

Doctora

Edna Marcela Ramírez Orozco

Directora de Nuevas Creaciones

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO -SIC-

E.

S.

D.

TOBOS ABOGADOS S.A.S.

Carrera 7C No. 138-19

Oficina 901 Bogotá D.C.

Colombia

NIT 900.367.556-3

Cel: +57 320 3340887

Tel: +57 60 1 309 9955

Tel: +57 60 1 805 1166

www.tobos.com.co

tobos@tobos.com.co

Referencia: Solicitud de patente de invención No. NC2020/0001927

Solicitante: VALNEVA SE

Título: “COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS QUE COMPRENDEN EL VIRUS CHIKUNGUNYA INMUNOGÉNICO CHIKV-DELTA5NSP3 Y PROCESO PARA SU PRODUCCIÓN”

RESPUESTA AL EXAMEN NOTIFICADO POR CORREO ELECTRÓNICO OFICIO No. 13804

ANDREA TOBOS MATEUS, mayor de edad y vecina de Bogotá D.C., identificada como aparece al pie de mi firma, en mi condición de apoderada de la sociedad VALNEVA SE, respetuosamente me dirijo a usted con el fin de dar respuesta al tercer examen de patentabilidad dentro del término legal.

En resumen, el resultado del referido examen de patentabilidad indica que la solicitud no cumple con los requisitos establecidos por la Ley.

Se solicita reconsideración de las objeciones y deficiencias señaladas con base en los siguientes argumentos y modificaciones:

1. Reivindicaciones – Claridad

1.1. La Examinadora indica que las reivindicaciones 3 a 15 no son claras porque mencionan en donde “en donde 30 a 99%” o “caracterizada porque 50 a 99%”, “porque 75% a 99%”, “porque 90% a 99%”, “porque 1% a 50%”, “porque 1% a 25%”, “porque 1% a 10%”, “porque un 1% a 50%”, “porque 5% a 30%”, “porque 10% a 20%”, “de las partículas de CHIKV-Δ5nsP3 presentes en la composición expresan una proteína estructural E2”, lo cual no es claro porque existen muchos rangos o posibilidades de porcentaje para las partículas de virus que expresan la proteína.

1.2. En respuesta a las objeciones planteadas por la Examinadora, la solicitante aclara los rangos de porcentajes respectivos para las partículas CHIKV-Δ5nsP3 de acuerdo a la composición de la proteína (E168K o G55R), de igual forma, con el objetivo de limitar y aclarar la invención, la solicitante elimina las

reivindicaciones 3, 5 a 7, 9 y 11 a 15.

2. Reivindicaciones – Claridad

2.1. La Examinadora informa que las reivindicaciones 7, 8, 9, 13 – 15, 24 y 25 no son claras porque mencionan "mutación reductora de la inmunogenicidad" pero no mencionan cual es la mutación reductora de inmunogenicidad, se sugiere incluir la mutación reductora de la inmunogenicidad. Además, las reivindicaciones 7, 9, 13 no son coherentes en su dependencia de la reivindicación 3 porque mencionan que 1% a 50% de las partículas expresan una proteína E2 que tiene una mutación, pero la reivindicación 3 establece que 30 a 99% de las partículas expresan la proteína E2 de SEQ ID NO: 2 nativa. De manera que máximo 29% de las partículas pueden contener una mutación.

2.2. En respuesta a la objeción planteada por la Examinadora, la solicitante realiza las debidas aclaraciones en el capítulo reivindicatorio, en el cual, se aclara en la expresión "mutación reductora de la inmunogenicidad" la mutación reductora, siendo esta la mutación E168K y/o G55R, la cual reduce la inmunogenicidad con respecto a la secuencia de aminoácidos de la secuencia mencionada. De igual forma, es importante aclarar que luego de las modificaciones realizadas al capítulo reivindicatorio se corrigen los problemas de dependencia objetados por la Examinadora.

3. Reivindicaciones – Claridad

3.1. La Examinadora informa que la reivindicación 26 no es clara porque menciona "en donde tal cantidad efectiva se define como mínimo 10^2 , mínimo 10^3 , mínimo 10^4 , mínimo 10^5 , mínimo 10^6 , preferiblemente mínimo 10^3 partículas de CHIKV- Δ 5nsP3" donde la expresión "mínimo" es imprecisa y no permite definir cuál es el rango de la cantidad de partículas de virus que lleva la composición, definiendo un rango muy amplio del mismo.

3.2. En respuesta a la objeción planteada por la Examinadora, la solicitante procede a limitar la reivindicación 26 (ahora reivindicación 15), donde la cantidad efectiva se define entre un total de 10^3 a 10^5 partículas de CHIKV- Δ 5nsP3.

4. Reivindicaciones – Términos "preferiblemente" y "por ejemplo"

4.1. La Examinadora indica que en las reivindicaciones 13 a 15 y 26, la expresión: "*preferiblemente*" y en las reivindicaciones 17 a 22 la expresión "*por ejemplo*", precediendo una característica no son limitativas, porque hacen opcional la característica y no limitan el alcance de la reivindicación.

4.2. Como se mencionó anteriormente, las reivindicaciones 13 a 15 fueron eliminadas para dar mayor

claridad al capítulo reivindicatorio.

4.3. Por otro lado, la expresión “*preferiblemente*” en la reivindicación 26 se elimina al aclarar los rangos de la cantidad de partículas como se presenta más adelante en la presente respuesta.

4.4. La expresión “por ejemplo” fue eliminada de las reivindicaciones 17 a 22.

5. Reivindicaciones – Proceso

5.1. La Examinadora plantea que la reivindicación 28 no es clara porque hace alusión a un proceso definido por dos etapas, pero no se menciona las condiciones técnicas esenciales del proceso, como las correspondientes al crecimiento de la línea celular con las partículas de virus, ni menciona cual es dicha línea celular, pero debido a que esta es una reivindicación independiente debería incluir todas las condiciones esenciales del proceso. Se sugiere incluir las condiciones técnicas esenciales del proceso de acuerdo con lo divulgado en el capítulo descriptivo. Además, la expresión “*las partículas de CHIKV-Δ5nsP3 se hacen crecer en células hospederas de tal forma que se minimiza la presencia de mutaciones que reducen la inmunogenicidad del virus*” es un resultado a alcanzar que no define el proceso ni las condiciones en que se lleva a cabo.

