



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-025146- -00004-0000

Fecha: 2012-10-26 08:45:33 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 2 PATENTES Eve. 1 REGDEPOSITO
Act. 608 MODIFICASOLICIT Folios: 25

CIÓN 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 ☒

LIMOR DE COLOMBIA S.A.

Nombre o denominación // Nombre o razón social completa

LIBARDO MOJICA ROJAS

Nombre representante legal

Tipo de empresa

Micro ☐

Pequeña ☐

Mediana ☒

Otra ☐

Documento de identificación:

☐ C.C.

☐ C.E.

☒ NIT

☐ Otro Número 800.238.326

Nacionalidad/País de constitución	Dirección y domicilio del titular	Ciudad
COLOMBIA	AV 15 106 32 PH 2	BOGOTA
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
lmojica@limorcolombia.com	6207947	6201023



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:

FORERO BARRIOS MARCELA

39.782.768

55.032

Apellidos y Nombre

Documento de identificación

Tarjeta profesional

Dirección y domicilio	Ciudad	
AV 15 106 32 PH2	BOGOTA	
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
mforero@limorcolombia.com	6207947	6201023

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 08 - 025146

4. Datos del trámite

Corrección:

Expediente No 08-25146

Aparece Título: Compuesto antigénico multiproteico proveniente de glándula salival, intestino y saco vitelino de larva de *Boophilus microplus*, procedimiento para su fabricación y vacuna elaborada a partir

Debe ser Título: Procedimiento para obtener antígeno multiprotéico proveniente de glándula salival, intestino y saco vitelino de larva de *Boophilus microplus* y vacuna elaborada a partir de este antígeno

Modificación:

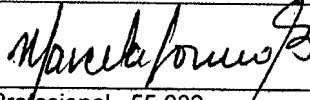
- ☒ Modificación al capítulo reivindicatorio.
Ver Anexo _____
- ☒ Modificación al capítulo descriptivo.
Ver Anexo _____
- ☒ Modificación al resumen.
Ver Anexo _____
- ☐ Modificación a los dibujos.

- ☐ Modificación al solicitante.

5. Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación
- ☐ Poder, si fuere el caso.
- ☒ Documento que contiene las modificaciones o correcciones.
- ☐ Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético.

6. Firma

Nombre y apellidos MARCELA FORERO BARRIOS	Firma 
C.C 39.782.768	Tarjeta Profesional 55.032

Señores
 SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
 Dr. José Luis Salazar López
 Director de Nuevas Creaciones

E. S. D.

Ref. Expediente 08-025146

Solicitud de Patente de Invención

Nuevo Título solicitado: "Procedimiento para obtener antígeno multiprotéico proveniente de glándula salival, intestino y saco vitelino de larva de *Boophilus microplus* y vacuna elaborada a partir de este antígeno"

Trámite: Respuesta a Requerimiento – Concepto Técnico No. 10670 de 2012

MARCELA PATRICIA FORERO BARRIOS, conocida apoderada de la sociedad solicitante LIMOR DE COLOMBIA S.A. en el asunto de la referencia, estando en la debida oportunidad procesal, y en ejercicio de la prórroga solicitada, me permito dar respuesta al requerimiento - concepto técnico No. 10670 de 2012, notificado mediante fijación en lista No. 343 de 20/06/20, en los siguientes términos:

I. No es una invención

En relación con la observación del señor examinador sobre si el antígeno reivindicado se circunscribe a lo establecido en el literal b) del artículo 15 de la Decisión 486 de 2000, me permito manifestar que, debidamente autorizado por mi poderdante, desisto de la reivindicación 1.

II. En cuanto a la claridad de la solicitud

Reivindicaciones

En atención a la sugerencia del señor examinador, se ha modificado el título de la presente solicitud, el cual pasa a ser el que se incluye en el epígrafe de este memorial, es decir: "Procedimiento para obtener antígeno multiprotéico proveniente de glándula salival, intestino y saco vitelino de larva de *Boophilus microplus* y vacuna elaborada a partir de este antígeno"

En cuanto a la recomendación de dejar la reivindicación 3 como independiente incluyendo las características esenciales de la reivindicación 1, se ha modificado la redacción de la citada reivindicación 3, cambiando también la expresión compuesto antigénico multiprotéico por el de antígeno multiprotéico.

Debidamente autorizado por mi poderdante se ha modificado también la reivindicación 2 acorde con la eliminación de la reivindicación 1, y se ha reenumerado en consecuencia todo el capítulo reivindicatorio.

Respecto de las sugerencias de incorporar en el capítulo descriptivo una explicación detallada sobre la carencia de tres proteínas de 35 kDa, 13 kDa y 6.5 kDa provenientes de glándula salival y una proteína de 27 KDa proveniente de intestino, así como el soporte de uso de la filtración tangencial; muy respetuosamente solicito que se esté a la precisa descripción que de la misma se hace en la página 13 de la solicitud original, cuando se menciona que esa ultra filtración tangencial de las proteínas extractadas de cada órgano se hizo en Sistema Pellicon con membrana hidrofílicas PVDF de punto de corte de 50 kDa y que mediante este sistema se eliminaron las proteínas identificadas como inhibitorias del sistema inmune del bovino con pesos 35 kDa, 13 kDa y 6.5 kDa provenientes de glándula salival y de 27 KDa proveniente de intestino, es decir, todas con peso molecular por debajo de 50 kDa. Esa eliminación de las moléculas inmunosupresoras se corroboró por ELISA I para detección de anticuerpos antigarrapata, enunciada en la página 15 de la solicitud original, demostrándose la mínima o nula presencia de supresores del sistema y por la Prueba de establo para evaluar la efectividad de la vacuna. Se acepta la indicación del señor examinador y se incluye para mayor sustento, en "Pruebas de Inmunosupresión" del Capítulo descriptivo, lo referente a la comprobación de eliminación de dichas proteínas.

En lo que se refiere a la objeción del señor examinador en el sentido de eliminar la frase "inhibitorias del sistema inmune del huésped", se admite su orientación y en su reemplazo se pone a consideración la utilización la palabra "inmunosupresora", toda vez que los estudios de inmunidad celular descritos en la página 12 de la solicitud original demostraron la presencia de proteínas provenientes de las glándulas salivares y del intestino de la larva, con pesos moleculares comprendidos entre 6,5 y 35 kDa, que tenían como particularidad o propiedad que inducían en los bovinos huéspedes parasitados por garrapatas del género *Boophilus microplus*, un efecto anticoagulante, antiinflamatorio e inmunosupresor; por lo que se procedió a su aislamiento con el objeto de eliminarlas.

Igualmente, se corrigió el error de digitación consistente en la repetición de la palabra "de" en la antigua reivindicación 2 paso b, que en la nueva numeración corresponde a la reivindicación 1 paso b.

