

Señor Superintendente
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
E. S. D.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-108957- -00007-0000

Fecha: 2015-10-07 16:42:12 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 412 REPOSPRESRECU Folios: 15 25

Trámite : 011
Evento : 378
Actuación : 412

Referencia : Expediente No. **13.108.957**
Asunto : Solicitud de patente para: **"MÉTODO PARA CUANTIFICAR ALÉRGENOS DE UNA PLANTA DE MAÍZ"**
Solicitante : DOW AGROSCIENCES LLC
Fecha de solicitud : 30 de Abril de 2013

I. RECURSO VÍA GUBERNATIVA

Yo, Luz Clemencia DE PÁEZ, en mi condición de apoderada de la sociedad **DOW AGROSCIENCES LLC** solicitante de la patente de la referencia, por el presente escrito atentamente manifiesto a usted que debidamente notificada de la Resolución No. **50423** del 18 de Agosto de 2015, interpongo en su contra el recurso de **REPOSICIÓN**, para que sea revocada y en consecuencia se conceda el privilegio de patente de invención para **"MÉTODO PARA CUANTIFICAR ALÉRGENOS DE UNA PLANTA DE MAÍZ"** a favor de **DOW AGROSCIENCES LLC**.

II. OPORTUNIDAD DE LA IMPUGNACIÓN

La Resolución No. **50423** del 18 de Agosto de 2015, con fecha de publicación listado del 25 de Agosto de 2015, fecha de vencimiento del 25 de Septiembre de 2015, y fecha del término legal el 9 de Octubre de 2015.

III. LA DECISIÓN RECURRIDA

3.1 Mediante la Resolución objeto de la presente impugnación, el Superintendente de Industria y Comercio decidió:

"EXCELENCIA LEGAL EN UN MUNDO SIN FRONTERAS"

3.1.1 Denegar la patente de invención a la creación titulada: **“MÉTODO PARA CUANTIFICAR ALÉRGENOS DE UNA PLANTA DE MAÍZ”**

3.2 En la parte motiva de la providencia, se mencionaron los siguientes fundamentos:

3.2.1 “En cuanto a las reivindicaciones 1 a 6 incluidas en el escrito radicado bajo el N° 13-108957-00004-0000, no se ajustan a los parámetros establecidos en el artículo 30 anteriormente transcrito, por cuanto no son claras ya que no definen las etapas que comprende el paso de “purificar” granos de maíz de un alérgeno y la etapa de cuantificación se limita a la simple mención de técnicas, la reivindicación 5 no define las múltiples isoformas o variantes de un alérgeno de proteína y no las define estructuralmente a partir de la secuencia aminoácida, de manera que no es posible establecer el alcance de la materia reclamada.”

3.2.2 Las características esenciales de la invención de la reivindicación 1 habían sido derivadas de manera evidente previamente en los documentos D1 y D2, los cuales dan a conocer un método para determinar una cantidad de alérgeno de proteína de transporte de lípidos en granos de maíz.

3.2.3 “En referencia al argumento de la solicitante, según el cual se encontró que la patente US5409907 se encuentra dirigida a “una suspensión farmacéutica para activos farmacéuticos” y por tanto no se considera pertinente para realizar comparación con la presente invención y que por tanto ha encontrado la patente WO2003080837, la cual cree que es la referencia correcta, se aclara que tal como lo indica la solicitante se cometió un error en la referencia del documento D2 US5409907 y que la referencia correcta es WO2003080837.”

3.2.4 “En referencia al argumento de la solicitante, según el cual el documento D1 no enseña ni sugiere un método que involucre un alérgeno en granos de maíz, ni mucho menos un alérgeno de proteína de transporte de lípidos con una masa molecular de 9kDa. Se aclara que si bien es cierto la anterioridad D1 no menciona un método que involucre alérgenos de proteína de transporte de lípidos con una masa molecular de 9kDa en granos de maíz, ‘para el cual el documento D1 divulga un método para identificar alérgenos se ha proyectado por

tanto un análisis de nivel inventivo a la luz de las enseñanzas de los documentos D1 y D2, para el cual el documento D1 divulga un método para identificar alérgenos purificados, que comprende: someter el extracto a cromatografía líquida y detectar por espectrometría de masas (Pág.3) y el documento D2 enseña un método que comprende purificar un alérgeno de una proteína de extracto de polen (Pág. 10 líneas 13-14), someter el alérgeno a cromatografía por HPLC, caracterizar estructuralmente con espectros de dicroísmo en el UV lejano y espectrometría de masas (Pág. 9. Líneas 27- Pág. 10 línea 7), método que puede ser aplicado a compuestos que presenten cualquier peso molecular, más aún cuando la solicitud no proporciona información como seleccionar un rango específico de peso molecular para los alérgenos a ser identificados ni del efecto técnico de realizar dicha selección, por lo cual el método reclamado carece de nivel inventivo.”

- 3.2.5 “En referencia al argumento según el cual el documento D2 no enseña un método para determinar la cantidad (análisis cuantitativo) del alérgeno en la muestra y que por lo tanto no enseña ni sugiere un método que involucre un alérgeno en granos de maíz, ni mucho menos un alérgeno de transporte de proteína de transporte de lípidos (PTL) con una masa molecular de 9kDa ni tampoco enseña ni sugiere un método para determinar la cantidad de alérgeno en la muestra. Se aclara que para efectos de estudio de patentabilidad se ha proyectado un estudio de nivel inventivo a la luz de las enseñanzas de los documentos D1 y D2 para lo cual el documento D1 divulga un método para identificar alérgenos purificados, que comprende: someter el extracto a cromatografía líquida y detectar por espectrometría de masas (Pág.3) y el documento D2 enseña un método que comprende purificar un alérgeno de una proteína de extracto de polen (Pág. 10 líneas 13-14), someter el alérgeno a cromatografía por HPLC, caracterizar estructuralmente con espectros de dicroísmo en el UV lejano y espectrometría de masas (Pág. 9. Líneas 27- Pág. 10 línea 7) y que dicho método puede ser aplicado a muestras aisladas de cualquier planta, por lo que la selección arbitraria de plantas de maíz señalada por la solicitante, a falta de un efecto técnico inesperado, resulta obvia, por lo cual el método reclamado carece de nivel inventivo. Adicionalmente la etapa de cuantificación se limita a la aplicación de medios técnicos conocidos.”

IV. OBJETO DEL RECURSO

De acuerdo con los argumentos que expongo a continuación, solicito atentamente a su Despacho lo siguiente:

1. Revocar la Resolución No. **50423** del 18 de Agosto de 2015.
2. Conceder el privilegio de patente de invención para **“MÉTODO PARA CUANTIFICAR ALÉRGENOS DE UNA PLANTA DE MAÍZ”** a favor de **DOW AGROSCIENCES LLC**.

V. MODIFICACIÓN DE UNA SOLICITUD EN TRÁMITE

En virtud del Artículo 34 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, donde se establece que la modificación de una solicitud es posible en cualquier momento del trámite mientras no implique una ampliación de la solicitud inicial, me permito presentar un nuevo pliego reivindicatorio conformado por 6 reivindicaciones.

A este respecto, el señor examinador sostiene que las reivindicaciones 1-6 no son claras, ya que "no definen el paso de 'purificar'", que "la etapa de cuantificación se limita a la simple mención de las técnicas", y que "la reivindicación 5 no define las múltiples isoformas o variantes de un alérgeno proteico".

Así las cosas, es importante mencionar que con respecto al paso de "purificar", se han modificado las reivindicaciones para además clarificar el método que comprende extraer con solución amortiguadora de bisulfato de amonio y luego eliminar partículas insolubles.