5.2. En respuesta a la objeción planteada por la Examinadora, la solicitante agrega la siguiente frase con el objetivo de dar mayor claridad a la reivindicación: “*(...) SEQ ID NO:2 y en el que entre el 1 y el 50% de las partículas CHIKV-Δ5nsP3 de la composición expresan una proteína estructural E2 que tiene una mutación E168K y/o G55R que reduce la inmunogenicidad en comparación con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, caracterizado porque comprende (...)*”. Adicionalmente, se aclara en la etapa i) el tipo de células empleadas para el crecimiento de las partículas de virus CHIKV-Δ5nsP3.

5.3. Además, esta reivindicación 28 (ahora reivindicación 17) fue modificada para que ahora reclame que las partículas CHIKV-Δ5nsP3 se hacen pasar un máximo de cuatro veces y no cinco veces como estaba originalmente.

6. Reivindicaciones – Expresión “se usa”

6.1. La Examinadora indica que las reivindicaciones 29 y 30 no son claras porque mencionan que “*se usa un pasaje 2 (P2) del virus CHIKV-Δ5nsP3*” y “*se usa un pasaje 3 (P3) de partículas*”, pero no se entiende si se realizan dos y tres pasajes de las partículas en la etapa ii) del método o a qué se refieren con la expresión “*se usa*”.

6.2. En respuesta a la objeción planteada por la Examinadora, la solicitante procede a eliminar las

reivindicaciones 29 y 30.

7. Reivindicaciones – Resultados a Alcanzar

7.1. La Examinadora plantea que las reivindicaciones 32 y 35 no son claras porque mencionan porcentajes que son resultados a alcanzar; por tanto, no son características del proceso y estos resultados a alcanzar hacen que las reivindicaciones objetadas incluyan no sólo la solución propuesta en la solicitud, sino todas las alternativas presentes o futuras que permitan llegar a ese resultado.

7.2. Las reivindicaciones 32 y 35 (actuales reivindicaciones 19 y 21) no se relacionan con un resultado a alcanzar, sino que muestran una característica funcional de la frecuencia de mutaciones reductoras de la inmunogenicidad. Esta característica proporciona al experto en la materia parámetros adicionales para identificar una composición producida por el método reivindicado utilizando técnicas estándar, por ejemplo, secuenciación. Soporte de este argumento se encuentra en la descripción originalmente presentada página 68, líneas 10 a 12.

7.3. Así mismo, la solicitante desea citar la Guía para Examen de Solicitudes de Patente de Invención y Modelo de Utilidad de la SIC, que menciona lo siguiente con respecto a los resultados a alcanzar:

“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”¹

7.4. Frente a lo anterior, la solicitante considera que tanto la reivindicación 32 (ahora 19) como la 35 (ahora 21), cumplen con los requisitos estipulados por la Guía de Exámenes, por cuanto dichas reivindicaciones dependen de la reivindicación 17, que enumera las características técnicas esenciales (como se discutió anteriormente) de pasar partículas CHIKV-Δ5nsP3 en células Vero para un máximo de 4 veces, y en consecuencia, las reivindicaciones 19 y 21 también incluyen inherentemente estas características técnicas esenciales en virtud de su dependencia de la reivindicación 17.

8. EXAMEN DE PATENTABILIDAD

8.1. La Examinadora informa que después de realizada la búsqueda de anterioridades en este caso, la novedad y el nivel inventivo del objeto de la solicitud se encuentra afectado por lo divulgado en los siguientes documentos:

¹ Guía para Examen de Solicitudes de Patente de Invención y Modelo de Utilidad emitido por la Superintendencia de Industria y Comercio, Delegatura para la Propiedad Industrial, Dirección de Nuevas Creaciones. Año 2014. Página 79.

Ítem	Documento	Título	Fecha de Publicación
D1	Hallengård D., et al. Journal of Virology.	“Novel Attenuated Chikungunya Vaccine Candidates Elicit Protective Immunity in C57BL/6 mice”	Marzo 2014
D2	Gardner C.L., et al. PLOS Neglected Tropical Diseases.	“Deliberate Attenuation of Chikungunya Virus by Adaptation to Heparan Sulfate Dependent Infectivity: A Model for Rational Arboviral Vaccine Design”	20 de febrero de 2014

8.2. NOVEDAD

8.2.1. La Examinadora informa que la materia reclamada en las reivindicaciones 28, 29 a 32, 37, 46 y 48 no es nueva. Adicionalmente, informa que D1 menciona que se realizaron cinco pasajes en las células hospederas encontrando que el virus modificado CHIKV-Δ5nsP3 es genéticamente estable, atenuado, altamente inmunogénico y confiere una respuesta inmune duradera con una sola dosis; por lo tanto, los investigadores consideran que las partículas de dicho virus son óptimas para la generación de una vacuna candidata, la cual sea estable y eficiente para prevenir la enfermedad provocada por el virus Chikungunya (*Abstract* en D1).

8.2.2. Argumentos a favor de la novedad de la Invención

La solicitante da a conocer los siguientes argumentos a favor de la Novedad de la invención:

8.2.2.1. La Examinadora considera que D1 (Hallengard D. et al., marzo 2014) anticipa el objeto de las antiguas reivindicaciones 28-32, 37, 46 y 48. En particular, la Examinadora alega que D1 divulga el pasaje de CHIKV-Δ5nsP3 durante cinco pasajes en células del huésped, y que estos pueden producir una respuesta inmune duradera con una sola dosis.

8.2.2.2. La antigua reivindicación 28 (actual reivindicación 17) ahora recita que la composición fue producida por pasaje en células Vero durante un máximo de cuatro pasajes. Además, la reivindicación 17, ahora modificada, también recita que el proceso es para producir una composición farmacéutica.

Este término "composición farmacéutica" es entendido inmediatamente por un experto en la materia para referirse a una composición adecuada para la administración a un individuo (ver la página 37, líneas 1 a 11 de la presente solicitud presentada en español).