De igual forma, se ha eliminado la expresión “farmacéuticamente aceptables para el inmunopotenciador, el preservativo y el adyuvante de la antigua reivindicación 3 y que en la nueva numeración corresponde a la reivindicación 2. Es menester aclarar que, el uso de inmunomoduladores, adyuvantes y preservativos es propio del desarrollo de vacunas en el campo humano o animal, sin embargo, la particularidad radica en la elección de alguno de ellos para combinarlos con un material antigénico de unas determinadas características propias y únicas, que permiten dar mayor potencia, durabilidad de sus efectos, disminución de reacciones adversas y garantía de total inocuidad y esterilidad. De hecho existen documentos que han merecido la protección de patentamiento que expresan una serie de adyuvantes combinados con el material antigénico, que se enuncian como “conocidos en el arte” y contemplan el uso de preservativos “adecuados” e inclusive citan marcas comerciales. Por la presente solicitud no pretendemos reivindicar tales adyuvantes, sino su presencia en unión del componente activo principal que es el antígeno de las características ya anotadas.

A manera de ejemplo podemos citar la Patente US No. 5.344.645 que tiene una reivindicación independiente de una vacuna que comprende un antígeno combinado con un “vehículo farmacéuticamente aceptable” y una reivindicación dependiente en la que ese vehículo se selecciona de un “grupo de adyuvantes, inmunopotenciadores y diluyentes”.

Se dio especial énfasis en el uso del aceite mineral o aceite mineral mezclado con un coadyuvante de emulsión y, específicamente, al aceite cuya base es el oleato de manitol conocido como Montanide ISA 51, mencionado en la página 15 de la solicitud original, dada la potencialización evidenciada en los estudios de campo realizados. Incorporamos esta aclaración del producto Montanide en el capítulo descriptivo, tal como lo solicita el señor examinador.

También se empleó como adyuvante liposomas o microesferas huecas formadas por una o varias bicapas de lípidos, a fin de que éstas engloben el antígeno y generen una liberación lenta del mismo.

En relación con el uso de preservativos, se ratifica el uso del formaldehído tamponado dada su efectividad para los fines requeridos, por lo que resulta de uso generalizado en la industria. Sin embargo, a nivel experimental incluimos en el capítulo descriptivo el uso como preservante de distintas concentraciones de Bromo- etilamina BEI, cuya acción implicó la imposibilidad de replicación de cualquier patógeno que pudiese estar presente.

Incluimos esta aclaración del Bromo- etilamina BEI en el capítulo descriptivo, tal como lo solicita el señor examinador.

En relación con la anotación que hace el señor examinador sobre el uso de la Listerio Lisina LLO como inmunopotenciador inactivado extractado a partir de *Listeria monocytogenes* en un rango entre 0.5 µg y 0.1 µg por mililitro, consideramos que la confusión radica en el texto de “Escalamiento Industrial” dentro del Capítulo Descriptivo, toda vez que Listerio Lisina LLO se usó y se probó, así como los adyuvantes y de los preservativos en la elaboración de la vacuna. Posteriormente se hicieron otros hallazgos y ensayos para analizar el procedimiento de elaboración del antígeno omitiendo algunos pasos, pero que no se están reivindicando. En atención a esta anotación del señor examinador consideramos conducente precisar el texto de “Preparación de anticuerpos policlonales de captura en huevo de gallina para aislar los antígenos blanco seleccionados de intestino, glándula salival y saco vitelino” y “Escalamiento Industrial”.

De la misma forma, se han atendido las sugerencias del señor examinador en el sentido de eliminar la palabra Formol, que por error mecanográfico se repitió y debidamente autorizado por mi poderdante, desisto de la reivindicación 9.

Por todo lo anteriormente expresado me permito anexar un nuevo resumen de la invención e incluir en el capítulo descriptivo las explicaciones más detalladas que han sido solicitadas por ese Despacho. Así mismo, acompaño un nuevo capítulo reivindicatorio cuyo alcance no excede el originalmente planteado en la solicitud, para lo cual anexo el formulario único de modificación de solicitudes en curso, y el recibo que acredita el pago de las tasas aplicables al trámite en cuestión.

Descripción

Incluimos las dos letras que identifican las patentes establecidas como antecedentes en la solicitud original, así:

AU - 19860059707 J.P. Opdebeeck (Abstract of corresponding document: **EP0208507**)

US - 5587311 de Cobon y Col, que coincide con el documento identificado como D1 en el examen de patentabilidad hecho por ese Despacho.

US - 5344645 Stephen K. Wikel .

US - 20070031411 A. Trimnell

Tal como lo pide ese Despacho, incluimos en el capítulo descriptivo una breve explicación de las gráficas previstas en las páginas 16 y 17 de la solicitud original.

III. Examen de Patentabilidad

Nivel Inventivo

En lo que se refiere a la valoración de los requisitos de patentabilidad, en particular a la supuesta carencia de Nivel Inventivo de la solicitud por obra de la anterioridad de los documentos D1 a D3 citados por el examinador, de manera respetuosa manifiesto que no comparto la tesis mencionada, pues considero que la materia reivindicada no se deriva de manera evidente de dicho arte anterior, ni resulta obvia para una persona medianamente versada en la materia.

El problema que pretende resolver la vacuna descrita en la solicitud, corresponde en realidad a la de obtener una preparación vacunal que contiene un antígeno integrado de múltiples proteínas, con secuencia de agresión de los distintos sistemas o estructuras fundamentales del parásito y sin interferencias inmunosupresoras.

Así, se pretende superar el material antigénico conocido hasta el momento, los cuales producen anticuerpos exclusivamente contra la estructura que específicamente se le ha presentado al sistema inmune del insecto, llámese intestino, ganglión, etc.

A nivel inmunológico no son semejantes o equivalentes vacunas cuyos antígenos son mono o biprotéicos respecto de aquellos multiprotéicos, pues la diferencia con éstos últimos radica en el uso de un complejo de proteínas que por sí mismo está dirigido a la producción de anticuerpos contra los distintos órganos de la garrapata, garantizando así un amplio espectro de ataque y no solo agresión a una estructura orgánica como en D1, respecto de la fracción de intestino que secuenciaron y clonaron, o como en D2, respecto de la pro-catepsina de yema aislada y producida en monoclonales; con el eventual riesgo de creación de resistencia a la inmunización por mutación de la estructura blanco, situación de nula probabilidad cuando la citada estructura blanco es la casi la totalidad del organismo.

Es por ello que los resultados del efecto de esta vacuna sobre *Boophilus microplus* es de mayor espectro frente a los productos elaborados, por ejemplo, a partir del antígeno intestinal recombinante Bm86, por lo que los anticuerpos producidos están dirigidos principalmente contra el intestino, habiéndose reportado casos de cepas de muy baja susceptibilidad a la inmunización y por ende baja efectividad, debiendo aislar años más tarde, nuevos antígenos recombinantes como el Bm95 con el mismo riesgo.