Por otra parte, con respecto al paso de cuantificar, las reivindicaciones han sido modificada con el fin de incluir además los pasos de calibrar el sistema de cromatografía líquida (equipado con detección por espectrometría de masas y ultravioleta) basado en la respuesta ultravioleta para obtener la respuesta calibrada, inyectar el extracto en el sistema de cromatografía líquida para obtener una respuesta ultravioleta del extracto, y

luego calcular la cantidad de alérgeno basado en la respuesta del extracto en relación con la respuesta calibrada. De esta forma, es importante señalar que una persona experta en la técnica sería capaz de reproducir y ejecutar las reivindicaciones de procedimiento modificadas.

Adicional a lo anterior, es relevante señalar que una persona experta en la técnica reconoce el uso de LC-UV/MS para el análisis cuantitativo, y por tanto, se adjunta al presente documento un artículo técnico por Baere *et al.*, "Determination and quantification of sulfadiazine and trimethoprim in swine tissues using liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection", Analyst, Marzo 2000, 125(3), paginas 409–15.

- Así, es necesario tener en cuenta que la sulfadiazina (peso molecular de 250) y trimetoprim (peso molecular de 290) son mucho más pequeñas que las proteínas alergénicas (por ejemplo, el peso molecular de 9000 para el alérgeno LTP derivado de maíz). Ver: <https://en.wikipedia.org/wiki/Sulfadiazine> ;
<https://en.wikipedia.org/wiki/Trimethoprim>

- **Aunque LC-UV/MS se ha utilizado para el análisis cuantitativo de compuestos pequeños (es decir, sulfadiazina y trimetoprim), nunca había sido utilizada para el análisis cuantitativo de proteínas intactas (es decir, la proteína no digerida) hasta la presente invención.**

Finalmente, con respecto a la reivindicación 5, no se han incluido las secuencias de aminoácidos de los múltiples variantes o isoformas del alérgeno de proteína en la reivindicación para clarificar la expresión "múltiples isoformas o variantes de un alérgeno de proteína". En consecuencia, dicha reivindicación se ha modificado para eliminar dicha expresión "múltiples isoformas o variantes de un alérgeno de proteína".

Por lo tanto, los argumentos esgrimidos a continuación con respecto a la patentabilidad de la invención, en los términos del capítulo reivindicatorio modificado, resultan plenamente predicables del capítulo reivindicatorio sobre el cual la patente fue negada. En efecto, la no ampliación de la materia en el nuevo pliego es evidencia suficiente de que el presente recurso controvierte el análisis de patentabilidad efectuado por su Despacho, de tal manera que el presente recurso cumple con los requisitos de ley para su aceptación y trámite.

VI. FUNDAMENTOS DEL RECURSO

Respetuosamente me permito disentir de lo expuesto por ese Despacho en la Resolución objeto del presente recurso, toda vez que la presente solicitud sí cumple con los requerimientos de novedad y nivel inventivo exigidos en la Decisión 486, como se demostrará a continuación:

6.1 La presente solicitud sí tiene nivel inventivo

El artículo 18 de la Decisión 486 señala lo siguiente:

“Artículo 18.- Se considerará que una invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica.”

Consecuentemente, una invención se considerará inventiva si la misma no hubiese resultado obvia a partir del arte previo, para una persona del oficio normalmente versada en la materia. Esto a su vez implica que el Examinador a cargo de esta evaluación debe colocarse en el momento exacto en el que el inventor buscaba resolver el problema técnico contemplado en la solicitud y para el cual poseía la literatura y el conocimiento disponibles en dicho momento.

Siguiendo entonces los lineamientos de la Jurisprudencia aplicable al análisis del nivel inventivo de una solicitud de patente, se considera que una anterioridad o una combinación de dos anterioridades puede afectar dicho requerimiento de patentabilidad, si una persona medianamente versada en la materia encuentra enseñanzas o sugerencias claras que, a partir de un conocimiento medio en dicho campo, le permitan llegar de manera obvia a la invención reivindicada. Adicionalmente se considera que una mejora sustancial, un efecto inesperado o una ventaja con respecto al arte previo es un indicio de nivel inventivo, por cuanto aporta un salto tecnológico en la regla técnica.

Respecto a lo anterior, el Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina ha expuesto en la Interpretación Prejudicial del proceso 13-IP-2010:

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

[señalado fuera del texto]

Por lo anterior, se entiende que para que una persona medianamente versada en la materia pudiera derivar de manera obvia una invención, requeriría simplemente aplicar sus conocimientos técnicos. En contraste, todo aquello que va más allá de la simple aplicación de los conocimientos técnicos y que no ha sido revelado en el estado de la técnica, debe ser considerado inventivo.

Con base en lo anterior, respetuosamente manifestamos nuestro desacuerdo con el análisis llevado a cabo por el Examinador y con las conclusiones del mismo y solicitamos atentamente la reconsideración de las razones por las cuales se decidió negar la patente, con base en la siguiente información:

A este respecto, el señor Examinador ha objetado las reivindicaciones 1 a 6 por falta de nivel inventivo frente a D1 y D2.

Así las cosas, la **reivindicación 1** tal como ha sido modificada recita “un método para determinar la cantidad de alérgeno en una composición, que comprende: proporcionar una composición que comprende un alérgeno; purificar por lo menos parcialmente el alérgeno de la composición para formar un extracto, el cual comprende extraer el alérgeno de la composición usando una solución amortiguadora de bicarbonato de amonio y luego eliminar partículas insolubles para proporcionar el extracto; y

determinar la cantidad de alérgeno en el extracto usando cromatografía líquida con detección espectrométrica de masas y ultravioleta, que comprende:

calibrar el sistema de cromatografía líquida mediante la inyección de los alérgenos

de concentraciones conocidas en el sistema de cromatografía líquida y determinar las repuestas ultravioletas del sistema de cromatografía líquida para obtener una respuesta calibrada;

inyectar el extracto en el sistema de cromatografía líquida y obtener una respuesta ultravioleta del extracto a partir del sistema de cromatografía líquida; y
calcular la cantidad de alérgeno en el extracto basado en la respuesta del extracto en relación a la respuesta calibrada.

A este respecto, el documento **D1** enseña un método para identificar alérgeno proteico en el polen de remolacha azucarera. El documento D1 enseña que: "Las proteínas en los extractos de polen de remolacha azucarera se separaron por electroforesis mono- y bi-dimensional, y las proteínas IgE reactiva analizadas por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa en tandem" (D1, Resumen).

Así, el documento D1 simplemente enseña el método para identificar los tipos de alérgenos en la remolacha azucarera. El documento D1 no enseña ni sugiere nada acerca de la determinación de la cantidad del alérgeno de proteína.

Por otra parte, el señor Examinador afirma que: "La diferencia encontrada entre la presente invención y D1 consiste en que la solicitud incluye la etapa de purificar al menos parcialmente el alérgeno de proteína de transporte de lípidos en los granos de maíz." A este respecto, mi representada pone de presente su desacuerdo debido a que como se discutió anteriormente, el documento D1 no describe o sugiere nada acerca de la determinación de la cantidad de alérgeno de proteína.

Por otro lado, el documento **D2** enseña el método de purificación del alérgeno de proteína mediante la extracción de alérgeno Che a1 a partir de la permeación de chenopodium album usando cromatografía y HPLC y, luego, la identificación del alérgeno Che a1 extraído (D2, página 9, línea 27-página 10, línea 7). Así, el documento D2 no enseña un método para determinar la cantidad de alérgeno.