8.2.2.3. La publicación D1 en realidad divulga dos procesos diferentes para producir dos composiciones diferentes que comprenden partículas de CHIKV-Δ5nsP3; la primera composición se produce mediante el rescate de CHIKV-Δ5nsP3 en células BHK-21 y la segunda composición comprende CHIKV-Δ5nsP3 pasadas en células Vero (véase la página 2589, columna 1, párrafos 4 y 5 de D1 copiado a continuación):

MATERIALS AND METHODS

CHIKV and vaccine candidates. Construction of wild-type infectious clone CHIKV LR2006-OPY1, referred to here as CHIKV, has been previously described (28). Five viruses with deletions of different sizes in the hypervariable region of the nsP3 protein (mutants $\Delta 1\text{nsP3}$ to $\Delta 5\text{nsP3}$) were constructed, but only $\Delta 5\text{nsP3}$ viruses, having the largest deletion (amino acid [aa] residues 1656 to 1717 of the P1234 polyprotein were substituted with a linker [aa sequence AYRAAG]), were used in this study. To obtain mutant virus lacking the 6K protein (referred to here as $\Delta 6\text{K}$), the sequence encoding aa residues 749 to 809 of the structural polyprotein was deleted. Plasmids for production of infectious virus stocks were generated by cloning cDNAs of CHIKV or mutant $\Delta 5\text{nsP3}$ or $\Delta 6\text{K}$ under the control of an SP6 RNA polymerase promoter; and CHIKV and the mutants were produced as previously described (30, 31). Plasmid vectors capable of producing infectious viruses were constructed by cloning the cDNAs of the CHIKV, $\Delta 5\text{nsP3}$, or $\Delta 6\text{K}$ strain under the control of the human cytomegalovirus immediate-early promoter in a previously used DNA-launched Semliki Forest virus replicon (DREP) plasmid (32). All resulting clones were verified by sequencing, and their sequences and cloning details are available from us upon request. UV-inactivated CHIKV was prepared by treating CHIKV in a UV cross-linker (600 mJ/cm²) for 5 min. Inactivation was confirmed by examining cytopathic effects on baby hamster kidney (BHK-21) cells.

Stabilities of the $\Delta 5\text{nsP3}$ and $\Delta 6\text{K}$ mutants were subsequently analyzed by serial passage of collected virus stocks five times in Vero cells at a multiplicity of infection (MOI) of 0.1 PFU/cell. For all passages, the stock titers were determined using plaque assay (see the "Viremia" section below) and the stability of introduced deletions was verified using reverse transcription-PCR (RT-PCR) and sequencing.

En otras palabras, el primer proceso fue "como se describió anteriormente" en las referencias 28, 30 y 31 del documento D1. A continuación, se analizó esta composición en células Vero (denominado segundo proceso).

Brevemente, los métodos descritos previamente para el primer proceso son por rescate del CHIKV-delta5nsP3. La referencia 28 (véase Pohjala L et al. 2011, adjunto en el Anexo 03) describe el rescate del virus CHIKV de tipo salvaje en células BHK-21. Las referencias 30 y 31 son trabajos anteriores de un autor de D1 (Liljeström et al. 1991a (Anexo 04), y Liljeström y Garoff, 1991b (Anexo 05)). La referencia 30 también informa del rescate de un virus SFV en células BHK-21 (véase la página 4108, columna 1, "crecimiento y purificación del virus"). Del mismo modo, la referencia 31 informó de un novedoso sistema de expresión de ADN basado en un replicón del virus del bosque de Semliki (SFV), que es útil para producir altos títulos de virus recombinantes en células de mamíferos (resumen). Se produjo un stock de virus de alto título mediante la introducción del vector del SFV y los plásmidos ayudantes en células BHK-21 por electroporación (p. 1361, Métodos experimentales, 2º párrafo). Los autores concluyen en la parte inferior derecha de la p. 1360:

A major advantage of the SFV system is that a high titer recombinant virus stock can be produced by a single (overnight) transfection experiment. There is no need for tedious selection/screening, plaque purification or amplification steps for the production of a recombinant virus stock. This feature of the SFV expression system is espe-

Una población de rescate de virus (también denominada en la técnica "paso cero"; P0) es una

población de partículas virales a la que se llega por transfección de células con ácidos nucleicos replicables. Durante el rescate del virus, las construcciones transfectadas se transcriben dentro de la célula para producir partículas virales nacientes. En otras palabras, las células no se infectan y el virus no se propaga a través del pasaje.

Por lo tanto, las partículas de virus utilizadas en D1 para los estudios inmunológicos (es decir, una composición farmacéutica) **no** se produjeron mediante el pasaje del virus, y ciertamente **no** se produjeron mediante el pasaje en células Vero.

Además, el proceso de "análisis posterior" en células Vero era **sólo** para confirmar la estabilidad de la mutación de delección (véase la página 2859, columna izquierda, penúltimo párrafo de D1). Por lo tanto, en D1 no se revela que el pasaje en células Vero fuera para producir una composición farmacéutica, ni que dicho proceso fuera siquiera adecuado para producir una composición farmacéutica. Como tal, el proceso de la presente reivindicación 17, y las reivindicaciones dependientes de la misma, son novedosas con respecto a D1 al menos por esta razón.

8.2.2.4. Sin embargo, incluso si aún la Examinadora considera que el segundo proceso de D1 produce una composición farmacéutica, el proceso no destruiría la novedad de la presente reivindicación 17. Esto se debe a que D1 revela explícitamente que las partículas de CHIKV-Δ5nsP3 se pasan **cinco** veces en células Vero (véase la página 2589, columna 1, párrafo 5 de D1). Sin embargo, la reivindicación 17 modificada muestra ahora que las partículas CHIKV-Δ5nsP3 se hacen pasar un **máximo de cuatro veces**. Por lo tanto, el proceso de la presente reivindicación 17, y las reivindicaciones dependientes de la misma, también son novedosas con respecto a D1.

8.2.2.5. Adicionalmente, en todo el estado de la técnica citado se enseña que el rendimiento del virus aumenta proporcionalmente al número de pases del virus en las células, independientemente del tipo de célula (véase, por ejemplo, la Figura 1 de D2 (Gardner C.L., et al. febrero 2014)). Sin embargo, D1 enseña que el rendimiento de las partículas del virus CHIKV-Δ5nsP3 es particularmente bajo cuando se cultiva en células Vero durante cinco pasajes (véase la página 2860, columna 1, "Resultados", párrafo 1 de D1). Por lo tanto, si el experto considera que el segundo proceso es adecuado para producir una composición farmacéutica, estaría motivado para aumentar el número de pases del virus CHIKV-Δ5nsP3 en células Vero más allá de los cinco pases enseñados en D1.