Cabe recordar que todas las proteínas generan anticuerpos, es decir todas las proteínas crean una respuesta inmune. Sin embargo, NO todos los anticuerpos generados por la respuesta inmune son protectivos, es decir, que realmente tienen acción sobre el parásito. De ahí que represente gran avance en la vacuna que se reivindica, el haber podido establecer en el antígeno esas múltiples proteínas provenientes del estado larvario de la garrapata *Boophilus microplus*, que generen esa específica reacción protectora al animal inmunizado.

El antígeno de la composición vacunal de la solicitud contempla proteínas inmunogénicas no descritas en el arte anterior a nivel de sistema digestivo y reproductivo, cuya eficiencia representa un avance técnico frente a los productos anteriores que focalizaban su acción hacia fracciones del intestino y glándula salival del animal, a los cuales éste también ataca; con la ventaja de combinarlos superando interferencias a la respuesta inmune que se habían encontrado en anteriores investigaciones, además de potencializar el efecto de control del parásito, no sólo con la muerte del animal sino con la drástica ruptura del ciclo reproductivo por la vía de la disminución de oviposición y la infertilidad de huevos, logrando con un esquema de vacunación en el largo plazo potreros limpios del ácaro.

NO puede inferirse que de la existencia del Documento D1 o D2 se derive que si una proteína antigénica de una parte de la larva otorga inmunización, el conjunto de otras poliproteínas también lo haga. De otra forma, la existencia por sí misma de la vacuna a partir de la proteína BM86 proveniente de intestino de garrapata hubiere limitado a futuro cualquier otro avance en materia de biológicos contra ese insecto, bajo la premisa que es una proteína obtenida a partir de una parte del parásito. El nivel inventivo de la presente solicitud radica en las características del antígeno, la metodología de su preparación y la composición vacunal fabricada con ese antígeno, sus efectos y margen de seguridad sobre la población animal vacunada, y la no creación de resistencia en los bovinos inmunizados por su condición poliprotéica.

En D1 se menciona como estado del arte (col 2 , líneas 2-4 16-21) el reporte de uso de antígenos derivados de glándula salival e inmunización con extractos de intestino de garrapata que hubieran sido obstáculo para su patentamiento, en la medida en que se podría pensar que sus hallazgos fueron derivados de manera obvia de esas investigaciones precedentes que se referían a proteínas inmunogénicas procedentes de los mismos órganos.

Si el tema fuese sencillo y resultara en forma evidente que, si una proteína de una parte del animal otorga inmunización otra u otras proteínas de ese mismo órgano o de otros órganos también lo hacen, eso sin entrar a hacer consideraciones sobre variedades de especie de garrapata y homología entre ellas; habría control sobre las poblaciones de este parásito. Empero, no es así y luego de varias décadas de investigación, hoy día sigue existiendo una problemática de la garrapata sin resolver en las ganaderías tropicales del mundo.

Es claro que en materia de inmunología, a diferencia de las matemáticas, no siempre tener más proteínas conformando el antígeno implica mayor protección, pues dada la complejidad de este sistema es menester analizar las reacciones de interferencia.

El nivel inventivo de la presente solicitud radica en la combinación de proteínas antigénicas purificadas e identificadas por sus pesos moleculares, algunas provenientes de órganos descritos en el arte anterior, sin que se haya creado resistencia en los bovinos inmunizados, es decir, sin la existencia de interferencias y bloqueos de respuesta inmune al integrar múltiples proteínas inmunogénicas.

En el estado de la técnica y en muchos informes técnicos de dominio público, entre ellos, el documento EP208507 publicado el 14/01/1987 sobre vacuna que comprende material antigénico derivado del ganglión nervioso central de garrapata enuncia la presencia de componentes inmunosupresivos en un antígeno homogenizado de la totalidad de la garrapata adulta y reitera que el uso de la totalidad del cuerpo de la garrapata interfiere con la generación de una respuesta inmune efectiva. Supone lo expuesto que se reportaban sin resolver dificultades, ante la existencia de obstrucciones e interrupciones de respuesta inmune al integrar múltiples proteínas inmunogénicas.

Con el fin de resolver el problema en cuestión, mediante estudios de inmunidad celular se identificaron, aislaron y eliminaron proteínas que inducían en los bovinos huéspedes parasitados por garrapatas del género *Boophilus microplus* un efecto anticoagulante,

antiinflamatorio e inmunosupresor. Estas proteínas de pesos moleculares comprendidos entre 6,5 y 35 kDa, tenían su origen paradójicamente en el intestino y las glándulas salivares del parásito, órganos estos de donde también se determinaron y aislaron ocho (8) de las proteínas inmunogénicas protectoras siendo las otras tres (3) provenientes de saco vitelino. Con la exclusión de estas cuatro (4) proteínas se logró eliminar las reacciones adversas de inmunosupresión, comprobadas por ELISA-I para detección de anticuerpos antigarrapata y por pruebas controladas de establo con animales inmunizados e infestados artificialmente con *Boophilus microplus* que mostraron un muy alto efecto protector contra las garrapatas al momento del reto.

En relación con el nivel inventivo de esta solicitud, está lejos de considerarse un simple ajuste de proporciones de antígeno, adyuvantes o preservativos previamente conocidos, o una alternativa de las muchas conocidas en el arte anterior. El elemento antigénico que contiene, el procedimiento de su elaboración y la preparación vacunal elaborada a partir de él incluye avances significativos, como es la determinación de nuevas proteínas antigénicas, confirmada su separación por medio de electroforesis SDS-PAGE y su acción inmunológica mediante inmunoDot Blot y Western Blot y la determinación y eliminación de material inmunosupresor como avance significativo a las limitaciones existentes.

En relación con el uso de inmunopotenciadores, preservativos y adyuvantes, se reitera, es un tema común en la preparación de vacunas y en su producción industrial, por lo que su utilización no puede considerarse que resta nivel inventivo. La particularidad radica en la elección de alguno de ellos para combinarlos con un material antigénico de unas determinadas características propias y únicas, que permiten dar mayor potencia, durabilidad de sus efectos, disminución de reacciones adversas y garantía de total inocuidad y esterilidad.

Por la presente solicitud no pretendemos reivindicar tales inmunopotenciadores, adyuvantes o preservativos, sino su presencia en unión del componente activo principal que es el antígeno de las características ya anotadas, cuya combinación no había sido revelada en la literatura científica anterior.

De otra parte, que el procedimiento para obtener el antígeno no sea el resultado de una réplica de proteínas inmunogénicas a través de métodos de ingeniería genética como en D1, no limita su capacidad de patentamiento.