El señor Examinador también argumenta la reivindicación 1 se considera obvia ya que "una persona experta en la técnica incluiría una etapa de purificación de D2 en un

método para identificar alérgeno purificado de D1 con el fin de llegar a la materia de la reivindicación 1."

En vista de lo anterior, es importante tener en cuenta que incluso si una persona experta en la materia combinara las enseñanzas de D1 y D2 como lo afirma el Examinador, no habría llegado a los métodos reivindicados de presente solicitud. Como se mencionó anteriormente, **ni D1 o D2 divulgan, enseñan o incluso sugieren nada sobre la determinación de la cantidad de alérgeno de proteína.**

Por otro lado, la presente invención está dirigida a un método para determinar la cantidad de alérgeno de proteína.

De esta forma, en el momento de presente invención, "La cuantificación de LTP por ELISA [es decir, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas] ha sido el método de elección" (Tal como fue presentado en la solicitud de la presente invención). Sin embargo, ELISA no es adecuada para determinar la cantidad de "LTP a partir de maíz, debido a la falta de un anticuerpo específico". Por lo tanto, la presente invención dar a conocer "aproximaciones alternativas para cuantificar LTP" de maíz.

La cuantificación de proteínas mediante LC-MS puede llevarse a cabo utilizando una aproximación de péptido firma, que involucra proteínas de digestión (es decir, proteólisis) y luego "analizar de un péptido firma tríptico usando un análogo sintético marcado isotópicamente como patrón interno". Sin embargo, la aproximación péptido firma puede plantear varios desafíos incluyendo, (a) un péptido adecuado debe ser encontrado cuya secuencia es específica sólo para la proteína de interés, (b) el comportamiento del estándar interno puede diferir significativamente en comparación a la de la proteína intacta antes de la digestión, y (c) se basa en la digestión tríptica de la proteína a ser completa."

La presente invención aborda los inconvenientes mencionados anteriormente del uso de ELISA o un método LC-MS de péptido firma para determinar la cantidad de alérgeno de proteína.

La presente invención logra esto mediante la determinación de la cantidad de "proteína intacta [usando] LC-UV/MS, lo que evita el consumo de tiempo y el paso de digestión potencialmente problemático".

Aunque LC-UV/MS se ha utilizado para el análisis cuantitativo del compuesto pequeño (es decir, el péptido obtenido a partir de la digestión de la proteína como se describe en el método LC-MS péptido firma mencionado), nunca había sido utilizado para el análisis cuantitativo de proteína intacta (es decir, la proteína no digerida) hasta la presente invención.

Por lo tanto, no habría sido evidente para un experto en la materia en el momento de presente invención, basado en las enseñanzas de D1 y D2, llegar a "[a] método para determinar la cantidad de alérgeno en una composición, la método que comprende: ... **determinar la cantidad de alérgeno en el extracto usando cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas y ultravioleta**", tal como se recita en la reivindicación 1 modificada.

Por lo tanto, la reivindicación 1 modificada y la reivindicación 2 (la cual depende de la reivindicación 1 modificada) implican nivel inventivo frente a D1 y D2.

Por otro lado, la **reivindicación 3**, en su forma modificada, recita "un método para determinar una cantidad de alérgeno de proteína de transporte de lípidos en granos de maíz, que comprende:

extraer los granos de maíz molidos con una solución amortiguadora de bicarbonato de amonio y luego eliminar partículas insolubles para formar un extracto; y

determinar la cantidad de alérgeno de proteína de transferencia de lípidos (PTL) en el extracto usando cromatografía líquida con detección ultravioleta y espectrometría de masas, que comprende:

calibrar el sistema de cromatografía líquida con alérgeno PTL que tiene una masa molecular de 9kDa, en donde la calibración se basa en la respuesta a partir de la cromatografía líquida a la longitud de onda de 215nm,

inyectar el extracto en el sistema de cromatografía líquida y obtener una respuesta del extracto a partir del sistema de cromatografía a una longitud de onda ultravioleta de 215 nm; y

calcular la cantidad de alérgeno PTL en el extracto basado en la respuesta del extracto en relación a la respuesta calibrada."

Como se mencionó anteriormente, ni D1 o D2 divulgan, enseñan o incluso sugieren nada sobre la determinación de la cantidad de alérgeno de proteína.

Por lo tanto, D1 y D2 no enseñan o sugieren " un método para determinar una cantidad de alérgeno de proteína de transporte de lípidos en granos de maíz, que comprende:... **determinar la cantidad de alérgeno de proteína de transferencia de lípidos (PTL) en el extracto usando cromatografía líquida con detección ultravioleta y espectrometría de masas**", de acuerdo con la reivindicación 3, en su versión modificada.

Por lo tanto, no habría sido evidente para una persona versada en la materia en el momento de presente invención, basado en las enseñanzas de D1 y D2, llegar al método de la reivindicación 3 modificada. Así, la objeción de la reivindicación 3 modificada y la reivindicación 4 (que depende de la reivindicación 3, en su versión modificada) es superada.

Por otra parte, la reivindicación 5, en su versión modificada, recita "un método para determinar una cantidad de alérgeno de proteína de transporte de lípidos en granos de maíz, que comprende:

extraer granos de maíz molidos con solución amortiguadora de bicarbonato de amonio y luego eliminar partículas insolubles para formar un extracto;

calibrar un sistema de cromatografía líquida con un alérgeno de proteína de transporte de lípidos (PTL) que tiene una masa molecular de 9kDa para obtener una respuesta calibrada,

en donde el sistema de cromatografía líquida se equipa con detección espectrométrica de masas y ultravioleta, una columna de fase inversa y una fase móvil que comprende una solución de ácido trifluoroacético (TFA), y

en donde la calibración se basa en la respuesta a partir del sistema de cromatografía líquida a una longitud de onda ultravioleta de 215 nm; y

determinar la cantidad de alérgeno PTL en el extracto usando una cromatografía líquida con detección ultravioleta y espectrometría de masas mediante la inyección

del extracto en el sistema de cromatografía líquida para obtener una respuesta del extracto a una longitud de onda ultravioleta de 215 nm y luego calcular la cantidad de alérgeno PTL en el extracto basado en la respuesta del extracto en relación a la respuesta calibrada."

Así las cosas, tal como se mencionó anteriormente, ni D1 o D2 divulgan, enseñan o incluso sugieren nada sobre la determinación de la cantidad de alérgeno de proteína. Por lo tanto, no habría sido evidente para un experto en la materia en el momento de presente invención llegar al método de la reivindicación 5 modificada. De esta forma, la objeción hacia la reivindicación 5 modificada y la reivindicación 6 (que depende de la reivindicación 5) es superada.

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

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

Conclusión

El documento D1, el documento D2, o su combinación no resulta anterioridad válida capaz de afectar el nivel inventivo de la invención de la presente solicitud.

Por todo lo anterior, consideramos que la presente solicitud cumple a cabalidad con los requerimientos de patentabilidad exigidos por la legislación actual, por lo que atentamente solicitamos en consideración lo siguiente:

VII. PETICIÓN

Por todo lo anterior, solicito a ese Despacho lo siguiente:

7.1 Que al considerar las razones precedentes se revoque la decisión contenida en la Resolución No. **50423** del 18 de Agosto de 2015, en cuanto resuelve negar el privilegio de patente de invención.

7.2. Que se acepte el nuevo pliego reivindicatorio presentado con este escrito, conformado por 6 reivindicaciones.

7.3. Que se otorgue el privilegio de patente de invención para **“MÉTODO PARA CUANTIFICAR ALÉRGENOS DE UNA PLANTA DE MAÍZ”** a favor de **DOW AGROSCIENCES LLC**.

