



No. 13-256687- -00000-0000

Fecha: 2013-10-29 17:21:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASOR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 73



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO _____ TINTES PARA MEMBRANAS Y ESTRUCTURAS BIOLÓGICAS

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE _____ KEMIN INDUSTRIES, INC.

DOMICILIO _____ DES MOINES, IOWA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO _____ LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C., _____



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-256687- -00000-0000

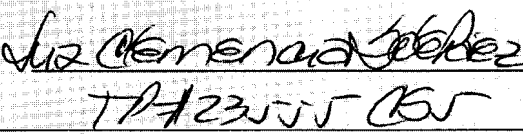
Fecha: 2013-10-29 17:21:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 73

ión

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☐ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☒ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/US2012/031098	Fecha 2012/03/29
Publicación Internacional No.		WO 2012/135432 A2	Fecha 2012/10/04
3	TÍTULO DE LA INVENCION		
TINTES PARA MEMBRANAS Y ESTRUCTURAS BIOLÓGICAS			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
A61K 049/000, G01N 001/030			
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN
KEMIN INDUSTRIES, INC.			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN		2100 Maury Street, Des Moines, Iowa	No. TELÉFONO 3 47 36 11
CIUDAD		Des Moines	CORREO ELECTRÓNICO clientes@cavelier.com
DEPARTAMENTO/ESTADO		Iowa	NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN
PAÍS DE RESIDENCIA		Estados Unidos de América	Estado de Iowa, Estados Unidos de América
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. DE SOUSA MARTINS		Diogo	Brasileiro
2. RUBENS JR.		Belfort	Brasileiro
3. DE SOUZA FILHO		Acacio Alves	Brasileiro
4. MAIA		Mauricio	Brasileiro
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1. Brasil		Jardin Paulista	Alamenda Caminas, 557 AP 11, Jardin Paulista, 01404-000 Sao Paulo, Brasil
2. Brasil		Jardin Paulista	Rau Augusta 2529 CJ11, Jardin Paulista, 01413-100 Sao Paulo, Brasil
3. Brasil		Jardin Paulista	Av Brigadeiro Luiz Antonio, 4790 Jardin Paulista, 01402-002 Sao Paulo, Brasil
4. Brasil		Presidente Prudente	Avenida Washington Luiz, 1876, 19060-010 Presidente Prudente, Brasil
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			

✓

9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO			
APELLIDOS De Páez		NOMBRES Luz Clemencia	IDENTIFICACIÓN C.C . 35.456.344 T.P . 23.555	
DIRECCIÓN	Carrera 4ª No. 72-35		No. TELÉFONO	3 47 36 11
CIUDAD	BOGOTA		CORREO ELECTRÓNICO	cavelier@cavelier.com
PAÍS	COLOMBIA		No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL	
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO			
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
U.S.A.		US	61/468,838	2011/03/29
U.S.A.		US	13/433,526	2012/03/29
11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS			
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.				
☐ SI ☐ NO				
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.				
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES			
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.				
☐ SI ☐ NO				
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.				
13	REDUCCIÓN DE TASAS			
Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.				
☐ SI ☐ NO				
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.				
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐				
Universidades públicas o privadas ☐				
Entidades sin ánimo de lucro ☐				
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos				
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO			
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.				
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	No. 13-106848 No. 13-107861	Fecha: 2013/10/22 Fecha: 2013/10/24	
16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL			
Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)				
Nombre del Firmante LUZ CLEMENCIA DE PAEZ		Firma 		
C.C 35.456.344 de Usaquén		Tarjeta Profesional 23.555		

17	ANEXOS
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano 1. ☒ Descripción N° de folios: <u>25</u> 2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: <u>24</u> 3. ☐ Dibujos y/o figuras N° folios: <u>1</u> 4. ☒ Resumen. 5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso. 6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso. 7. ☐ Arte final 12 x 12. 8. ☐ Anexo formato digital. ☒ Traducción al español de los anexos presentados junto con el Informe del Examen Preliminar Internacional.	Documentación Jurídica 9. ☒ Poder KEMIN INDUSTRIES, INC. 10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante. 11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso. 12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso. 13. Reducción de tasas Micro, pequeñas o medianas empresas ☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004. Universidades públicas o privadas ☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación Entidades sin ánimo de lucro ☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☐ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar . 14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$500.000. 15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. 16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación. 17. ☒ Comprobante de pago por 14 reivindicaciones adicionales a 10 por \$420.000.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
4 October 2012 (04.10.2012)

(10) International Publication Number
WO 2012/135432 A2

(51) International Patent Classification:
A61K 49/00 (2006.01) *G01N 1/30* (2006.01)

(74) Agent: **HERINK, Kent**; 215 10th Street, Suite 1300, Des Moines, Iowa 50309 (US).