Los documentos de patentes sobre antígenos presentan etapas comunes como suspensión en buffer, centrifugación, etc... que son prácticas corrientes en el desarrollo

de antígenos, sin que ello les haya restado nivel inventivo. La especialidad de estos procedimientos y del contemplado en la presente solicitud es la elección de esas etapas, su secuencia y la aplicación sobre el material antigénico inicial cuyas características lo hacen único.

Un antígeno es por definición “una molécula, generalmente una proteína o un polisacárido, de superficie celular, que puede inducir la formación de anticuerpos”. Ello implica que su acción inmune proviene de un elemento de la naturaleza que previamente le ha sido presentado. Lo que varía en la producción del antígeno es qué elemento o elementos individualizo para ser expuestos al sistema inmune y el conjunto de pasos por los cuales lo hago.

El problema técnico expuesto de resistencia, efectos inmunosupresivos y baja respuesta inmune de otros antígenos del estado del arte que se identificaron, se superaron con la descripción del procedimiento que llevó a obtener un antígeno que ataca en forma secuencial las distintas estructuras del organismo contra el cual va dirigido, sin la presencia de los efectos negativos antes descritos, por efecto de la aplicación de unos pasos secuenciales en su obtención.

A lo dicho se agrega que la cumplida aplicación y seguimiento de las etapas descritas no sólo genera ventajas técnicas desde la perspectiva del procedimiento de obtención, sino que también las representa desde el punto de vista del antígeno que se obtiene mediante su aplicación. El seguimiento del proceso descrito permite obtener un alto grado de pureza pues no incorpora patógenos y no contiene información genética o residuos de microorganismos serviles, no provoca reacciones citotóxicas, no genera reacciones secundarias adversas y posee una gran estabilidad, conservando sus características físicas y químicas y su poder inmune al cabo del tiempo.

Por la presente solicitud no pretendemos reivindicar tales etapas en forma aislada, sino su presencia en una secuencia definida y en unión del material inmunogénico poliprotéico inicial, cuya combinación no había sido revelada en la literatura científica anterior.

Si bien algunas etapas pueden haberse revelado en el arte anterior, tales conceptos individualmente considerados y aún en combinación con enseñanzas generales del área técnica respectiva no motivarían efectivamente a derivar en forma obvia o evidente el antígeno multiprotéico resultante.

A manera de ilustración, en la extracción del elemento que se va a individualizar para presentar al sistema inmune del bovino, por tratarse de tejidos de órganos internos de la garrapata es menester retirar los elementos externos, en este caso la cutícula (en mayor o menor escala según se trate del estado larvario o estado adulto del animal); pero no por eso se ha afectado la patentabilidad de un sinnúmero de investigaciones en este campo a lo largo de los años.

Igualmente, en el cuadro comparativo de la presente solicitud con los documentos D1 y D3 se señala también la coincidencia en el uso de la técnica de electroforesis, sin que esta situación haya afectado la patentabilidad del documento D1 por la existencia previa del documento D3.

Es bien sabido que partiendo de materias conocidas pueden proponerse solicitudes novedosas e inventivas, merecedoras de protección por la vía de patente de invención, como ocurre en este caso respecto de la ingeniosa formulación reivindicada.

Así las cosas, si bien algunas características del objeto reivindicado pueden haberse revelado en el arte anterior, lo cierto es que el documento citado por el señor examinador -individualmente considerado y aún en combinación con enseñanzas generales del área técnica respectiva no motivarían efectivamente a derivar en forma evidente el objeto reivindicado.

Es bien sabido que partiendo de materias conocidas pueden proponerse solicitudes novedosas e inventivas, merecedoras de protección por la vía de patente de invención, como ocurre en este caso respecto de la ingeniosa formulación reivindicada.

Por considerar respetuosamente que las características de la formulación farmacéutica reivindicada y del proceso de obtención **no están reveladas ni pueden derivarse de manera obvia del documento que el señor examinador menciona en su documento**, bien sean en forma individual o combinada, y habida cuenta que el reclamado efecto sinérgico de la composición ha sido debidamente documentado tanto en la descripción original como en los documentos que la reemplazan, ruego tener por atendido el requerimiento que nos ocupa y proceder a conceder el privilegio de patente solicitado.

IV. Petición Especial

En el evento en que persistan para el Despacho dudas sobre la patentabilidad de la presente invención, invocando en lo pertinente el parágrafo 2º del artículo 45 de la Decisión 486 de 2000, solicito expresamente que se proceda a formular un segundo requerimiento que me permita profundizar los argumentos aquí planteados y expresar lo que en ese momento corresponda.

Señor Jefe de la División,



MARCELA PATRICIA FORERO BARRIOS

C.C. 39.782.768 de Bogotá

T.P.A. 55.032 del C.S.J.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención revela un procedimiento de elaboración de un antígeno multiprotéico purificado que induce una respuesta inmune contra la infestación de garrapatas *Boophilus microplus*, caracterizado por ser contener once (11) proteínas solubles antigénicas derivadas de glándula salival, intestino y saco vitelino de larvas de garrapata *Boophilus microplus* y por carecer de cuatro (4) moléculas inhibidoras del sistema inmune del huésped, distinguiéndose por la preservación y purificación de estructuras proteicas provenientes de los citados órganos. Así mismo, se revela la vacuna que contiene como componente activo el aludido antígeno resultante de este procedimiento, en combinación con un potenciador de la respuesta inmune consistente en Listerio Lisina LO inactivada extractada de *Listeria monocytogenes*, un preservativo y un adyuvante.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

PAGINAS 12 a 15

Pruebas de inmunosupresión: con el objeto de seleccionar las proteínas solubles que pudieran interferir con la respuesta inmune del bovino, se realizaron análisis citológicos de inmunosupresión in-vitro para determinar la inhibición de linfocitos T y B de bovino, inducida por las proteínas extractadas, midiendo la proliferación celular con Timidina Tritiada ([³H]TdR) (actividad específica 6,9 Ci/mM); usando como controles los mitógenos de concavalina A (Con A), Fitohemaglutininas (PHA) y Lipopolisacaridos (LPS) respectivamente. El procedimiento comienza con la colección de 30 ml de sangre anticoagulada con EDTA de bovino Holstein hembra de 18 meses, con el objeto de separar las células blancas; la sangre luego es centrifugada a 5000 rpm por 20 min a temperatura ambiente y con una pipeta de Pasteur se separan en un tubo nuevo, las células blancas que se encuentran en la capa intermedia entre el plasma y las células rojas; con el objeto de eliminar los remanentes de células rojas que por arrastre se colectaron con las células blancas, se someten a un choque hipotónico con agua destilada a 3°C por 1 min, luego estas son centrifugadas y descartada la fase acuosa, en seguida, el pellet de células blancas es resuspendido en 4 ml de PBS 1X pH 7,2 y colocado sobre la superficie de 4 ml de Ficoll-Hypaque, luego de centrifugar la suspensión a 6000 rpm por 45 min, las células blancas se cosechan del gradiente a un nuevo tubo y son entonces lavadas con PBS 1X pH 7,2; con ayuda de un hemocitómetro se diluyen en tubos a una concentración de 2×10^6 células/ml en medio RPMI 1640 (GIBCO-BRL), suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por 30 min a 56°C, 1% de una solución de Polimixina B/Amfotericina B y 2mM de L-Glutamina.