VIII. NOMBRE Y DIRECCIÓN

El nombre y la dirección del solicitante recurrente son los siguientes:

DOW AGROSCIENCES LLC

9330 Zionsville Road, Indianapolis,
46268 Indiana,
Estados Unidos de América

IX. ANEXOS

- Formulario de modificaciones en solicitud pendiente
- Recibo por concepto de presentación de modificaciones a las reivindicaciones por un valor de \$132.000
- Nuevo pliego reivindicatorio conformado por 6 reivindicaciones
- Anexo 1: Artículo técnico por Baere *et al.*

X. NOTIFICACIONES

Atentamente manifiesto a usted que recibiré notificaciones en la Secretaria de su Despacho o en mi oficina de abogada situada en la Carrera 4ª. No. 72-35, piso 4º, de esta ciudad de Bogotá, D.C.

Señor Superintendente,


LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén
T.P.A. No. 23.555

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	Espacio reservado para el adhesivo de radicación
--	--

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
MODIFICACIONES Y/O CORRECCIONES

1. Identificación del Trámite

☐ Error material

☒ Modificación a una Solicitud en trámite

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Registro de Diseño Industrial

☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante

Persona Natural

☐

Persona Jurídica

☒

DOW AGROSCIENCES LLC

Nombre o denominación / Nombre o razón social completa

Nombre representante legal

Tipo de empresa Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☐ Otra ☐

Documento de identificación: ☐ C.C. ☐ C.E. ☐ NIT ☐ Otro Número _____

Nacionalidad/País de constitución	Dirección y domicilio del titular	Ciudad
Estados Unidos de América	9330 Zionsville Road, Indianapolis, Indiana 46268, Estados Unidos de América	Indianapolis
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
clientes@cavelier.com	2 11 86 50	3 47 36 11

☐ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del apoderado:

Apellidos y Nombre
De Páez Luz Clemencia

Documento de identificación
C.C. 35.456.344

Tarjeta profesional
T.P.A. 23.555

Dirección y domicilio	Ciudad	
Carrera 4ª No. 72 –35	Bogotá	
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
cavelier@cavelier.com	2 11 86 50	3 47 36 11

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general

4. Datos del trámite

Corrección:

Expediente No 13.108.957

Aparece

Debe ser

Modificación:



Modificación al capítulo reivindicatorio.

Presento nuevo capítulo reivindicatorio compuesto por 6 reivindicaciones y pido respetuosamente que el examen de patentabilidad sea realizado sobre estas nuevas reivindicaciones presentadas.

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



Modificación al capítulo descriptivo.



Modificación al resumen.



Modificación a los dibujos.



Modificación al Título.

5. Anexos

Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación por \$132.000.



Poder, si fuere el caso.



Documento que contiene las modificaciones o correcciones.



Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético.



Comprobante de pago por reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por.

6. Firma	
Nombre y apellidos	Firma
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
C.C. 35.456.344 DE Usaquén	Tarjeta Profesional 23.555

SGD/SDC/ID-283554/WPC10975

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 15 - 109918

Bogotá D.C., Octubre 07 de 2015 - 10:59:57

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	106184	29/09/2015	530.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	106185	29/09/2015	530.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	106186	29/09/2015	530.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	106188	29/09/2015	536.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	106189	29/09/2015	536.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	106190	29/09/2015	536.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	106191	29/09/2015	536.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	106211	29/09/2015	109.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-03 CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICACIONES	EN N. CREACION CORRECCION A SOLICITUD EN TRAMITE / MODIFICA	132.000.00	132.000.00
				\$132.000.00

SON: **CIENTO TREINTA Y DOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-108957- -00007-0000

Fecha: 2015-10-07 16:42:12 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve 378 FASENACIONALI
Act. 412 REPOSPRESRECU Folios: 15 25

0010-10975-841-154-9

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la cantidad de alérgeno en una composición, que comprende:

proporcionar una composición que comprende un alérgeno;

purificar por lo menos parcialmente el alérgeno de la composición para formar un extracto, el cual comprende extraer el alérgeno de la composición usando una solución amortiguadora de bicarbonato de amonio y luego eliminar partículas insolubles para proporcionar el extracto; y

determinar la cantidad de alérgeno en el extracto usando cromatografía líquida con detección espectrométrica de masas y ultravioleta, que comprende:

calibrar el sistema de cromatografía líquida mediante la inyección de los alérgenos de concentraciones conocidas en el sistema de cromatografía líquida y determinar las repuestas ultravioletas del sistema de cromatografía líquida para obtener una respuesta calibrada;

inyectar el extracto en el sistema de cromatografía líquida y obtener una respuesta ultravioleta del extracto a partir del sistema de cromatografía líquida; y

calcular la cantidad de alérgeno en el extracto basado en la respuesta del extracto en relación a la respuesta calibrada.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la cromatografía líquida es cromatografía líquida bidimensional.

3. Un método para determinar una cantidad de alérgeno de proteína de transporte de lípidos en granos de maíz, que comprende:

extraer los granos de maíz molidos con una solución amortiguadora de bicarbonato de amonio y luego eliminar partículas insolubles para formar un extracto; y

determinar la cantidad de alérgeno de proteína de transferencia de lípidos (PTL) en el extracto usando cromatografía líquida con detección ultravioleta y espectrometría de masas, que comprende:

calibrar el sistema de cromatografía líquida con alérgeno PTL que tiene una masa molecular de 9kDa, en donde la calibración se basa en la respuesta a partir de la cromatografía líquida a la longitud de onda de 215nm,

inyectar el extracto en el sistema de cromatografía líquida y obtener una respuesta

del extracto a partir del sistema de cromatografía a una longitud de onda ultravioleta de 215 nm; y

calcular la cantidad de alérgeno PTL en el extracto basado en la respuesta del extracto en relación a la respuesta calibrada.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la cromatografía líquida es cromatografía líquida bidimensional.

5. Un método para determinar una cantidad de alérgeno de proteína de transporte de lípidos en granos de maíz, que comprende:

extraer granos de maíz molidos con solución amortiguadora de bicarbonato de amonio y luego eliminar partículas insolubles para formar un extracto;

calibrar un sistema de cromatografía líquida con un alérgeno de proteína de transporte de lípidos (PTL) que tiene una masa molecular de 9kDa para obtener una respuesta calibrada,

en donde el sistema de cromatografía líquida se equipa con detección espectrométrica de masas y ultravioleta, una columna de fase inversa y una fase móvil que comprende una solución de ácido trifluoroacético (TFA), y

en donde la calibración se basa en la respuesta a partir del sistema de cromatografía líquida a una longitud de onda ultravioleta de 215 nm; y

determinar la cantidad de alérgeno PTL en el extracto mediante la inyección del extracto en el sistema de cromatografía líquida para obtener una respuesta del extracto a una longitud de onda ultravioleta de 215 nm y luego calcular la cantidad de alérgeno PTL en el extracto basado en la respuesta del extracto en relación a la respuesta calibrada.

6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la cromatografía líquida es cromatografía líquida bidimensional.