(21) International Application Number:
PCT/US2012/031098

(81) Designated States (*unless otherwise indicated, for every kind of national protection available*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(22) International Filing Date:
29 March 2012 (29.03.2012)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/468,838 29 March 2011 (29.03.2011) US
13/433,526 29 March 2012 (29.03.2012) US

(71) Applicant (*for all designated States except US*): **KEMIN INDUSTRIES, INC.** [US/US]; 2100 Maury Street, Des Moines, Iowa 50317 (US).

(84) Designated States (*unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (*for US only*): **DE SOUSA MARTINS, Diogo** [PT/BR]; Alamenda Caminas, 557 AP 11, Jardim Paulista, 01404-000 Sao Paulo (BR). **RUBENS, JR., Belfort** [BR/BR]; Rau Augusta 2529 CJ11, Jardim Paulista, 01413-100 Sao Paulo (BR). **DE SOUZA FILHO, Acacio Alves** [BR/BR]; Av Brigadeiro Luiz Antonio, 4790 Jardim Paulista, 01402-002 Sao Paulo (BR). **MAIA, Mauricio** [BR/BR]; Avenida Washington Luiz, 1876, 19060-010 Presidente Prudente (BR).

Published:

— *without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))*



WO 2012/135432 A2

(54) Title: **DYES FOR MEMBRANES AND BIOLOGICAL STRUCTURES**

(57) Abstract: The present invention relates to the use of one or more natural dyes, alone or in combination with other dyes for preparation of a composition to stain membranes and biological structures, in order to facilitate their identification during surgical procedures. The present invention relates to the use of one or more natural dyes, alone or in combination with other dyes, to stain membranes and biological structures, in order to facilitate their identification during surgical procedures.

TINTES PARA MEMBRANAS Y ESTRUCTURAS BIOLÓGICAS

Referencia cruzada con las solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud de patente de Estados Unidos No. 61/468,838, presentada el 29 de marzo de 2011, la cual se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia

Campo de la invención

La presente invención se refiere al uso de uno o varios tintes naturales, solos o en combinación con otros tintes, para preparación de una composición para tinturar membranas y estructuras biológicas a fin de facilitar su identificación durante procedimientos quirúrgicos y al uso de uno o varios tintes naturales, solos o en combinación con otros tintes para tinturar membranas y estructuras biológicas a fin de facilitar su identificación durante procedimientos quirúrgicos y a sus composiciones. La presente invención también se refiere al uso de una o varias composiciones de pinturas naturales que protegen tejidos y células, expuestos durante procedimientos quirúrgicos, del daño por la luz. La presente invención también se refiere al uso de uno o varios tintes naturales, solos o en combinación con tintes sintéticos para tintura histopatológica tanto in vitro como en la superficie del ojo. La presente invención se refiere además al uso tópico de una o varias composiciones naturales dentro del ojo.

Antecedentes de la invención

Los procedimientos quirúrgicos, en diversos campos de la medicina, con frecuencia requieren la visualización y, en algunos casos, retirar membranas delicadas que en la mayoría de los casos son delgadas y semitransparentes. Durante algunos procedimientos quirúrgicos es necesario retirar estas membranas. Este paso es técnicamente muy complejo dada la dificultad de identificar cada membrana de manera adecuada.

La utilización intraoperativa de tintes vitales para tinturar tejidos humanos ha sido establecida por más de tres décadas. El uso de tintes vitales en oftalmología para tinturar tejidos retinianos data de al menos el último siglo.³⁵ Iniciando con Sorsby en 1939³⁶ y más tarde en Gifford en 1940,³⁷ los oftalmólogos comenzaron inyectando Kiton-verde rápido V, xileno-verde rápido B, y fluoresceína por vía intravenosa. En 1969, Kutschera comenzó inyectando azul patente por vía intravítrea para tinturar tejidos retinianos y determinar rupturas retinianas en desprendimientos de retina.³⁸

La introducción de cirugía vítreo retiniana, vitrectomía pars plana, permitió el tratamiento de enfermedades graves de la retina tales como la retinopatía diabética, agujero macular y desprendimiento de retina. La técnica de vitrectomía quirúrgica incluye retirar el gel intraocular vítreo, quitar todas las membranas pre-retinianas, y restaurar el volumen ocular con una solución salina balanceada, gas o aceite de silicona. El retiro de las membranas pre-retinianas tal como en

el tratamiento de vitreoretinopatía proliferativa, como una consecuencia del desprendimiento de retina, membranas epirretinianas fibrogliales y membrana limitante interna (ILM), comprende un paso quirúrgico técnicamente difícil debido a la naturaleza delgada y semitransparente de los tejidos^{1, 2}. Varios estudios han mostrado complicaciones retinianas causadas por iatrogenia debido a la acción de retirar estas microestructuras.