De la suspensión anterior, se toman 50 µl y se añaden por triplicado a una placa de poliestireno de 96 pozos fondo plano se incuban a 37°C por una hora a 95% de aire y 5% de CO₂; transcurrido el tiempo se agrega 50 µl de Con A (Sigma), a una concentración de 5 µg/ml y 10 µl de proteína purificada por electroforesis preparativa de cada una de las bandas obtenidas de cada uno de los órganos arriba mencionados; en concentraciones de 0,5 a 10 µg/pozo. Las placas controles contienen: células solas, células con proteína purificada de cada banda y células con Con A solamente; cada pozo se completó a 200 µl con medio RPMI 1640. Las placas se llevan a incubar a 37°C por 24 h, a 95% de aire y 5% de CO₂. Después de 24 horas cada pozo de los cultivos se pulsa con 1 µCi/pozo de [³H] TdR hasta 18 h antes de cosechar y llevar al contador de centelleo; la medición se fundamenta en la incorporación de [³H]TdR al núcleo celular de los linfocitos activados.

De la misma manera se prepararon cultivos en placa para medir la proliferación celular en presencia de PHA y LPS con la que se determinó proliferación de linfocitos B.

Con estas pruebas, se identificaron cuatro proteínas con pesos moleculares de 35 kDa, 27 kDa, 13 kDa y 6.5 kDa, tres identificadas en glándula salival (35 kDa, 13 kDa y 6.5 kDa) y una en intestino (27 kDa), con efecto inhibitorio sobre las células del sistema inmune del bovino, sin que se hayan identificado otras probables con efectos similares.

La presencia de estas cuatro proteínas inmunosupresoras provenientes de las glándulas salivares y del intestino de la larva, con pesos moleculares comprendidos entre 6,5 y 35 kDa, se corroboró que tenían como particularidad o propiedad que inducían en los bovinos huéspedes parasitados por garrapatas del género *Boophilus microplus*, un efecto anticoagulante, antiinflamatorio e inmunosupresor; por lo que se procedió, luego de su aislamiento, a eliminarlas. Esa eliminación de las moléculas inhibitorias se corroboró por ELISA I para detección de anticuerpos antigarrapata, que se enuncia más adelante, demostrándose la mínima o nula presencia de supresores del sistema. Para el efecto se determinó un punto de corte de esta prueba y los sueros de cobayo a anticuerpos antigarrapata estimulados por el antígeno resultaron positivos por ser mayor o igual al punto de corte, a diferencia de los sueros de animales control. Así también, fueron comprobados por la Prueba de establo para evaluar la efectividad de la vacuna, obteniendo una reducción de la producción de teleoginas en los bovinos vacunados con la composición de 44.31%, una inhibición de la oviposición de las garrapatas de 48,88%, una reducción de la Eclosión de los huevos de 69,02% y una inhibición de la reproducción de las garrapatas de 74,60%.

Preparación de anticuerpos policlonales de captura en huevo de gallina para aislar los antígenos blanco seleccionados de intestino, glándula salival y saco vitelino: previa concentración por ultra filtración tangencial en sistema Pellicon® con membrana hidrofílicas PVDF de punto de corte de 50 kDa (Pellicon XL Ultrafiltration Module Biomax 50 kDa 0.005 m2) Millipore® de las proteínas extractadas de cada órgano con el objeto de eliminar toda proteína de peso molecular $\leq$ a 50 kDa, dado que por debajo de este corte, se encuentran las proteínas identificadas como inhibitorias del sistema inmune del bovino.

Se toma una alícuota de 500 µg de proteína total concentrada de cada órgano (glándula salival, intestino y saco vitelino), y se emulsifica en adyuvante completo de Freud en proporción 1:1 v/v; con esta emulsión se inoculan 6 gallinas (dos por cada órgano) de postura raza Loman de 16 semanas de edad vía intramuscular (IM) con 0,5 ml de la

suspensión, usando el siguiente esquema de inmunización: primera dosis día cero con adyuvante completo de Freud, segunda dosis día 15 con adyuvante incompleto de Freud y un refuerzo al día 30 en solución salina fisiológica (S.S). La cosecha de huevos se hace al día 45 de iniciado el esquema de inmunización la extracción de los anticuerpos IgY específicos contra las proteínas solubles de intestino, glándula salival y saco vitelino de larva de garrapata se hace con el Kit EGGstract® de Promega siguiendo las recomendaciones de la casa productora.

Los anticuerpos obtenidos del protocolo anterior, son usados en las pruebas de Dot Blot con el propósito de probar la inmunogenicidad de las proteínas extractadas de cada órgano. Posteriormente, se realiza un Western Blot para determinar y seleccionar los antígenos que van a ser el compuesto inmunógeno multiproteico (vacuna para el control de la garrapata *Boophilus microplus*), a las proteínas solubles de mayor antigenicidad derivadas de los órganos arriba mencionados. Una vez seleccionadas las proteínas: cinco (5) proteínas con pesos moleculares de 209 kDa, 147 kDa, 94 kDa, 73 kDa, 68 kDa proveniente de intestino, de las cuales son proteínas simples la de 209 kDa y la de 68 kDa y las demás son glicoproteínas; tres (3) proteínas provenientes de glándula salival con pesos moleculares 130 kDa, 110 kDa y 66 kDa, de las cuales la de 110 KDa es una proteína simple y las otras dos son glicoproteínas; y tres (3) proteínas de saco vitelino con peso molecular de 160 kDa, 140 kDa y 85 kDa todas las cuales son glicoproteínas, se realizaron electroforesis preparativas no denaturnantes en SDS-PAGE al 12,5% con el objeto de obtener la mayor cantidad de proteína posible; una vez terminada la electroforesis se eluyeron las proteínas de interés de los geles y con estas por separado se inocularon nuevamente gallinas de raza Loman de 16 semanas de edad para producir anticuerpos policlonales IgY específicos para cada una de estas proteínas. (fig. 1, 2 y 3)

Los anticuerpos obtenidos con el protocolo anterior, serán inmovilizados en una columna de cromatografía de inmuoafinidad con matriz de Sepharosa (Sepharosa 4B CNBrS® - Pharmacia), como anticuerpos de captura de los antígenos blanco antes seleccionados.