Determination and quantification of sulfadiazine and trimethoprim in swine tissues using liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection

S. De Baere,^{a*} K. Baert,^a S. Croubels,^a J. De Busser,^b K. De Wasch^c and P. De Backer^a

^a Department of Pharmacology, Pharmacy and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Ghent, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke, Belgium

^b Kela Laboratoria N.V., St. Lenaartseweg 48, B-2320 Hoogstraten, Belgium

^c Department of Veterinary Food Inspection, Lab of Chemical Analysis, Faculty of Veterinary Medicine, University of Ghent, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke, Belgium

Received 3rd November 1999, Accepted 1st February 2000

High-performance liquid chromatographic procedures with ultraviolet detection were developed for the quantitative determination of sulfadiazine (SDA) and trimethoprim (TMP) in swine tissues (kidney, liver, muscle, fat and fat+skin). In addition, high-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry was used for the confirmation of the identity of the analytes of interest. Chromatographic separation was achieved on a Spherisorb ODS-2 column (250 × 4.6 mm id, dp 5 µm). The mobile phase for SDA analysis consisted of 1% acetic acid in water–acetonitrile (85 + 15, v/v). For TMP analysis a 80 + 15 + 5 (v/v/v) mixture of 0.25% triethylammonium acetate in water, acetonitrile and methanol was used as the eluent. Sulfamerazine and ornithoprim were used as the internal standards for SDA and TMP analysis, respectively. For the isolation of the compounds of interest from biological samples, a liquid–liquid extraction with acetone and ethyl acetate, followed by a clean-up using a solid-phase extraction column (aminopropyl and benzenesulfonic acid for SDA, benzenesulfonic acid for TMP) was performed. Calibration graphs were prepared for all tissues and linearity was achieved over the concentration ranges tested (50–1000 ng g⁻¹ for SDA, $r \geq 0.9979$; 25–500 ng g⁻¹ for TMP, $r \geq 0.9994$). The method was validated at the maximum residue level (MRL, 100 ng g⁻¹ for SDA and 50 ng g⁻¹ for TMP), at half the MRL and at double the MRL for both SDA and TMP. The accuracy and precision (expressed as the within-day repeatability) were found to be within the required ranges for each specific concentration. The quantification limits were 50 ng g⁻¹ for SDA and 25 ng g⁻¹ for TMP. The limits of detection were below one half the MRLs. Both methods were selective for the determination of SDA and TMP. Biological samples (kidney, liver, muscle, fat and fat + skin) from pigs that received a commercial SDA–TMP preparation with the feed for five consecutive days (dose rate: 25 mg SDA and 5 mg TMP kg body weight⁻¹ day⁻¹) were analyzed using the described methods. The quantitative results were used to calculate a withdrawal time (12 days) to reach residue levels below the respective MRLs. This calculation was performed according to the recommendations of the European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMEA/CVMP/036/95).

1. Introduction

Combinations of sulfonamides and trimethoprim (TMP) are widely used as antibacterials in veterinary practice for the prevention or treatment of respiratory or gastro-intestinal tract infections. However, the large scale application of these drugs raises the risk of the occurrence of residues in food products due to improper observance of withdrawal times. Such residues particularly are of concern because the possibility exists that resistance against these antibiotics is developed. Therefore, regulatory agencies within the European Union (EU) have defined maximum residue limits (MRLs) of 100 ng g⁻¹ for sulfonamides in muscle, fat, liver and kidney tissues of all food-producing animals and 50 ng g⁻¹ for TMP in muscle, fat + skin, liver and kidney tissues of pigs.¹

A number of chromatographic methods for the determination of sulfonamides in tissues have been published. These include gas chromatography (GC) with electron capture detection² and GC with mass spectrometric detection (MS) after methylation.^{3,4} Most analytical methods, however, use reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) in combination with ultraviolet (UV) detection ($\lambda = 254, 270$ or 275 nm).^{5–11} In addition, mass spectrometry was suggested or used

for both quantitative and confirmatory analysis.^{12,13} TMP analyses are performed by using RP-HPLC. The compound is detected by measuring UV absorbance at wavelengths of 229,¹¹ 240,¹⁰ 270^{8,9} or 288 nm.⁷ For the chromatography of both compounds mixtures of phosphate buffer and acetonitrile are usually applied as mobile phase.^{7–12} Only a few methods for the determination of sulfonamides use volatile mobile phases (e.g. ammonium acetate–acetonitrile) which can be used for LC-MS applications.^{6,12,13} For sample pre-treatment both liquid–liquid extraction (LLE) procedures^{8,9} as well as procedures which combine LLE with solid-phase extraction (SPE)^{10–12} have been described. Quantification limits ranging from 50 to 100 ng g⁻¹ for sulfonamide analysis^{8,12} and from 50 to 160 ng g⁻¹ for TMP analysis^{8,9,11} have been reported. In the Commission Decision No. 93/256/EEC it is defined that methods for the determination of residues in tissues have to be validated at the MRL, at half the MRL and at double the MRL.¹⁴ As the EU has set an MRL of 50 ng g⁻¹ for the determination of TMP in all tissues, the quantification limits which were reported in the literature are not low enough to fulfil the EU requirements for residue analysis.

This work is focused on the quantitative LC-UV determination of low concentrations ($\leq 1/2$ MRLs) of sulfadiazine (SDA)

and TMP in swine tissues. Special care has been devoted to the choice of the HPLC mobile phase with the aim to allow a simple methodological transfer of the HPLC-UV methods to an LC system with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric detection (APCI-MS/MS), which is used for qualitative purposes. The principle of internal standardization was applied. Extraction and clean-up procedures for the determination of both compounds are described. The methods were validated by a set of parameters which are in compliance with the requirements as defined in the Rules Governing Medicinal Products in the European Community.¹⁵

Moreover, since the methods developed were able to quantify residues as low as half the MRLs, they were tested on real biological samples (kidney, liver, muscle, fat and fat + skin). These samples were taken during a residue study in pigs after oral administration of a commercial SDA-TMP formulation with the feed for five consecutive days. The results obtained were used for withdrawal time calculation.¹⁶

2. Experimental

2.1. Chemicals

SDA and TMP were Chemical Reference Substances (CRS) of the European Pharmacopoeia (Strasbourg, France). Sulfamerazine (SMZ) was obtained from Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Germany). Methyltrimethoprim and ormethoprim (OMP) were a gift from Roche (Basle, Switzerland). Stock solutions of 1000 µg mL⁻¹ of each compound in methanol were prepared and stored in the dark at $\leq -15^{\circ}\text{C}$ for 1 month. By diluting each stock solution with water, appropriate working solutions were obtained (SDA concentration: 20, 10, 4, 2 and 1 µg mL⁻¹, TMP concentration: 10, 4, 2, 1 and 0.5 µg mL⁻¹, SMZ concentration: 5 µg mL⁻¹, OMP concentration: 10 and 2 µg mL⁻¹). The working solutions were stored in the dark at 4°C and were replaced every 14 d.

All products (acetic acid, concentrated ammonia solution, potassium hydroxide and triethylammonium acetate) and solvents used for the extraction procedures (acetone, ethyl acetate, hexane and methanol) were of analytical-reagent grade. All solvents used for the mobile phases (acetonitrile, methanol and water) were of LC grade.

Isolute aminopropyl (NH₂) and benzenesulfonic acid (SCX) solid-phase extraction columns (both 500 mg per 10 mL) were purchased from Sopachem (Brussels, Belgium).

2.2. Apparatus

HPLC-UV system. The HPLC-UV system consisted of a quaternary gradient pump P4000, an autosampler AS3000 with cooling device, and a UV-DAD detector type UV 6000LP, all from ThermoQuest (San José, CA, USA). Chromatographic separations were achieved using a RP C₁₈ Spherisorb ODS-2 column (250 × 4.6 mm id, dp 5 µm, kept at room temperature) in combination with a guard column (Chrompack Belgium, Antwerp, Belgium). The mobile phases were prepared with LC grade solvents and contained 1% acetic acid in water-acetonitrile (85 + 15, v/v) for the analysis of SDA. For TMP analysis, a mobile phase consisting of a 0.25% aqueous solution of triethylammonium acetate-acetonitrile-methanol (80 + 15 + 5, v/v/v) was used. Both analytes of interest and their respective internal standards (IS) were eluted isocratically with a flow rate of 1.0 and 1.5 mL min⁻¹ for SDA and TMP, respectively. Respective injection volumes were 50 and 100 µL. UV absorption of SDA and TMP was measured at a wavelength of 270 and 240 nm, respectively.