Esto es aún más cierto cuando se considera que la Figura 1 de D2 muestra que el cambio de pliegue en el título de CHIKV-LR aumentó sustancialmente entre los pasajes 5 y 10 (reproducido a continuación para su inmediata referencia).

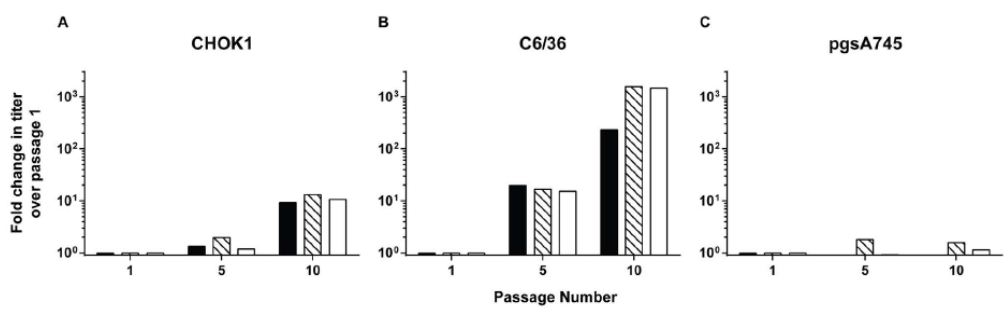


Figure 1. Cell culture passage of CHIKV-LR. CHIKV-LR virus stock was serially passaged 10 times in triplicate parallel series on: A) CHOK1; B) C6/36; or C) pgsA745 cells. After each amplification, the quantity of infectious virions was titered on BHK-21 fibroblasts by standard plaque assay. The fold-increase in titer at passage (P) 5 and P10 were normalized to the titer at P1. Each bar represents one individual passage series.
doi:10.1371/journal.pntd.0002719.g001

Por lo tanto, el experto estaría motivado para hacer pasar el CHIKV-Δ5nsP3 en células Vero durante diez o más pasajes cuando se parte de D1, particularmente cuando se combinan D1 y D2, con el fin de abordar la cuestión del rendimiento enseñado en D1.

No hay ninguna enseñanza en el estado de la técnica que lleve al experto al proceso actualmente reivindicado de hacer pasar el CHIKV-Δ5nsP3 durante un máximo de cuatro pases en células Vero.

8.3. NIVEL INVENTIVO

8.3.1. La Examinadora afirma que la reivindicación independiente 1 carece de nivel inventivo con respecto al documento D1 “Hallengård D., et al. Journal of Virology.” y al documento D2 “Gardner C.L., et al. PLOS Neglected Tropical Diseases.” por los siguientes motivos:

“D1 es considerado como el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 1, ya que divulga una composición que comprende partículas del virus CHIKV-Δ5nsP3 que expresan la proteína estructural E2 (Pág. 2859, Col. Izq.), las cuales fueron diluidas en 2 x 20 μL de buffer fosfato salino (PBS) y posteriormente, se llevó a cabo la fase experimental con ratones hembra C57BL/6 (Pág. 2859, Col. Der.). Los resultados obtenidos demuestran que el virus modificado CHIKV-Δ5nsP3 es genéticamente estable, atenuado, altamente inmunogénico y confiere una respuesta inmune duradera con una sola dosis; por lo tanto, los investigadores consideran que las partículas de dicho virus son óptimas para la generación de una vacuna candidata, la cual sea estable y eficiente para prevenir la enfermedad provocada por el virus Chikungunya (Abstract).

La diferencia entre la invención definida entre la reivindicación 1 y la composición divulgada en D1, consiste en que la composición de la solicitud incluye partículas de CHIKV-Δ5nsP3 que expresan una proteína estructural E2 que tienen al menos una mutación comparada con la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 2 en los aminoácidos 55 o 168.

No hay evidencia de que el incluir específicamente partículas de CHIKV-Δ5nsP3 que expresan una proteína estructural E2 que tienen al menos una mutación en los aminoácidos 55 o 168 comparada con la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 2 proporcione una composición farmacéutica con algún efecto técnico

diferente al que ya proporcionaba el objeto de D1, puesto que una composición que comprende partículas del virus Chikungunya atenuado, genéticamente estable, altamente inmunogénico y que produce una respuesta inmune duradera con una sola dosis, ya había sido previsto en dicho documento.

(...)

Sin embargo, el incluir mutaciones en la proteína estructural E2 del virus Chikungunya para aumentar la capacidad infectiva de las partículas virales, ya está divulgado en D2 que se refiere a un estudio donde se llevaron a cabo sustituciones de aminoácidos que aumentaron la carga positiva neta en ciertas regiones de la proteína estructural E2, encontrando que dichas mutaciones aumentaron la infectividad de las partículas virales, ya que se produce una interacción iónica con las cadenas HS en la superficie celular, las cuales están cargadas negativamente (Pág. 2, Col. Izq., pág. 4, Col. Der. y págs. 5 a 15) pero además se identificaron mutaciones en E2 que aumentan la atenuación sobre mutaciones que disminuyen la inmunogenicidad (Pág. 2, Col. Der). Además, D2 menciona las mutaciones G55R y E168K, las cuales tienden a ocurrir entre el segundo y el tercer pase consecutivo respectivamente (Pág. 4, Col. Der y pág. 5, Tabla 1). Así mismo, el documento menciona que por medio de modelos computacionales es posible predecir las mutaciones predominantes de un solo aminoácido cuando se realizan entre cinco a diez pases del virus, las cuales podrían alterar el perfil electrostático de la proteína E2 y aumentar la carga positiva neta en dos regiones expuestas (Pág. 2, Col. Der).

