

P-2018/14928

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Re: Expediente No. **NC2018/0008178**

Solicitud de patente a nombre de **UNIVERSIDAD DE LOS ANDES**

Yo, CAROLINA DAZA MONTALVO identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la Carrera 11 No. 86-53, obrando como apoderada de la UNIVERSIDAD DE LOS ANDES, domiciliada en Bogotá, Colombia, solicitante de la patente de la referencia, me permito dar alcance a la respuesta presentada el pasado 2 de julio de 2020 al oficio en respuesta al oficio No. 3678 relacionado con los requerimientos de fondo.

1. Resultados experimentales

Por favor tener en cuenta que la reivindicación independiente, se ha modificado así:

Una composición, caracterizada por comprender bacteriófagos encapsulados en liposomas catiónicos; donde dichos liposomas se componen de DC-colesterol, colesterol, polietilenglicol y fosfatidilcolina en una relación de 40:10:3:47 mol

Se desea llamar la atención del Examinador al hecho que los componentes y la relación reclamada en la nueva reivindicación 1 proviene de un proceso de experimentación arduo en el que se encontró que los liposomas que se componen de DC-colesterol, colesterol, polietilenglicol y fosfatidilcolina en una relación de 40:10:3:47 mol, son los que permiten una encapsulación de bacteriófagos óptima. A continuación, se detallan los experimentos que se llevaron a cabo en el laboratorio hasta llegar a la composición óptima que se encuentra descrita en la reivindicación 1 del nuevo pliego reivindicatorio. Vale la pena mencionar que dichos experimentos no fueron incluidos en el documento

original de la solicitud y se presentan aquí con el objetivo de demostrar que NO cualquier composición liposomal es capaz de encapsular bacteriófagos con una alta eficiencia.

Experimento 1

En primera medida, se hace necesario señalar que el documento D2 emplea lípidos catiónicos que permiten el incremento de la fluidez de la membrana para facilitar procesos de fusión relacionados con la entrega de agentes activos sencillos (tales como DNA o RNA) a células blanco. Sin embargo, en nuestro caso la escogencia de la composición se basó en asegurar que el fago pueda permanecer íntegro al interior del liposoma de tal manera que preserve su actividad y también que la composición se mantenga estable en el tiempo.

Experimentos usando diferentes concentraciones de DPPC/CHO/PEG fueron llevados a cabo. La elección de liposomas neutros DPPC/CHO/PEG se basó en que esta combinación tiene una temperatura de transición de fase por encima de los 38°C, la cual es superior a la temperatura corporal humana, y la cual es característica de tejidos con procesos infecciosos en desarrollo. A esta temperatura se espera que la membrana liposomal compuesta por DPPC/CHO/PEG se desestabilizará debido a su transición entre una fase sólida ordenada a líquida desordenada. Durante la transición, el cambio de conformación de los lípidos inducirá defectos en la bicapa que conllevarán a la liberación del bacteriófago en la piel o en diferentes mucosas. Vale la pena resaltar que la desestabilización de la membrana liposomal resultaría óptima para la liberación de bacteriófagos en la piel o en la región extracelular de tejidos infectados.

Los liposomas del documento D2, por el contrario, tienen como objetivo la entrega de agentes biológicos mediante la fusión del liposoma con la membrana de la célula eucariota blanco. Cabe destacar que la fusión en el contexto de liposomas que encapsulan bacteriófagos conllevaría a efectos indeseados que podrían terminar en una entrega inespecífica de los bacteriófagos. La fusión liposoma-liposoma llevaría a la liberación de los fagos antes de llegar al tejido blanco y la fusión liposoma-célula eucariota causaría la liberación de los fagos en tejidos no específicos y, por ende, la no entrega del fago a la bacteria blanco. Por esta razón, en las composiciones testeadas

en nuestros ensayos se buscó que la liberación del fago se diera por desestabilización de la membrana debido a cambios de temperatura.

A partir de la Figura 1 es evidente que los primeros liposomas testeados con la composición DPPC/CHO/PEG fueron inestables a lo largo del tiempo. La estabilidad de los liposomas fue monitoreada usando la sonda fluorescente calceína. Esta sonda tiene una baja emisión de luz mientras está dentro de los liposomas y aumenta proporcionalmente con la cantidad de calceína liberada cuando la membrana liposomal es permeabilizada. La integridad de los liposomas fue evaluada 1, 3 y 16 días post-encapsulación. Como referencia se midió la máxima intensidad que se puede obtener cuando todo el contenido liposomal es liberado por ruptura de la membrana mediante la adición del detergente Tritón-X. De la Figura 1 se puede observar que, tras la adición de tritón, la intensidad de la señal de calceína incrementa 16 veces un día después que los liposomas fueron preparados. No obstante, la intensidad tras la adición del detergente incrementa únicamente 4 veces en el día 16 de encapsulamiento, indicando que la mayoría de los liposomas fueron inestables y permitieron la liberación de calceína antes de realizar la medición.