LC-MS/MS system. The LC-MS/MS system consisted of a quaternary gradient pump P4000, an autosampler AS3000 with cooling device, and a UV detector type UV1000, all from ThermoQuest. The LC conditions were the same as described above for the HPLC-UV system. The MS detector used was a Finnigan LCQ[®] instrument (ThermoQuest). The samples were analyzed in the positive APCI-MS/MS mode. The instrument was first calibrated and tuned in the APCI mode using a solution of caffeine, L-methionyl-arginyl-phenylalanyl-alanine acetate-H₂O (MRFA) and Ultramark[®] 1621. Thereafter, aqueous solutions of SDA and SMZ (IS), and of TMP and OMP (IS) were introduced *via* loop injections into the APCI source in combination with the LC eluent in order to tune and optimize the MS detector settings. The instrument was tuned in the full scan MS/MS mode and the relative collision energy (RCE) was set at a level at which the parent ions were fragmented for (nearly) 100% into their product ions (RCE = 20% for both SDA and TMP and their respective IS). Data concerning the fragmentation of the analytes of interest and the relative abundance of the product ions are presented in Table 1.

2.3. Biological samples

The samples (kidney, liver, muscle, fat and fat + skin) were from 18 healthy pigs of a Belgian breed (Belgian Landrace Pietrain × Seghers), of a weight ranging between 16.8 and 31.2 kg, of the same age (11–12 weeks) and of the two sexes (females and castrates, equally divided). The pigs received TRIMAZIN 30% Kela (Kela Laboratoria, Hoogstraten, Belgium) twice daily with the feed for five consecutive days at a dose of 1 g powder per 10 kg body weight (BW) per day (equivalent to 25 mg SDA and 5 mg TMP kg BW⁻¹ day⁻¹). The animals were slaughtered at 1 (*n* = 4), 3 (*n* = 4), 5 (*n* = 5) and 8 (*n* = 5) days after cessation of medicated feed. The samples (±100 g) were collected immediately after slaughtering and transported to the laboratory. They were cut into small pieces and homogenized by using a Moulinette blender (Moulinex, Paris, France). The samples were placed in identified plastic bags and kept frozen at $\leq -15^{\circ}\text{C}$ until analysis.

Known drug-free samples of kidney, liver, muscle, fat and fat + skin tissues were collected from animals which did not receive any medication.

2.4. Tissue extraction

SDA analysis. Five grams of kidney, liver and muscle tissue (or 2.5 g for fat tissue) were weighed into a plastic centrifuge tube and 250 µL of the IS working solution (125 µL for fat tissue) and 3 mL of 0.1 M acetic acid in water were added. The sample was vortex-mixed for 15 s after each addition of standards or reagents. Three millilitres of acetone and 12 mL of ethyl acetate were added, followed by an extraction for 10 min by rotation. After centrifugation for 10 min at 3500 rpm, the organic phase was transferred into another centrifuge tube. The

Table 1 Parent ions and product ions of SDA, SMZ, TMP and OMP

Compound	Parent ion (<i>m/z</i>)	Product ions (<i>m/z</i>)
SDA	251.3	174.0; 156.1 (80%); 108.2 (12%); 92.1
SMZ	265.3	189.9; 174.0 (56%); 156.1 (22%); 110.3; 108.2; 92.2
TMP	291.3	275.2; 258.1 (35%); 230.2; 181.2; 123.2 (28%)
OMP	275.3	260.3 (86%); 231.1 (8%); 123.2

^a Ions used for ion ratio measurements; the relative abundance is shown in parentheses.

same amount of organic phase was added to the remainder of the tissue sample and the extraction was repeated. The combined organic phases were kept at $\leq -15^{\circ}\text{C}$ for at least 1 h.

TMP analysis. Five grams of kidney, liver and muscle tissue (or 2.5 g for fat + skin tissue) were weighed into a plastic centrifuge tube and 250 μL of the $2\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ IS working solution (125 μL for fat + skin) and 3 mL of 0.1 M acetic acid in water were added. The sample was vortex-mixed for 15 s after the addition of each standard solution or reagent. To the sample was added 1 mL of 2 M KOH and the pH was measured using pH indicator paper. If the pH fell out of the range 10–14, another 1 mL of the 2 M KOH solution was added and the pH of the sample was checked again. After the sample had been vortex-mixed, it was further analysed as described for SDA analysis.

2.5. Solid-phase clean-up

SDA analysis. NH_2 procedure. The NH_2 cartridge was preconditioned with 3 mL of hexane, followed by the application of the organic tissue extracts obtained during the tissue extraction step. After passage through the cartridge, the ethyl acetate extract was collected into a small Pyrex centrifuge tube. The NH_2 column was further washed with 6 mL of methanol, which was also collected in a centrifuge tube.

SCX procedure. After the preconditioning of the SCX cartridge with 3 mL of hexane and 6 mL of a 5% solution of acetic acid in ethyl acetate, the collected tissue extract and the methanol washings from the NH_2 cartridge were applied onto the SCX column. The column was washed with 6 mL of water and 12 mL of methanol, followed by the elution of SDA and the IS with 3 mL of a 25% solution of concentrated ammonia in methanol. The eluate was concentrated to dryness under a gentle stream of nitrogen at a temperature of $40\text{--}45^{\circ}\text{C}$. The dry residue was dissolved in 200 μL of the aqueous part of the mobile phase and the sample was vortex-mixed for 15 s. The dissolved residue was centrifuged for 1 min at 10 800 rpm. The clear supernatant was transferred into an autosampler vial and a 50 μL aliquot was injected onto the HPLC column.

TMP analysis. Prior to solid-phase extraction, 2 mL of glacial acetic acid were added to the organic tissue extract, which was obtained during the liquid–liquid extraction procedure.

The SCX column was preconditioned with 3 mL of hexane and 6 mL of a 5% acetic acid solution in ethyl acetate. The organic tissue extract was subsequently applied onto the extraction column, followed by a washing step with 6 mL of water and 12 mL of methanol. TMP and the IS were finally eluted using 3 mL of a 25% solution of concentrated ammonia in methanol.

The organic eluate was evaporated to dryness at 60°C under a gentle stream of nitrogen. The dry residue was dissolved in 250 μL of the aqueous part of the mobile phase and centrifuged for 1 min at 10 800 rpm. The clear supernatant was transferred into an autosampler vial and a 100 μL aliquot was injected onto the HPLC column.

2.6. Method validation

The linearity of the method was evaluated by analyzing calibration graph samples. Samples for the calibration graphs were prepared by spiking blank tissues from pigs which did not receive any medication with SDA and TMP. The addition of 250 μL (or 125 μL for fat or fat + skin tissue) of each of the above mentioned standard working solutions resulted in SDA

concentrations of 50, 100, 200, 500 and 1000 ng g^{-1} and in TMP concentrations of 25, 50, 100, 200 and 500 ng g^{-1} . The calibration graph samples were treated in a similar way to the unknown samples. Peak area ratios between SDA or TMP and their respective IS were plotted against the corresponding concentration ratios (SDA:IS and TMP:IS).