Adicionalmente, debe mencionarse que la SEQ ID NO: 2 que corresponde a la proteína estructural E2 de del virus Chikungunya está ampliamente reportada en el estado de la técnica teniendo un 100% de porcentaje de identidad y cobertura (Alineamiento 1)

Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1

1: ACZ98835.1	100.00	100.00
2: SEQIDNO2Solicitud	100.00	100.00

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment			
ACZ98835.1	MEFIPTQTTFYNNRYQPRPWTPTSTIQIIRPRPRPQIQAGQLAISAVNKLTMRAVPQQK	60	
SEQIDNO2Solicitud	-----	0	
ACZ98835.1	PRRNRKNKKQKQKQAPQNNITNQKKQPPKKKPAQKKKKPGRRRMCMKIENDCIFEVKHE	120	
SEQIDNO2Solicitud	-----	0	
ACZ98835.1	GKVTGYACLVGDKVMKPAHVKGITIDNADLAKLAFKRSSKYDLECAQIPVHMKSDASKFTH	180	
SEQIDNO2Solicitud	-----	0	
ACZ98835.1	ENPEGYYNMHHGAVQYSGGHFTIPTGAGKPGDSGRPIFDNKGKRWVAIVLGGANEGARTAL	240	
SEQIDNO2Solicitud	-----	0	
ACZ98835.1	SVVTHNKKDIVTKITPEGAEHSLAIPVMCLLANTTFPCSQPPCTPCCYEKEPEETLRMLE	300	
SEQIDNO2Solicitud	-----	0	
ACZ98835.1	DNMVRPGYYQLQASLTCSPHRQRSTKDNFNVYKATRPYLACPDCEGHSCHSPVALE	360	
SEQIDNO2Solicitud	----- --stkdnfnvykatrpylahcpdcgegshschspvale *****	35	
ACZ98835.1	RIRNEATDGLKIQVSLQIGIKTDSDHWTKLRYMDNHMPADAERAGLFVRTSAPCTITG	420	
SEQIDNO2Solicitud	----- rirneatdgtlkiqvsllgiktdsdhwtklrymdnhmpadaeraglfvrtsapctitg *****	95	
ACZ98835.1	TMGHFILARCPKGETLVGFTDSRKISHSCTHPFHDPPIVIGREKFHSRPQHGEKELPCST	480	
SEQIDNO2Solicitud	----- tmghfilarcpkgetltvgftdsrkishscthpfhdpvrigrekfhsrphgkelpcst *****	155	
ACZ98835.1	YVQSTAATTEEIEVHMPPDTPDHTLMSQQSGNVKITVNGQTVRYKCNCGGSNEGLTTTDK	540	
SEQIDNO2Solicitud	----- yvqstaatteeievhmppdpdhtlmsqsgnvkitvngqtvrykncggsgneglitttdk *****	215	
ACZ98835.1	VINNCKVQDQCHAAVTNHKKQVNSPLVPRNAELGDRKGKIHIPFLANVTCRVPKARNPT	600	
SEQIDNO2Solicitud	----- vinnckvdqchaavtnhkkqynsplvprnaelgdrkgkihipflanvtcrvpkarnpt *****	275	
ACZ98835.1	VTYGNQVIMLLYPDHTLLSYRNMGEEPNVQEEVMMHKKVWLTVPTEGLEVTWGNNEP	660	
SEQIDNO2Solicitud	----- vtygnqvimllypdhtllsynrmgeepnvqeevmmhkkevltvpteglevtwgnnep *****	335	
ACZ98835.1	YKYWPQLSTNGTAHGHPEIILYYLYPTMTVVVSVATFILLSMVGMAGMCMCARRR	720	
SEQIDNO2Solicitud	----- ykypqlstngtahghpheiillylyptmtvvvsvatfillsmvmaagmcmcarrr *****	395	
ACZ98835.1	CITPYELTPGATVPFLLSLICCIRTAKAATYQEAATYLVNNEQQPLFNLQALPLAALIL	780	
SEQIDNO2Solicitud	----- citpyeltpgatvpfllslccirtakaatyyqeaatyvlvnnqqplfnlqalplaalil *****	423	
ACZ98835.1	CNCLRLLPCCCKTLAFLAVMSVGAHTVSAYEHVTVIPNITVGVPYKTLVNRPGYSPHVLH	840	
SEQIDNO2Solicitud	-----	423	
ACZ98835.1	ELLSVTLEPTLSLDYITCEYKTVIPSPYVKCCGTAECKDKNLDPYSCKVFTGVYPFMGG	900	
SEQIDNO2Solicitud	-----	423	
ACZ98835.1	AYCFCDAGENTQLSEAHVEKSESCKEFASAYRAHTASASAKLRVLYQGMNITVTAYANGD	960	
SEQIDNO2Solicitud	-----	423	
ACZ98835.1	HAVTVKDAKFIVGPMSSAMTPFDNKIVVYKGDVYMMDYPPFGAGRPGQFGDIQSRTPESK	1020	
SEQIDNO2Solicitud	-----	423	
ACZ98835.1	DVYANTQLVLQRPAAGTVHVVPYSQAPSGFKYMLKERGASLQHTAPFGCQIATNPVRAVNC	1080	
SEQIDNO2Solicitud	-----	423	
ACZ98835.1	AVGNMPSIDIEPEAAFTRVVDAPSLTDMSCCEVPACTHSSDFGGVAIKYAAASKKGKCAVH	1140	
SEQIDNO2Solicitud	-----	423	
ACZ98835.1	SMTNAVITIREAEIEVEGNSQLQISFSTALASAEFRVQVCSTQVHCAAECHPPKDHIVNYP	1200	
SEQIDNO2Solicitud	-----	423	
ACZ98835.1	ASHTTLGVQDISATAMSWQKITGGVGLVVAVALILIVLVCVSFSRH	1248	
SEQIDNO2Solicitud	-----	423	

En consecuencia, la persona normalmente versada en la materia estaría motivada a incluir las mutaciones en la proteína estructural E2 del virus Chikungunya en los aminoácidos 55 y 168 mencionadas en D2 en la composición de D1, para así llegar al objeto de la reivindicación 1. Por lo cual se considera obvia.

Adicionalmente, D1 menciona que la inmunización con la composición generó un título alto de anticuerpos neutralizantes de todos los tipos de inmunoglobulinas, así como, una respuesta alta de las células T CD8, indicando una respuesta inmune fuerte tanto humoral como celular con una sola dosis (Pág. 2861, Col. Der., pág. 2862, Figura 4 y pág. 2864, Col. Izq.); además, se determinó que la cantidad efectiva de virus para evitar la viremia fue 104 UFP, aunque con 105 UFP se produce una viremia baja y, por ende, se

considera que en humanos no causaría eventos adversos durante un estudio clínico (Pág. 2861, Col. Izq. y pág. 2863, Col. Der.). Igualmente, D1 menciona el método para la producción de las partículas virales CHIKV-Δ5nsP3, el cual incluye la delección de aminoácidos en los residuos 1656 a 1717 de la poliproteína P1234 (sustituidos por un enlazador), en la región hipervariable de la proteína nsP3, la construcción de un plásmido vector para la producción de las partículas virales infecciosas y la verificación de la estabilidad de dichas partículas, que consiste en el análisis de cinco pases en serie del virus en células Vero, a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.1 UFP/célula (Pág. 2859, Col. Izq.).