Este antígeno multiprotéico resultante se le incorpora Listerio Lisina LLO inactivado extractado a partir de *Listeria monocytogenes* en un rango entre 0.5 µg y 0.1 µg por mililitro, a manera de sustancia que estimula y activa la respuesta inmune.

En la preparación vacunal se usaron adyuvantes oleosos para retener el antígeno en el lugar de aplicación para evitar su rápida absorción y haciendo una presentación más prolongada del antígeno al sistema inmune, logrando una más larga protección. Se utilizó

aceite mineral mezclado con coadyuvantes de emulsión cuya base es el oleato de manitol, conocido comercialmente con el nombre de Montanide ISA 51, que induce una fuerte respuesta linfoprolifereativa así como una respuesta celular inmunomediada alta. La precisa elección de este compuesto en la preparación vacunal obedece a su importante efecto de incrementar sinérgicamente con el antígeno la respuesta de los títulos de anticuerpos neutralizantes, así como, el de mantener prolongada la respuesta inmune del huésped inmunizado.

Para tal efecto se tomo el antígeno resultante del paso anterior, resuspendido en PBS y en una concentración de 500 µg por mililitro y se mezcló a partes iguales con Montanide ISA 50V.

Igualmente, se pudo hacer uso de un diluyente buffer fosfato y se empleó como adyuvante liposomas o microesferas huecas formadas por una o varias bicapas de lípidos, a fin de que éstas engloben el antígeno y generen una liberación lenta del mismo.

En la preparación vacunal se adicionó formaldehído tamponado en una concentración al 0,1% en volumen final por dosis con la adición de formaldehído tamponado a una concentración final de 0,1% por 24 horas a 37°C en agitación de 1500 rpm, a fin de conservar y mantener las condiciones óptimas del producto.

Se hicieron ensayos con doble uso de Bromo-etilamina BEI como preservante preparándolo en una solución de 3mM a 37°C durante 60 minutos y adicionándolo a la solución antigénica por 48 horas con agitación constante; cuya acción implicó la imposibilidad de replicación de cualquier patógeno que pudiese estar presente.

Escalamiento Industrial: Se ensayó de manera fiel llevar a escala industrial el protocolo desarrollado en esta invención, con resultados satisfactorios.

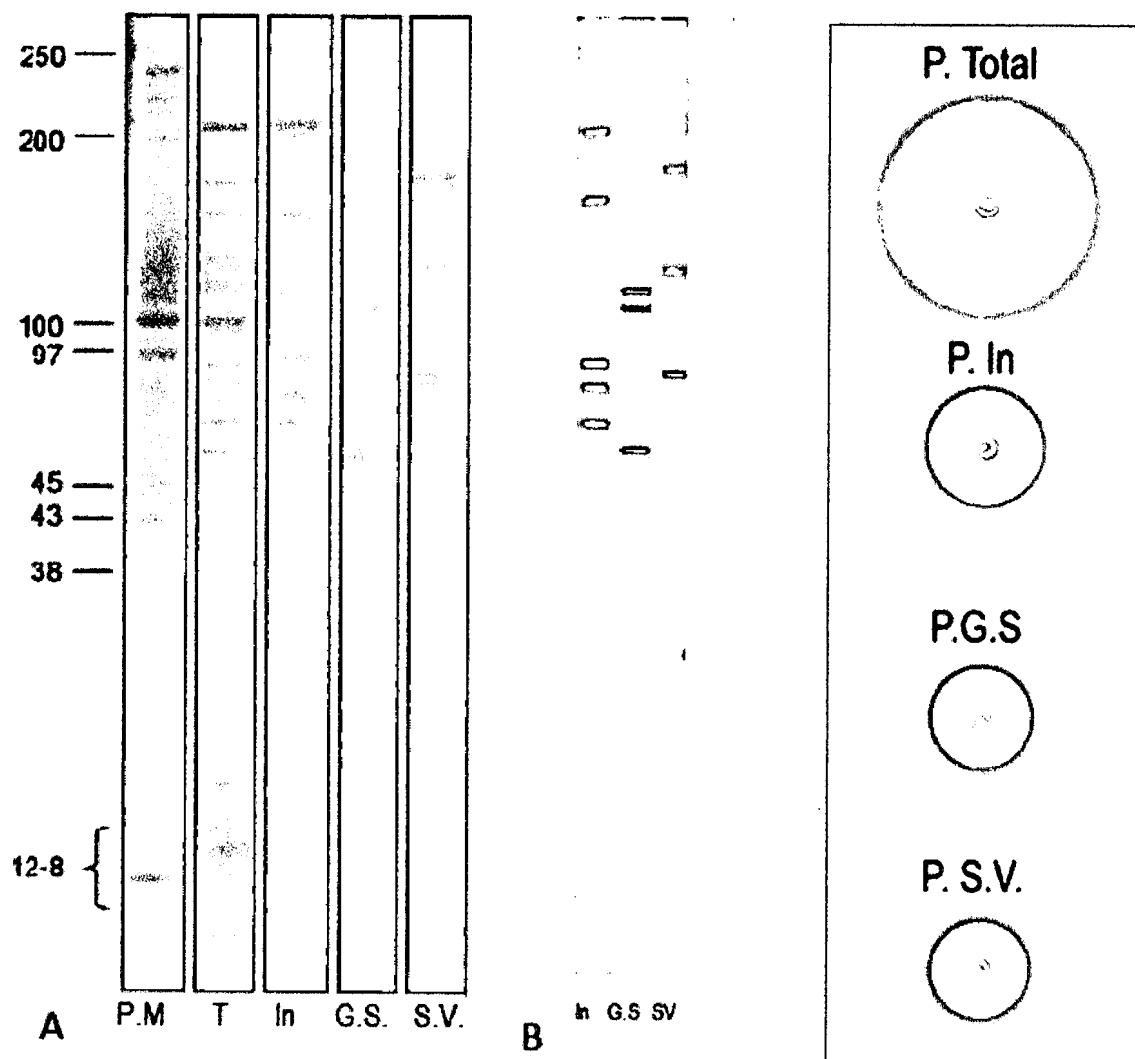
Así mismo, se ensayó omitir los pasos de micromanipulación y aplicar solamente los pasos de sacrificio de la larva, desquitinización y disrupción de órganos por acción del buffer Tripsina-verseno en presencia de las perlas de vidrio, obtención de membranas celulares en buffer hipotónico y posteriormente, la clarificación, concentración por ultrafiltración tangencial y la elusión purificada por cromatografía de inmutafinidad en columna, a escala industrial (BIO-RAD EASY PACK COLUMN®). Con este antígeno multiprotéico soluble purificado obtenido, se le incorporó Listerio Lisina LLO como inmunopotenciador inactivado extractado a partir de *Listeria monocytogenes* en un rango entre 0.5 µg y 0.1 µg por mililitro, como parte de la innovación de la propuesta, con formaldehído como

preservante y Montanide ISA 51 como emulsificante, se prepara la vacuna para el control de garrapatas *Boophilus microplus*. Igualmente, se puede hacer uso de un diluyente buffer fosfato y un portador liposomal. En concentración de 500 µg de proteína total soluble purificada por mililitro de producto oleoso.

