuerpo anti-CD20.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el anticuerpo anti-CD20 comprende una secuencia de cadena ligera idéntica a la secuencia SEQ ID NO: 1 y una secuencia de cadena pesada idéntica a la secuencia SEQ ID NO: 2.
4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en el que la incubación tiene lugar por 12 a 96 horas.
5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en el que la conversión se lleva a cabo en medios celulares o en un tampón.
6. El procedimiento de la reivindicación 5 en el que la concentración del tampón se selecciona del intervalo de 20 mM a 150 mM.
7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en el que la etapa de conversión comprende la conversión no enzimática de la glutamina y/o el ácido glutámico N-terminal en ácido piroglutámico.
8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7 en el que la proteína tiene de 1 a 4 residuos de glutamina N-terminal y/o de 1 a 4 residuos de ácido glutámico N-terminal antes de la conversión.
9. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en el que el procedimiento comprende las etapas:
  - (a) captura de la proteína A con una resina adecuada,
  - (b) una inactivación viral a un pH en el intervalo de 3,0-4,0,
  - (c) una cromatografía de intercambio aniónico,
  - (d) la conversión de la glutamina y/o ácido glutámico N-terminal de la proteína en ácido piroglutámico,
  - (e) una cromatografía de intercambio catiónico con una resina adecuada y una elución en gradiente para separar las isoformas del producto,
  - (f) una filtración viral y

(g) una ultrafiltración/diafiltración (UF/DF).

10. El procedimiento de la reivindicación 9 que comprende una etapa de enfriamiento pasivo durante 12 a 72 horas después de la etapa (d).
11. Un procedimiento para preparar una proteína que tiene un ácido piroglutámico N-terminal como principio activo farmacéutico para un producto farmacéutico, comprendiendo el procedimiento un procedimiento de purificación de cualquiera de las reivindicaciones 1-10.

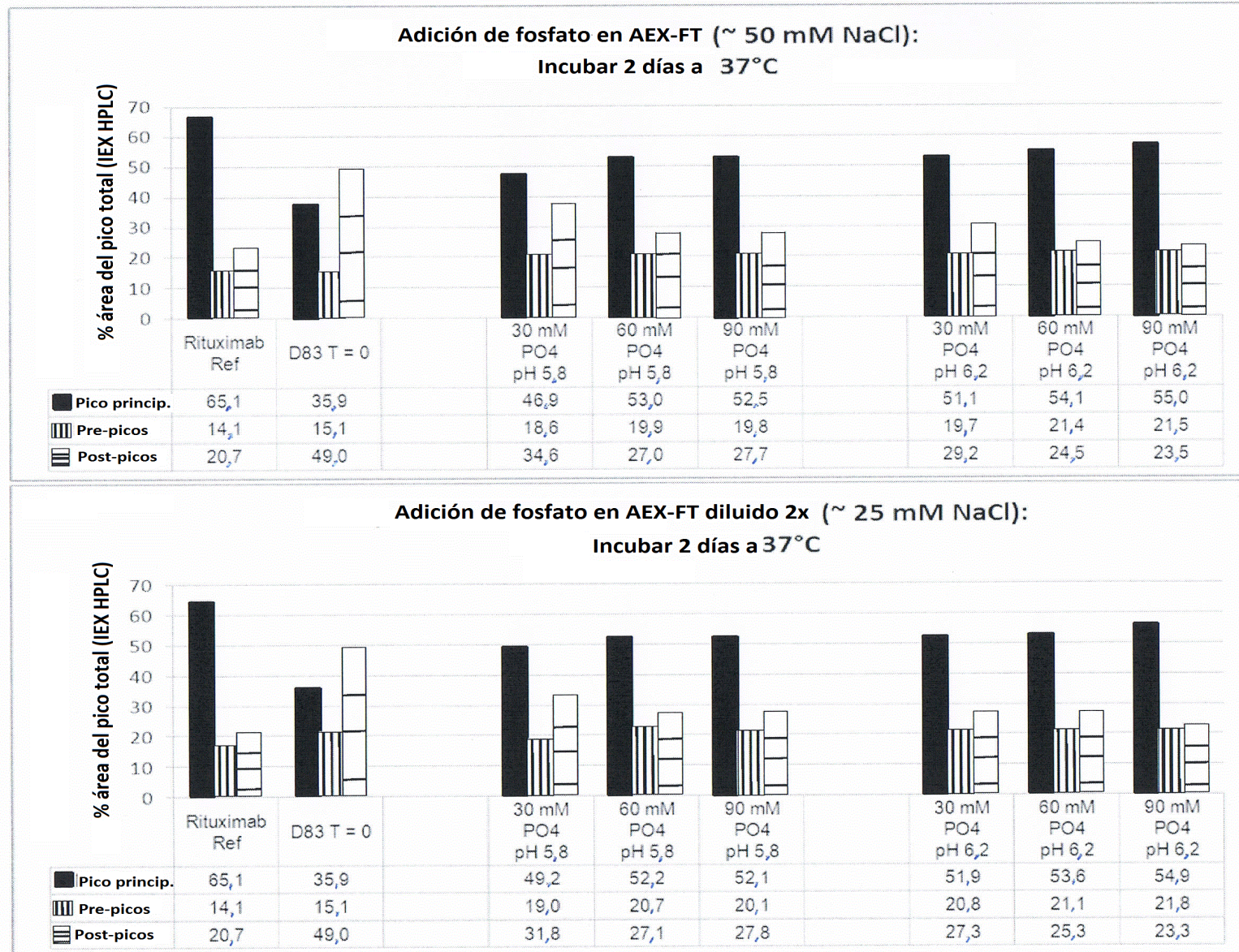


**Figura 5**