Por otra parte, D2 menciona que las mutaciones realizadas en la proteína estructural E2 presente en las partículas del virus Chikungunya, producen anticuerpos neutralizantes cuando se realiza la inmunización de un sujeto (Pág. 12, Col. Izq. y pág. 13, Figura 9B); y describe el proceso para llevar a cabo dichas mutaciones en la proteína E2 (pág. 3, Col. Izq.).

Las reivindicaciones dependientes 2 a 27 y 53 a 54 no mencionan alguna característica que, junto con las características de la reivindicación independiente, aporte nivel inventivo a la composición de la reivindicación 1, por lo cual se considera que carecen de nivel inventivo.”

8.3.2. De igual forma, la Examinadora afirma que la reivindicación dependiente 33 carece de carácter inventivo con respecto al documento D1 “Hallengård D., et al. Journal of Virology.” y al documento D2 “Gardner C.L., et al. PLOS Neglected Tropical Diseases.” por los siguientes motivos:

“D1 es considerado como el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 33, ya que divulga un proceso para producir una composición que comprende partículas del virus CHIKV-Δ5nsP3 que expresan la proteína estructural E2 (Pág. 2859, Col. Izq.), las cuales fueron diluidas en 2 x 20 μL de buffer fosfato salino (PBS) para llevar a cabo la fase experimental con ratones hembra C57BL/6 (Pág. 2859, Col. Der.). Para la obtención del virus CHIKV-Δ5nsP3 se hizo crecer el mismo en células hospederas incluyendo células Vero (Pág. 2859, Col. Izq.). Los resultados obtenidos demuestran que el virus modificado CHIKV-Δ5nsP3 es genéticamente estable, atenuado, altamente inmunogénico y confiere una respuesta inmune duradera con una sola dosis; por lo tanto, los investigadores consideran que las partículas de dicho virus son óptimas para la generación de una vacuna candidata, la cual sea estable y eficiente para prevenir la enfermedad provocada por el virus Chikungunya (Abstract). Adicionalmente, para evaluar la estabilidad del virus se realizaron 5 pasajes en serie en células Vero a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1 UFP/célula, encontrando estabilidad (Págs. 2 y 3, secciones In vitro passage y 5nsP3 and 6K mutants are stable and attenuated in vitro).

La diferencia entre la invención definida entre la reivindicación 33 y el proceso divulgado en D1, consiste en las mutaciones reductoras de la inmunogenicidad localizadas en la proteína estructural E2 de CHIKV-Δ5nsP3, que se seleccionan a partir de G55R y E168K.

No hay evidencia de que el incluir específicamente mutaciones reductoras de la inmunogenicidad localizadas en la proteína estructural E2, seleccionadas a partir de G55R y E168K, proporcione un proceso con algún efecto técnico diferente al que ya proporcionaba el objeto de D1, puesto que el crecimiento CHIKV-Δ5nsP3 en células hospederas obteniendo CHIKV-Δ5nsP3 genéticamente estable, atenuado, altamente inmunogénico y confiriendo una respuesta inmune duradera con una sola dosis había sido previsto en dicho documento (Abstract, Fig. 1, Págs. 2859 – 2860).

(...)

Sin embargo, la presencia de mutaciones reductoras de la inmunogenicidad localizadas en la proteína estructural E2 de CHIKV-Δ5nsP3, seleccionadas a partir de G55R y E168K, ya está divulgado en D2 que se refiere a un estudio donde se llevaron a cabo sustituciones de aminoácidos que aumentaron la carga positiva neta en ciertas regiones de la proteína estructural E2, encontrando que dichas mutaciones aumentaron la infectividad de las partículas virales, ya que se produce una interacción iónica con las cadenas HS en la superficie celular, las cuales están cargadas negativamente (Pág. 2, Col. Izq., pág. 4, Col. Der. y págs. 5 a 15), pero además se identificaron mutaciones en E2 que aumentan la atenuación sobre mutaciones que disminuyen la inmunogenicidad (Pág. 2, Col. Der). Para esto, CHIKV se hizo crecer en células hospederas incluyendo células Vero en pasajes secuenciales de tal forma de encontrar aquellos donde se minimizaron las mutaciones que reducen la inmunogenicidad del virus (Pág. 12, Col. Der; Pág. 13, Col. Izq. y Pág. 14, Col. Der.). Además, D2 menciona las mutaciones G55R y E168K, las cuales tienden a ocurrir entre el segundo y el tercer pase consecutivo, respectivamente (Pág. 4, Col. Der y pág. 5, Tabla 1). Así mismo, el documento menciona que por medio de modelos computacionales es posible predecir las mutaciones predominantes de un solo aminoácido cuando se realizan entre cinco a diez pases del virus, las cuales podrían alterar el perfil electrostático de la proteína E2 y aumentar la carga positiva neta en dos regiones expuestas (Pág. 2, Col. Der). Mencionando, además, que la acumulación de mutaciones en la proteína E2 para diferentes virus a lo largo de los pasajes ha sido descrita ampliamente en previos trabajos y que el interés de sustituciones de aminoácidos que aumenten la carga positiva neta en ciertas regiones de E2 es porque estas pueden incrementar drásticamente la infectividad de las partículas en las células cultivadas (Pág. 2, Col. Izq).

En consecuencia, la persona normalmente versada en la materia estaría motivada a realizar un número máximo de 3 o 2 pasajes para reducir la presencia de mutaciones G55R y E168K que reducen la inmunogenicidad como lo sugiere D2 en el proceso de producción de la composición de D1, para así llegar al objeto de la reivindicación 33.

Por lo cual se considera obvia. Las reivindicaciones dependientes 34 a 36, 38 a 45, 47 y 49 a 52 no mencionan alguna característica que, junto con las características de la reivindicación independiente, aporte nivel inventivo al proceso de la reivindicación 33, por lo cual se considera que carecen de nivel inventivo.”