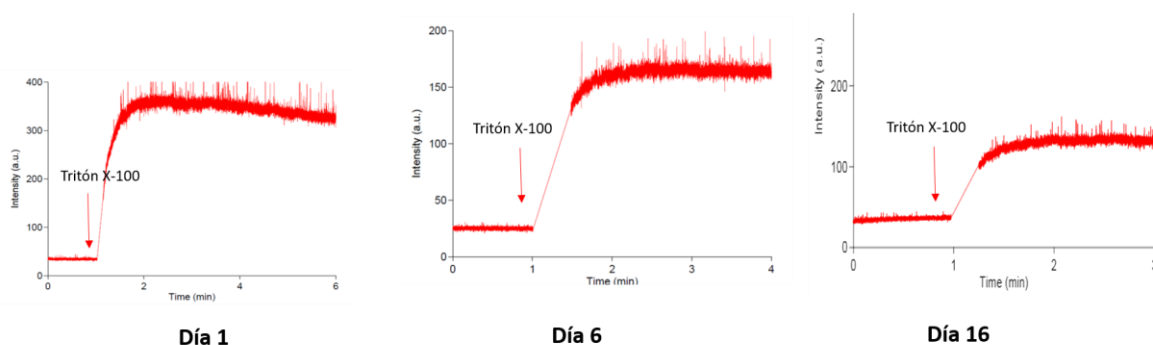


Figura 1. Estabilidad de calceína fluorescente encapsulada en liposomas neutros compuestos de DPPC/CHO/PEG

Experimento 2

Al verificar la encapsulación de bacteriófagos de *P. acnes* dentro de liposomas neutros DPPC/CHO/PEG2000 (DPPC/colesterol/polietilenglicol 2000) mediante microscopia, se confirmó que la tasa de encapsulación fue baja. En la Figura 2A se evidencia la imagen

por contraste diferencial interferencial (DIC) mientras que en la Figura 2B se observan los fagos marcados con la sonda fluorescente DAPI (27 μ M). De la figura es posible evidenciar que la mayoría de fagos no fueron encapsulados (flechas blancas), y los que presentan algún tipo de interacción con liposomas forman agregados de tamaños superiores a 10 μ m. En la Figura 2, las flechas indican los fagos que no fueron encapsulados, los círculos punteados muestran liposomas sin fagos en su interior. Los círculos con borde sólido enseñan agregados de lípido y fagos de tamaño superior a 10 μ m.

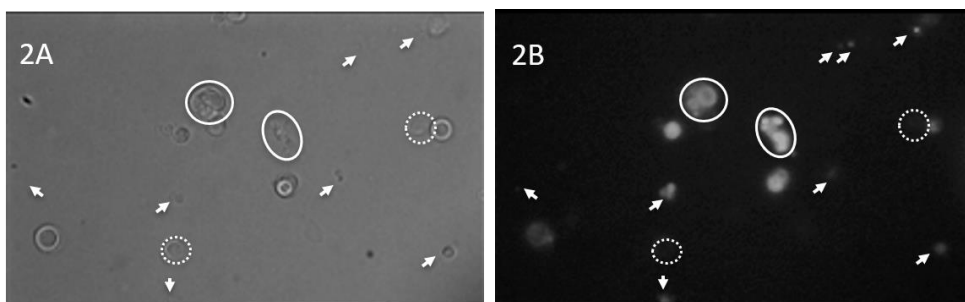


Figura 2. Visualización de encapsulación de bacteriófagos de *P. acnes* dentro de liposomas neutros (DPPC/CHO/PEG2000). (2A) Visualización por contraste diferencial interferencial (DIC), y (2B) fagos marcados con sonda fluorescente DAPI (27 μ M). Fotos tomadas en un microscopio Nikon Ti Eclipse con una magnificación de 40X.

Los resultados obtenidos en los experimentos 1 y 2 permiten concluir que NO cualquier composición liposomal, que pueda llegar a ser deducida a partir del documento D2, resultaría estable en el tiempo, ni permitiría una óptima encapsulación de bacteriófagos.