Todos estos ensayos podrán ser amplificados para el manejo de hasta 100 a 300 g de larvas en un sólo proceso, que se puede aplicar en forma seriada, altamente eficiente y ampliamente económica en comparación a los procesos con anticuerpos monoclonales.

GRAFICAS

Anexo 1:



Figuras 1 – 3: A. Electroforesis de proteínas de *B. microplus*: P.M.: patrón de pesos moleculares, T.: electroferograma de las proteínas totales extractadas de *B. microplus*. In.: electroferograma de las proteínas extractadas del intestino. G.S.: electroferograma de las proteínas extractadas de glándula salival. S.V.: electroferograma de las proteínas extractadas de saco vitelino. **B. Western Blot** de las proteínas extractadas de intestino (In), glándula salival (G.S.) y saco vitelino (S.V.). **Dot Blot** de las proteínas extractadas de *B. microplus*: Proteína Total (P.T); Intestino (P.In); Glándula Salival (P.G.S.); Saco Vitelino (P. S.V.). La intensidad de color violeta y diámetro del disco son directamente proporcionales a la concentración de protéica.

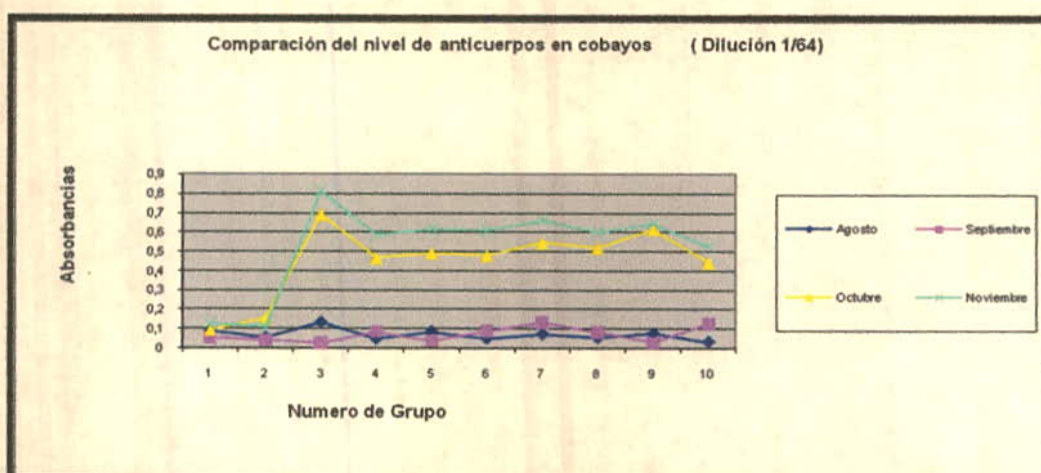


Figura 4: Gráfica del comportamiento inmunológico de los antígenos aislados de *B. microplus* en cobayo durante cuatro meses de seguimiento. Las curvas azul celeste y amarilla muestran el aumento y mantenimiento de anticuerpos séricos inducidos por inmunización de dos grupos de cobayos con el complejo multiprotéico extractado de intestino, glándula salival y saco vitelino de *B. microplus* por el procedimiento anteriormente descrito, frente a las curvas rosada y azul de los grupos de animales control.

Anexo 2:

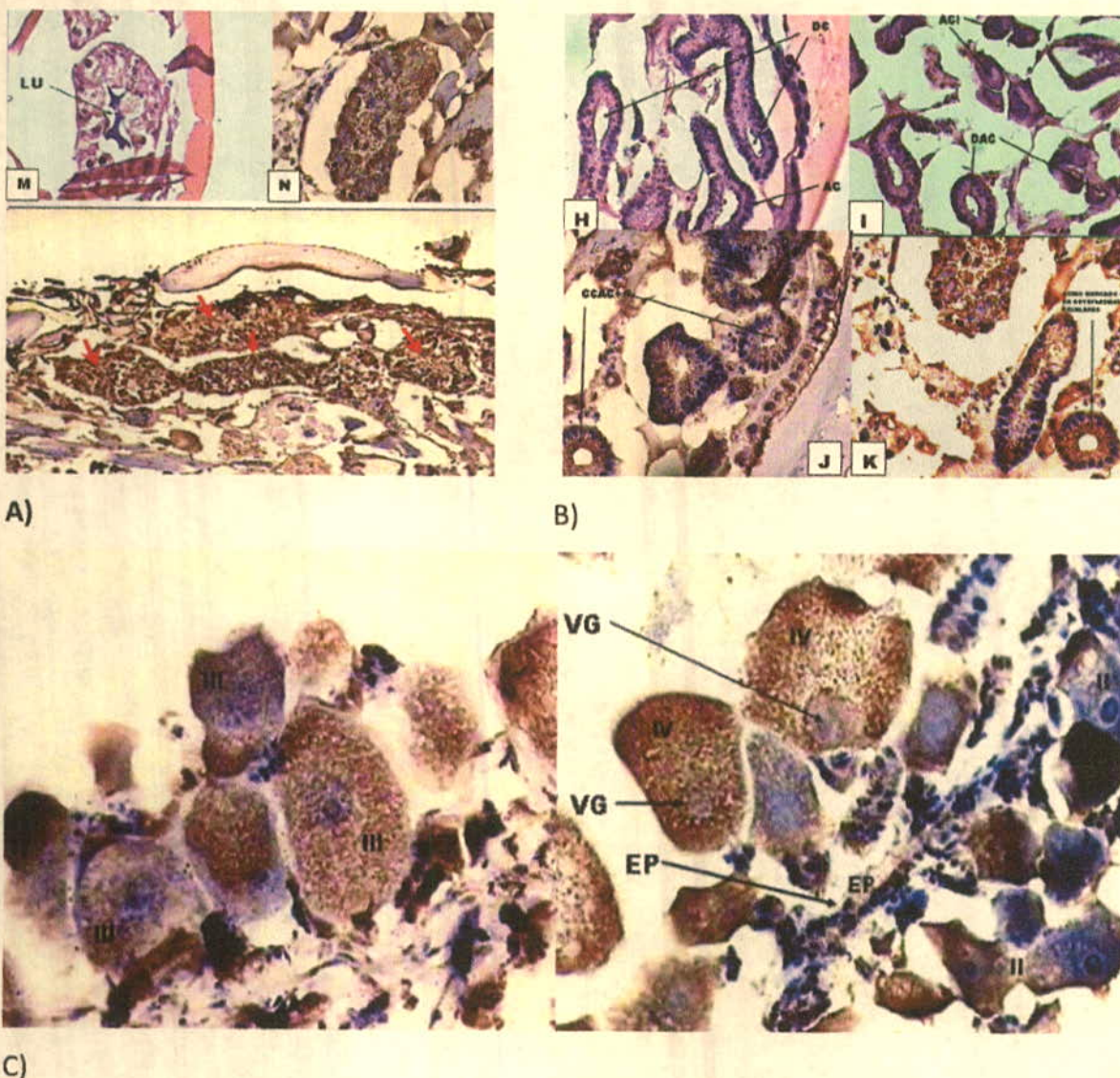


Figura 5: Inmunohistoquímica de **A) Intestino:** (M: corte de intestino de *B. microplus* coloreado con Hematoxilina-Eosina como referencia histológica. N: muestra un segmento intestinal con reacción inmunohistoquímica de avidina-biotina positiva. Las cabezas de flecha rojas muestran epitelios celulares del intestino marcados con avidina-biotina, indicando que los anticuerpos reconocen las proteínas antigénicas aisladas de intestino *In situ*). **B) Glándula Salival:** (H, I: corte de glándula salival coloreada con hematoxilina-Eosina como referencia histológica. J, K: se muestran los epitelios de los acinos glandulares con reacción de avidina-biotina positiva que identifica de los antígenos protéicos extractados *In situ*). **C) Saco Vitelino,** de garrapatas *B. microplus*, muestra diferentes estadios de maduración de los oocitos (II, III, IV y V) y la vesícula germinal del oocito (VG); adicionalmente se muestra el reconocimiento de los antígenos protéicos por marcaje inmunohistoquímico con avidina-biotina *In situ* (coloración café).

CAPITULO REIVINDICATORIO

1. Procedimiento para obtener un antígeno multiprotéico purificado derivado de glándula salival, intestino y saco vitelino de larvas de garrapata *Boophilus microplus*, que contiene tres (3) glicoproteínas de 147 kDa, 94 kDa y 73 kDa y dos (2) proteínas simples de 209 kDa y 68 kDa provenientes de intestino; dos (2) glicoproteínas de 130 kDa y 66 kDa y una (1) proteína simple de 110 kDa provenientes de glándula salival y tres (3) glicoproteínas de 160 kDa, 140 kDa y 85 kDa provenientes de saco vitelino; y carece de tres (3) proteínas inmunosupresoras de 35 kDa, 13 kDa y 6.5 kDa provenientes de glándula salival y una (1) proteína inmunosupresora de 27 kDa proveniente de intestino; caracterizado por comprender los siguientes pasos secuenciales:

a. Congelación gradual al vacío de larvas de *Boophilus microplus* para preservación de estructuras, con remoción de la cutícula y tejidos de envoltura a través de la acción subsecuente de hidróxido de sodio, ácido nítrico y la adición de enzima quitinaza, con la posterior separación de saco vitelino, intestino y glándulas salivales por micro succión.

b. Extracción de proteínas solubles de saco vitelino y membranas de células de glándula salival e intestino de *Boophilus microplus* y eliminación de tres (3) proteínas inmunosupresoras identificadas en glándula salival con pesos moleculares de 35 kDa, 13 kDa y 6.5 kDa y una (1) proteína inmunosupresora identificada en intestino con peso molecular de 27 kDa, por ultrafiltración tangencial y electroforesis preparativa en SDS-PAGE, para obtener una primera fracción de proteínas solubles de membrana con un rango de peso molecular de 250 kDa a 60 kDa, y

c. Purificación del eluido electroforético resultante por cromatografía de inmunoafinidad donde al sustrato se anclan anticuerpos policlonales IgY, obtenidos de yema de huevo de gallina previamente inmunizada con los antígenos de larva de *Boophilus microplus*, específicos para capturar un complejo único de tres (3) glicoproteínas de 147 kDa, 94 kDa y 73 kDa y dos (2) proteínas simples de 209 kDa y 68 kDa provenientes de intestino; dos (2) glicoproteínas de 130 kDa y 66 kDa y una (1) proteína simple de 110 kDa provenientes de glándula salival y tres (3) glicoproteínas de 160 kDa, 140 kDa y 85 kDa provenientes de saco vitelino, que se constituye en el material antigénico multiprotéico purificado.

2. Una vacuna para el control de garrapata *Boophilus microplus* en ganado bovino, que comprende un antígeno multiprotéico purificado derivado de glándula salival, intestino y saco vitelino de larvas de garrapata *Boophilus microplus*, que contiene tres (3)

glicoproteínas de 147 kDa, 94 kDa y 73 kDa y dos (2) proteínas simples de 209 kDa y 68 kDa provenientes de intestino; dos (2) glicoproteínas de 130 kDa y 66 kDa y una (1) proteína simple de 110 kDa provenientes de glándula salival y tres (3) glicoproteínas de 160 kDa, 140 kDa y 85 kDa provenientes de saco vitelino; y carece de tres (3) proteínas inmunosupresoras de 35 kDa, 13 kDa y 6.5 kDa provenientes de glándula salival y una (1) proteína inmunosupresora de 27 kDa proveniente de intestino, en combinación con un inmunopotenciador, un preservativo y un adyuvante.

3. Una vacuna como en la reivindicación 2, caracterizada porque el antígeno se encuentra presente en una concentración de 500 µg por mililitro.

4. Una vacuna como en la reivindicación 3, caracterizada por que el inmunopotenciador es Listerio Lisina LLO inactivada derivada de *Listeria monocytogenes*, en una concentración entre 0,5 µg y 0,1 µg por mililitro

5. Una vacuna como en la reivindicación 4, caracterizada porque el preservativo se selecciona entre Formaldehído o Bromo-etilenimina BEI.

6. Una vacuna como en la reivindicación 5, caracterizada porque el adyuvante es oleoso.

7. Una vacuna como en la reivindicación 6, caracterizada porque el adyuvante oleoso es aceite de manitol.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 - / -					
Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 12 - 112200	
				Bogotá D.C., Octubre 26 de 2012 - 08:36:49	
RECIBIDO DE : LIMOR DE COLOMBIA S.A				NI 800.238.326	
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	511134153	25/10/2012	120.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO		Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-03	CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICACION DE MARCAS Y LEMAS COMERCIALES		120.000.00	120.000.00
					\$120.000.00
=====					
SON: **CIENTO VEINTE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***					
Responsable: _____			SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO		
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____					
			No. 08-025146- -00004-0000		
			Fecha: 2012-10-26 08:45:33 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR		
			Tra. 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO		
			Act. 608 MODIFICASOLICIT Folios: 25		
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia					
Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240					
, Octubre 26 de 2012 - 08:36:49					