8.3.3. Argumentos a favor del nivel inventivo de la Invención

8.3.3.1. La Examinadora considera que D1 divulga una composición que comprende partículas de CHIKV- Δ 5nsP3 cultivadas en células Vero durante cinco pasajes. La Examinadora alega que las mutaciones de E2 del CHIKV se conocen a partir de D2 (Gardner et al., febrero 2014), que divulga mutaciones que aumentaron la infectividad de las partículas virales (ver D2 página 2, columna izquierda, página 4, columna derecha). La Examinadora también alega que D2 menciona las mutaciones G55R y E168K, y que estas tienden a ocurrir entre el segundo y el tercer pasaje (haciendo referencia a la Tabla 1 de D2). Por lo tanto, la Examinadora alega que el experto estaría motivado para incluir las mutaciones en la proteína E2 en las posiciones 55 y 168 cuando se parte de D1 y D2.

La reivindicación modificada 1, y las reivindicaciones dependientes de la misma son inventivas por las razones que se exponen a continuación:

8.3.3.2. En primer lugar, es incorrecto argumentar que no hay evidencia de que proporcionar partículas CHIKV- Δ 5nsP3 con al menos una de las mutaciones G55R o E168K tenga un efecto técnico sobre la composición de D1. D1 divulga que las partículas de virus CHIKV- Δ 5nsP3 fueron pasadas en células Vero cinco veces (página 2859, columna 1, párrafo 4 de D1). Sin embargo, como se divulga en la presente solicitud, el pasaje de CHIKV- Δ 5nsP3 cinco o más veces en células Vero da lugar a altos niveles de heterogeneidad de la secuencia (es decir, mutaciones de G55R y E168K), que se correlacionan con una caída de la inmunogenicidad (véase la página 12, líneas 13 a 21, y la página 22, líneas 4 a 11 de la solicitud PCT tal como se presentó). De hecho, la presente solicitud demuestra que una composición de CHIKV- Δ 5nsP3 pasada en células Vero cinco veces (es decir, P5B-07) tenía el 100% de las partículas que comprendían la mutación E168K, mientras que una composición de partículas CHIKV- Δ 5nsP3 pasada en células Vero tres veces sólo tenía el 20% con mutantes E168K (véase la página 14, líneas 14 a 18, la Figura 10, y la página 68, líneas 6 a 10 de la solicitud PCT en español tal como se presentó). Por lo tanto, la segunda composición de D1 contendría alrededor del 100% de las partículas CHIKV- Δ 5nsP3 con las mutaciones G55R y E168K. Por esta razón, la composición de la reivindicación 1 modificada, que comprende sólo un 1-50% de partículas con la mutación G55R y E168K, tiene el efecto técnico de ser más inmunogénica que la composición 2 de D1. Por lo tanto, la composición actualmente reivindicada es inventiva respecto a la segunda composición de D1.

8.3.3.3. Por otro lado, D2 enseña el pasaje de CHIKV-LR en CHOK1 (células de ovario de hámster chino), pgsA745 (células de ovario de hámster chino mutantes), y células C6/36 (derivadas de mosquitos *Aedes albopictus*) (ver página 2 - columna 2, "materiales y métodos, "pasaje in vitro" de D2). La única referencia a las células Vero en D2 es cuando se calculan los niveles de infección (véase la página 7, columna 2, "Las mutaciones E2 de carga positiva tienden a aumentar la infectividad específica de las partículas del virus y la infectividad dependía de las interacciones iónicas in vitro", párrafo 1 de D2). Como tal, D2 no revela

ninguna mutación que pueda ocurrir al pasar el virus CHIKV-Δ5nsP3 atenuado en células Vero. Sin embargo, como se enseña en D2, las mutaciones son específicas de la célula y de la cepa (página 13, columna 2, párrafo 1 y Tabla 1 de D2). Por lo tanto, el experto no consideraría que las enseñanzas de D2 son aplicables a las células Vero, ni a CHIKV-Δ5nsP3.

8.3.3.4. Sin embargo, incluso si la persona capacitada fuera en contra de esta enseñanza para considerar que las enseñanzas de D2 se aplican a una cepa diferente (es decir, CHIKV-Δ5nsP3) y a un tipo de célula (células Vero), seguiría sin considerar G55R y/o E168K.

8.3.3.5. La solicitante no está de acuerdo con la Examinadora cuando afirma que la Tabla 1 de D2 enseña que las mutaciones G55R y E168K se producen entre el segundo y el tercer pasaje. Para aclarar, D2 enseña (página 4, columna 2, párrafo 1 de D2):

"Una sustitución E2-55 G a R se produjo en dos de cada cinco frecuencias en la serie del segundo pasaje en células CHOK1, mientras que la combinación de E2-99 H t Y/E2-168 E a K estuvo presente en dos de cada seis de la población de la serie del tercer pasaje".

Sin embargo, los términos segunda o tercera "serie de pases" no se refieren al número de pases o pasajes. La segunda o tercera "serie de pases" se refiere a cuál de los experimentos paralelos por triplicado se está analizando (véase, por ejemplo, la página 4, columna 1, "Resultados", párrafo 1 de D1).

Esto está respaldado por la leyenda de la Tabla 1 de D2, que indica explícitamente:

Table 1. Mutations identified in the E2 glycoprotein at passage 5 and 10 after cell culture adaptation of CHIKV-LR.

Además, la Tabla 1 de D2 (reproducida a continuación) muestra que la sustitución G55R (recuadro azul en la Tabla 1) y la sustitución E168K (recuadro verde en la Tabla 1) no se detectaron en CHIKV-LR pasados en ninguno de los tres tipos de células probadas durante cinco pasajes. De hecho, las sustituciones G55R y E168K sólo se detectaron al hacer pasar el CHIKV-LR en uno de los tres tipos de células probadas (células CHOK1) y al hacerlo durante diez pases (recuadro rojo en la Tabla 1). Incluso entonces, las mutaciones G55R y E168K sólo estaban presentes en una de las veinticuatro condiciones probadas que se muestran en la Tabla 1 de D2. Además, el texto de la Tabla 1 de D1 enseña explícitamente que estos dos casos de mutaciones "sólo se identificaron en virus individuales y no en la población mayoritaria del cultivo". Por lo tanto, el experto no podría haber considerado a partir de la Tabla 1 de D2 que E168K o G55R pueden aparecer antes del pasaje 10, y mucho menos que estas mutaciones puedan tener alguna consecuencia.