Experimento 3

Debido a la inestabilidad de la membrana liposomal con la previa composición, se reemplazó la fosfatidilcolina dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) de la composición inicial por dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), un fosfolípido que baja la temperatura de transición de la membrana liposomal hacia alrededor de los -17 grados. Lo anterior implica que a temperaturas de almacenaje del fago (entre 4 y 25 grados) y a la temperatura corporal se mantiene en una fase fluida pero altamente

estable. Además, se incorporó el lípido catiónico DC-CHO (DC-colesterol), el cual puede interactuar electrostáticamente con la cápside del fago la cual tiene una carga neta negativa a pH biológico. En un principio, el lípido catiónico fue incorporado a los liposomas en dos diferentes concentraciones (40 y 60%) para establecer cuál permitía una mayor eficiencia de encapsulamiento. Tal como se evidencia en la Figura 3, concentraciones de 60% de DC-CHO inhibieron la encapsulación de bacteriófagos, obteniendo únicamente un 5% de los fagos encapsulados mientras que concentraciones del 40% de DC-CHO permitieron una encapsulación del 63.75%. Estos resultados indican que únicamente una concentración del 40% de lípido catiónico permite una estabilización de los liposomas y una encapsulación adecuada de los liposomas. El anterior resultado nos permite afirmar que únicamente liposomas compuestos de DC-colesterol, colesterol, polietilenglicol y fosfatidilcolina en una relación de 40:10:3:47 mol permiten una encapsulación de los bacteriófagos, resultado que no resultaría evidente a partir del estado del arte, particularmente del documento D2, ni de ninguna de sus combinaciones.

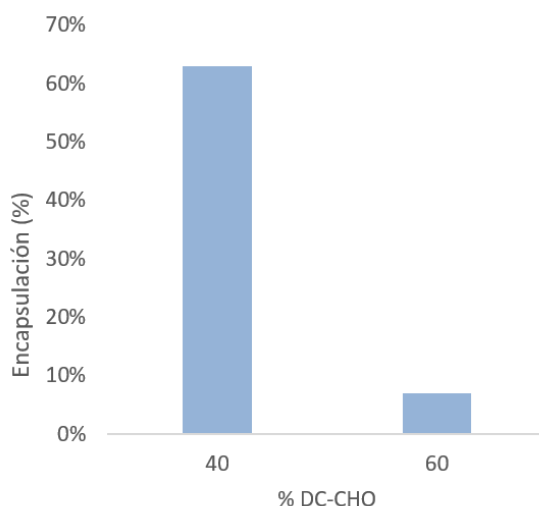


Figura 3. Porcentaje de encapsulación de bacteriófagos de *P. acnes* usando dos diferentes concentraciones del lípido catiónico DC-colesterol.

A partir de los resultados anteriores es posible concluir que, aunque el documento D2 menciona una lista de componentes con los cuales se podrían realizar liposomas, no

resultaría evidente para una persona versada en la materia deducir a partir de dicho documento y sin ninguna experimentación una composición que permita una encapsulación efectiva de bacteriófagos. También, cabe resaltar que es la relación de los componentes en la composición final la que permite una encapsulación adecuada y la que no resultaría obvia a partir de D2, ni de la combinación de D1 y D2.

2. Título

Se reitera que considerando la información contenida en el párrafo [0077], la actual reivindicación 4 y la Figura 4 de la presente solicitud, no se considera apropiado restringir el título de la presente solicitud a fagos que infectan únicamente *Propionibacterium acnes*. Lo anterior debido a que la encapsulación de fagos que infectan otro tipo de bacterias, tales como *Salmonella* sp., también fue ensayada con la composición de liposomas que se enseñan en la reivindicación 1.

Por su parte, considerando las amables recomendaciones del examinador a que el título se puede restringir a "composiciones tópicas", se modifica el título de la presente solicitud así:

COMPOSICIONES TÓPICAS QUE COMPRENDEN BACTERIÓFAGOS QUE SE ENCAPSULAN EN LIPOSOMAS

Se solicita amablemente este nuevo título sea considerado por el Examinador, toda vez que el restringir el título a fagos que infectan *Propionibacterium acnes* es una limitación innecesaria con base en la cobertura de la reivindicación independiente de la presente solicitud y avance que se ha presentado en la investigación.

De esta manera, se han seguido las recomendaciones manifestada por la Examinadora durante la reunión realizada vía Skype el pasado 08 de julio de 2020. Por lo tanto, se solicita atentamente sea tenida en cuenta la información aquí presentada durante el análisis y evaluación de la presente solicitud.

Señor Director,



CAROLINA DAZA MONTALVO

C.C. 66.783.790 de Palmira Valle

TP-141563 CSJ

notificaciones@clarkemodet.com.co