Within-day precision was evaluated by analyzing six blank tissue samples, which were spiked with SDA and TMP at three different concentrations (MRL, half the MRL and double the MRL), on the same day.

The limit of quantification (LOQ) was defined as the lowest concentration of SDA and TMP for which the method is validated with an accuracy and precision that fall within the recommended ranges (accuracy: -20 to $+10\%$, precision: relative standard deviation (RSD) $< \text{RSD}_{\text{max}}$ with $\text{RSD}_{\text{max}} = 2(1 - 0.5 \log \text{Conc}) \times 2/3$).^{14,17} The LOQ was also established as the lowest point of the calibration graph.

The limit of detection (LOD) was defined as the lowest concentration of SDA and TMP that could be recognized by the detector with a signal-to-noise ratio ≥ 3 . The noise was determined by analyzing blank tissue samples. The LOD values were calculated, based on a signal-to-noise ratio of 3, for spiked tissue samples.

The selectivity of the method was demonstrated by analyzing blank tissues from two pigs (negative samples) and injecting solutions of several sulfonamides and TMP analogues onto the HPLC column at a concentration of $10\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ (cross-contamination). The chromatographic conditions were the same as those used for the analysis of SDA and/or TMP.

3. Results and discussion

3.1. Internal standardization

In order to enhance the precision and accuracy of the analysis, internal standardization was performed. During preliminary experiments, several sulfonamides were evaluated as candidate IS for the analysis of SDA (Fig. 1A). SMZ (Fig. 1B) was

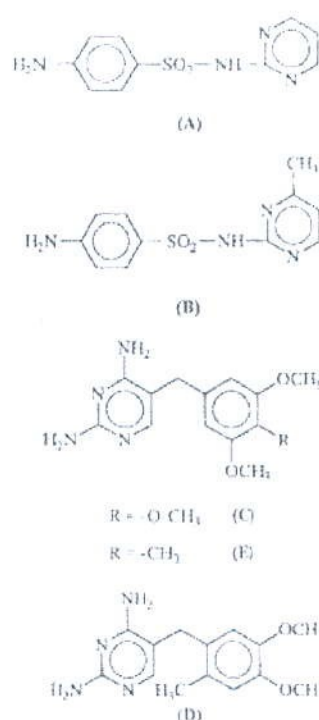


Fig. 1 Chemical structures of sulfadiazine (A), sulfamerazine (B), trimethoprim (C), methyltrimethoprim (D) and ornithoprim (E).

retained because it elutes closely to the analyte of interest, behaves similarly during the sample preparation procedure and is detectable under the same conditions as the analyte.¹⁸

For TMP (Fig. 1C) analysis, two compounds which were not commercially available, *viz.*, 2,4-diamino-5-(3,5-dimethoxy-4-methylbenzyl)pyrimidine or methyltrimethoprim and 2,4-diamino-5-(4,5-dimethoxy-2-methylbenzyl)pyrimidine or ormetoprim, were evaluated as candidate IS (Fig. 1D and E). To elute methyltrimethoprim (MTMP) within a reasonable time (<30 min) gradient elution was necessary. Ormetoprim (OMP), which was more structurally related to TMP than MTMP, eluted within 2 min of the elution position of TMP under isocratic conditions. Therefore, OMP was chosen as the IS for TMP analysis.

3.2. Tissue extraction and clean-up

The critical step in all sulfonamide residue methods is the clean-up procedure, especially since sulfonamides have amphoteric properties (Fig. 2). Hence, for the extraction of SDA and SMZ in an organic solvent, the pH should be kept between 5.0 and 5.2, where both drugs are uncharged compounds.⁵ This condition is fulfilled since a pH of 5 is obtained after the addition of 0.1 M acetic acid to the tissue samples.

TMP, which has a pK_a value of 7.2, is best extracted into an organic solvent in alkaline medium. A pH value of >10 is obtained by adding ≥ 1 mL of 2 M KOH to the initially acidified tissue extract.

In an effort to eliminate residues of interfering compounds, the organic tissue extracts were further purified by performing a solid-phase extraction. In a preliminary phase of our work, a single-stage solid-phase clean-up was performed, using strong cation-exchange (SCX) columns for both SDA and TMP analysis. Interference-free extracts were obtained for the analysis of TMP. The SDA tissue extracts, however, were not clean enough to allow a proper quantification of this compound. Moreover, injection of many dirty extracts would accelerate the deterioration of the HPLC column. This problem was resolved by performing an additional solid-phase extraction step, using an NH_2 column prior to the SCX extraction step.

3.3 Chromatography

HPLC-UV analysis. In Fig. 3 the chromatograms of the HPLC-UV analysis of a blank kidney sample (A: SDA analysis, B: TMP analysis) and of a blank kidney sample spiked with SDA (Fig. 3C) and TMP (Fig. 3D) and their respective IS are depicted. Fig. 3E and F shows the results of the HPLC-UV analysis of an incurred kidney sample from a pig that received TRIMAZIN 30% Kela (dose rate 25 mg SDA $kg\ BW^{-1}\ day^{-1}$ and 5 mg TMP $kg\ BW^{-1}\ day^{-1}$ for five consecutive days) and that was slaughtered at 1 day after cessation of medication.

As can be seen, SDA and the IS SMZ are well separated from each other and from endogenous compounds present in the extract. TMP and OMP elute well separated from each other

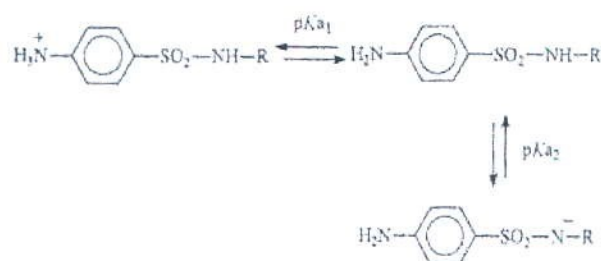


Fig. 2 Amphoteric properties of sulfonamides.

too, but the OMP peak is not completely baseline-separated from an endogenous compound peak present in the kidney extract. The same phenomenon, although less pronounced, was also observed for the other tissue extracts. However, this small interference does not influence the reliability of the quantitative results in a negative way as can be seen from the validation results in Table 2.

In order to allow the elution of late eluting peaks the chromatographic run for the analysis of SDA was elongated to 30 min, which is still an acceptable run time.

Special care was devoted to the choice of the mobile phases. We preferred to use mobile phases containing volatile buffers (1% acetic acid in water for SDA analysis and 0.25% triethylammonium acetate in water for TMP analysis) to allow a simple transfer of the HPLC-UV methods to the LC-MS system.

LC-MS/MS analysis. The EU has recommended some type of mass spectrometry for confirmatory purposes to increase specificity. Hence, a LC-APCI-MS/MS system was used for the identification of the compounds of interest in some preselected incurred tissue samples.