De hecho, la mayoría de las posiciones probadas en D2 (excepto la posición 79) no mostraron

mutaciones consistentes cuando el virus se pasó 5-10 veces. Por lo tanto, la persona capacitada, al considerar D1 y D2 en combinación, no consideraría la presencia de mutaciones al hacer pasar los virus CHIKV en las células durante menos de diez pases. Más concretamente, la persona experta no podría haber estado motivada para probar la mutación G55R o E168K basándose en D2 porque no se enseña que estas mutaciones estén presentes en el pasaje 10.

Table 1. Mutations identified in the E2 glycoprotein at passage 5 and 10 after cell culture adaptation of CHIKV-LR.

Virus	E2 amino acid position							
	55	79	82	99	159	166	168	264
WT-LR	G	E	G	H	S	E	E	V
CHOK1 5.1	G	E	G	H	R	E	E	V
CHOK1 5.2	G	E	G	H	R	E	E	V
CHOK1 5.3	G	E	G	H	R	E	E	V
CHOK1 10.1	G	E	G	H	R	E	E	V
CHOK1 10.2	G	E	G	H	R	E	E	V
CHOK1 10.2a	R	E	G	H	S	E	E	V
CHOK1 10.3	G	K	G	H	S	E	E	V
CHOK1 10.3a	G	E	G	Y	S	E	K	V
C6/36 5.1	G	K	G	H	S	E	E	V
C6/36 5.2	G	K	G	H	S	E	E	V
C6/36 5.3	G	K	G	H	S	E	E	V
C6/36 10.1	G	K	G	H	S	E	E	V
C6/36 10.2	G	K	G	H	S	E	E	V
C6/36 10.3	G	K	G	H	S	E	E	V
C6/36 10.3a	G	E	G	H	S	-	E	V
pgsA745 5.1	G	E	G	H	S	E	E	V
pgsA745 5.2	G	E	G	H	S	E	E	A
pgsA745 5.3	G	E	G	H	S	E	E	V
pgsA745 10.1	G	E	G	H	S	E	E	V
pgsA745 10.2	G	E	G	H	S	E	E	A
pgsA745 10.3	G	E	G	H	S	E	E	A

Suffix 'a' indicates mutations identified only in individual viruses but not in the majority population.

Esto es aún más cierto cuando se considera que no hay pruebas en D2 de que G55R o E168K tengan algún impacto en la inmunogenicidad del virus CHIK pasado. Mientras que el documento D2 enseña que las mutaciones E2 "...confieren una virulencia reducida en un modelo murino de enfermedad musculoesquelética (MSD)..." (véase la página 2, columna 1, párrafo 2 del documento D2), la Examinadora apreciará que la virulencia no equivale a la inmunogenicidad. De hecho, la inmunogenicidad y la eficacia protectora sólo se probaron en D2 para los mutantes LR-82R y LR-79K (véase la inmunidad protectora y los datos de anticuerpos neutralizantes en la figura 9 de D2). Curiosamente, el mutante LR-79K con propiedades inmunogénicas y protectoras demostradas en la Figura 9 de D2 estaba muy atenuado (véase la Figura 3 de D2) y su distribución tras la inoculación subcutánea estaba muy retrasada (Figura 8 de D2). Por el contrario, tanto los mutantes LR-168K como LR-55R causaron MSD que sólo se atenuó parcialmente (Figura 3 de D2) y ambos mutantes se distribuyeron mejor tras la inoculación subcutánea (Figura 8 de D2). Ambos parámetros podrían llevar al experto a concluir que las mutaciones E168K y G55R no afectarían sustancialmente a la inmunogenicidad del virus CHIKV-LR.

8.3.3.6. Por lo tanto, llegar a la invención actualmente reivindicada a partir de D1 y D2 habría requerido múltiples pasos que habrían obligado al experto a ignorar las enseñanzas de D1 y D2, y por lo tanto habría requerido capacidad inventiva.

8.3.3.7. En primer lugar, la segunda composición de D1 no se enseña como adecuada para la producción de vacunas. El experto tendría que considerar que esta composición puede ser adecuada a pesar de que no se enseña el uso de células Vero para producir una composición farmacéutica. A continuación, el experto tendría que ir en contra de la enseñanza de D2 para considerar que las mutaciones pueden aparecer sistemáticamente por debajo del paso 10. Entonces tendría que identificar una multitud de mutaciones, y cuándo aparecen, antes de tener que identificar cuál de las mutaciones específicas afecta realmente a la inmunogenicidad. A continuación, el experto tendría que considerar cómo evitar la aparición de estas mutaciones sin dejar de producir altos rendimientos del virus, sin que se enseñe en D1 o D2 cómo se puede lograr esto. Esto no es una tarea sencilla y, basándose en los argumentos expuestos anteriormente, la persona experta no habría estado motivada para hacerlo en primer lugar. Además, muchos de estos pasos requieren capacidad inventiva para ir en contra de las enseñanzas de D1 y D2.

8.3.3.8. En consecuencia, las reivindicaciones dependientes son inventivas en virtud de su dependencia de las reivindicaciones independientes inventivas.

9. ANEXOS

Anexo 01. Reivindicaciones modificadas en limpio

Anexo 02. Reivindicaciones modificadas marcadas

Anexo 03. Pohjala L et al. "Inhibitors of Alphavirus Entry and Replication Identified with a Stable Chikungunya Replicon Cell Line and Virus-Based Assays" PLoS ONE 6(12): e28923. doi:10.1371/journal.pone.0028923 Diciembre 2011

Anexo 04. Liljeström, Lusa, Huylebroeck y Garoff "In vitro Mutagenesis of a Full-Length cDNA Clone of Semliki Forest Virus: the small 6,000-Molecular-Weight Membrane Protein Modulates Virus Release" Journal of Virology, volume 65, No. 8, Agosto 1991, páginas 4107-4113

Anexo 05. Liljeström y Garoff, "A new generation of animal cell expression vectors based on the semliki forest virus replicon" Nature Biotechnology, volume 9, Diciembre 1991

10. Solicito de manera respetuosa se otorgue el privilegio de patente de invención a este nuevo invento, dado que cumple con los requisitos de patentabilidad establecidos en la Decisión 486.

Atentamente,



ANDREA TOBOS MATEUS
C.C. 52.223.325 de Bogotá
T.P. 148648
tobos@tobos.com.co
11402910co_memorialexamenr_211122