The methodological cross-over between HPLC-UV and LC-APCI-MS/MS was simple since no modifications were necessary. The same column was used and the samples could be injected on both systems after the same extraction procedure. Initially, the LC-MS was operated in the full scan MS mode. The full scan APCI mass spectra, however, were devoid of

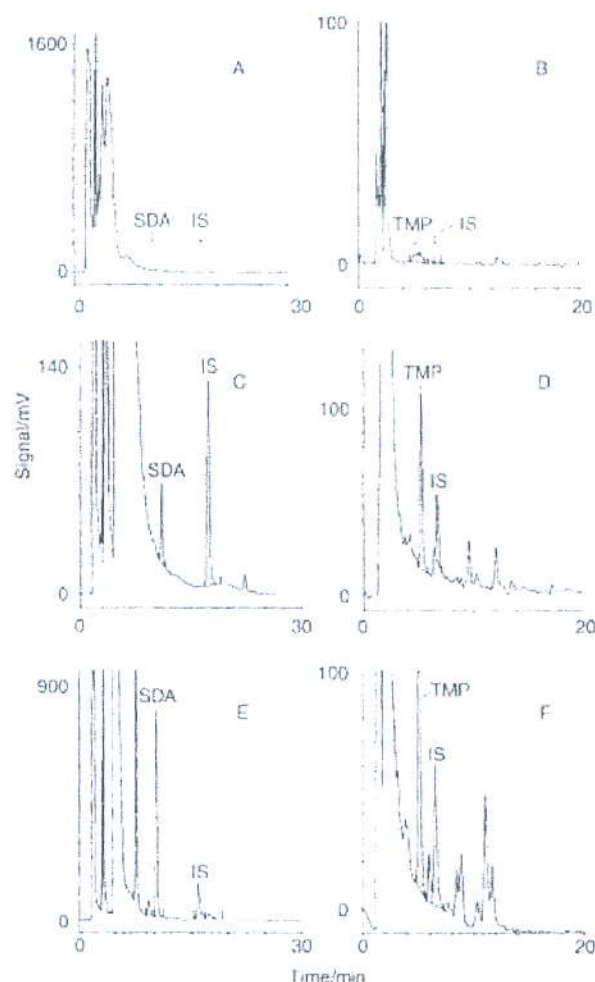


Fig. 3 LC-UV traces of the analysis of blank kidney (panel A: SDA analysis, panel B: TMP analysis), blank kidney spiked with SDA (100 $ng\ g^{-1}$, panel C) and TMP (50 $ng\ g^{-1}$, panel D) and an incurred kidney sample (panel E: SDA, concentration 1100 $ng\ g^{-1}$, panel F: TMP, concentration 254 $ng\ g^{-1}$).

much structural information, since they generally contained a strong molecular ion signal ($[M - H]^+$ at a m/z value of 251.3 for SDA, 265.3 for SMZ, 291.3 for TMP and 275.3 for OMP) and very small signals from fragment ions. By operating the LC-MS in the MS/MS scanning mode, product ion spectra were afforded which contained at least three product ions. Some of these product ions were used for ion ratio measurements.

In comparison to the LC-UV chromatograms, the total ion chromatograms (TIC) were much cleaner and totally free from interferences from endogenous compounds.

The presence of SDA and TMP in the preselected incurred pig samples was confirmed since the LC-MS/MS data agreed with the following criteria, which are based on the EU Commission Decision No. 93/256¹⁴ and on the criteria applied in our laboratory: the retention times of the SDA and TMP peaks in the incurred samples were within a $\pm 3\%$ range of those in standard samples (Fig. 3C–F), the same product ions were present in the MS/MS full scan mass spectra of SDA and TMP in the incurred samples and the standard samples (Fig. 4A–D), and the relative abundance of the selected product ions in the mass spectra of SDA and TMP in incurred samples fell within a $\pm 20\%$ range of those in standard samples (Table 1).

3.3. Method validation

Linearity. The calibration graphs for SDA and TMP were linear over the concentration ranges tested (50–1000 ng g^{-1} and 25–500 ng g^{-1} , respectively) in all tissues (correlation coefficients ≥ 0.9994) as shown in Fig. 5. The bias for the recalculated concentration of all calibrators of the calibration graphs in kidney, liver, muscle, fat and fat + skin was within the required range of -20 to $+10\%$.¹⁷

Precision and accuracy. The within-day precision and accuracy results are presented in Table 2. As can be seen, the

RSD values for SDA and TMP were below the RSD_{max} values in all tissues. Moreover, the accuracy fell within the required range of -20 to $+10\%$.¹⁷

Limit of quantification. The LOQ was determined by analyzing spiked samples ($n = 6$) at a level of 50 ng g^{-1} of SDA and 25 ng g^{-1} of TMP. As the data for within-day precision and accuracy fell within the ranges specified, the LOQ for both compounds was set at these concentration levels.

The LOQ levels obtained are low enough to meet the EU requirements which impose the quantification of residues of veterinary medicinal products in foodstuffs (*i.e.* tissues) at levels which are as low as half the MRLs. Moreover, a LOQ of 25 ng g^{-1} for the determination of TMP in tissues is lower than the LOQ values reported in the literature.^{9,11}

Limit of detection. LOD values of 12, 38, 15 and 17 ng g^{-1} were obtained for the determination of SDA in kidney, liver, muscle and fat, respectively. For the analysis of TMP, the LOD values were as low as 22 ng g^{-1} in kidney, 18 ng g^{-1} in liver, 20 ng g^{-1} in muscle and 11 ng g^{-1} in fat + skin tissue.

Selectivity and specificity. The methods proved to be selective for SDA, SMZ and TMP since the chromatograms of blank tissues showed no interfering peaks from endogenous compounds eluting at the retention time of these drugs (Fig. 3 A and B). In the eluting zone of OMP an endogenous compound was observed in all tissues. However, as mentioned above, this interference did not influence the reliability of the quantitative results. The methods were also selective for SDA and TMP with respect to the interference from analogous compounds: the sulfonamides tested (sulfathiazole, sulfamerazine, sulfapyridine, sulfamethazine, sulfadoxine, sulfamethoxazole, sulfaquinoxaline and sulfadimethoxine) and TMP did not interfere with SDA. In addition, the TMP analogues (OMP and

Table 2 Validation results for the determination of SDA and TMP in various swine tissues using LC-UV

Matrix	SDA			TMP		
	Conc./ ng g^{-1}	Accuracy (%)	Precision ^a (RSD, %)	Conc./ ng g^{-1}	Accuracy (%)	Precision ^a (RSD, %)
<i>Kidney—</i>				<i>Kidney—</i>		
Calibration graph	$r = 0.9998$	0 → 1000	within -20 to 10%	$r = 0.9978$	0 → 500	within -20 to 10%
Accuracy and precision (within-run)		50	4.0		25	-8.5
		100	3.0		50	-7.7
		200	-8.5		100	3.9
LOQ		50	-15.0		25	-9.0
LOD		12.5			21.6	
<i>Liver—</i>				<i>Liver—</i>		
Calibration graph	$r = 0.9999$	0 → 1000	within -20 to 10%	$r = 0.9995$	0 → 500	within -20 to 10%
Accuracy and precision (within-run)		50	-15.7		25	6.0
		100	1.7		50	8.0
		200	6.3		100	-2.2
LOQ		50	-17.0		25	8.5
LOD		36.7			18.1	
<i>Fat—</i>				<i>Fat + skin—</i>		
Calibration graph	$r = 0.9994$	0 → 1000	within -20 to 10%	$r = 0.9996$	0 → 500	within -20 to 10%
Accuracy and precision (within-run)		50	8.3		25	-3.5
		100	-5.7		50	-4.8
		200	8.1		100	1.4
LOQ		50	-8.7		25	-11.6
LOD		16.7			11.4	
<i>Muscle—</i>				<i>Muscle—</i>		
Calibration graph	$r = 0.9998$	0 → 1000	within -20 to 10%	$r = 0.9997$	0 → 500	within -20 to 10%
Accuracy and precision (within-run)		50	-17.0		25	10.0
		100	-1.8		50	-10.0
		200	7.1		100	-8.8
LOQ		50	-17.0		25	10.0
LOD		15.0			20.0	

^a RSD max: 18.6, 16.7, 15.1 and 13.6% for a concentration of 25, 50, 100 and 200 ng g^{-1} , respectively.