El uso de tintes intraoperativos en cromo vitrectomía es uno de los más recientes avances en la cirugía vítreoretiniana³. Esta técnica fue descrita primero por Burk et al. en 2000. En este trabajo el tinte vital indocianina verde (ICG) mostró gran afinidad por ILM fina⁴. La tarea previamente difícil de retirar la ILM y las membranas epirretinianas en cirugía vítreoretiniana se hizo mucho más fácil incrementando las tasas de éxito anatómico y funcional⁵⁻⁶. Sin embargo, el entusiasmo inicial fue reemplazado por preocupación después de que los ensayos clínicos demostraran complicaciones post operativas clínicas relacionadas con el uso de ICG tales como cambios en el campo visual y en el epitelio del pigmento retiniano⁷⁻¹². Los estudios in vitro e in vivo en diferentes modelos animales tales como ratones, conejos y cerdos han determinado una toxicidad de ICG dependiente de la dosis en las células retinianas¹³⁻¹⁶. El efecto dañino de ICG durante la cromo vitrectomía motivó a la comunidad científica a investigar tintes vitales que fueran menos tóxicos. Algunos de los primeros tintes usados en la investigación y en la clínica, en la cromovitrectomía son azul de tripano (AT) y azul patente (AP). Sin embargo, la aceptación de estos tintes ha sido limitada debido a la baja afinidad química tanto por ILM como por otras membranas pre-retinianas, y no existen indicadores precisos de su bioseguridad¹⁷⁻²¹.

Desde entonces, varios investigadores en todo el mundo han propuesto estudiar esto aún más con el fin de encontrar un tinte con alta capacidad para tinturar estructuras intraoculares que sea seguro para la retina. En la investigación del tinte ideal, la presente invención propone el uso de tintes naturales que incluyen el uso de un pigmento que es una estructura constitutiva de la retina en calidad de un tinte nuevo alternativo para usar en cromo vitrectomía u otras cirugías o procedimientos donde sea necesario o útil definir capas o límites para guiar al proveedor de cuidado de la salud durante un procedimiento o un proceso.

El documento PI0311609-3 revela composiciones que contienen luteína y zeaxantina y el uso de tales composiciones como una fuente de nutrición para niños, cuyo propósito, así como también la composición, dosificación, formulación, modo de administración, contexto de uso y proceso de producción son completamente distintos de aquellos revelados en la presente invención.

El documento JP2008138158 se refiere a un pigmento amarillo extraído de capullos de cricula, y un tinte amarillo, un color artificial, un agente filtro UV y un antioxidante.

El documento EP1075284B1 se refiere al uso de tintes vitales para facilitar procedimientos quirúrgicos en la cirugía vítreoretiniana.

La presente invención se distingue por el hecho de que (i) los tintes vitales usados en esta invención son tintes naturales, solos o en combinación con otros tintes, mientras que los tintes mencionados en el documento de arriba son todos sintéticos, (ii) la solicitud de esta patente se refiere no solamente al campo de la cromo vitrectomía sino también a otros campos médicos de cirugía o de tratamiento que incluyen los ojos, el cerebro, el abdomen, las articulaciones, la cirugía plástica, ginecológica y la oncología, y (iii) las membranas que pueden identificarse no son solamente intraoculares sino también intracerebrales, intraabdominales, intrapélvicas e intraarticulares, entre otras.

La presente invención también proporciona una o más composiciones naturales que pueden usarse para proteger tejidos y células, expuestos durante los procedimientos quirúrgicos, del daño debido a la luz presente en el campo quirúrgico. Las composiciones incluyen luteína y zeaxantina que absorben la luz y proporcionan un efecto protector, particularmente contra las longitudes de ondas de luz más dañinas.

La presente invención también proporciona una o más composiciones naturales que pueden usarse para proteger tejidos y células intravasculares mediante la aplicación tópica al ojo o inyección dentro del ojo. Las composiciones incluyen luteína y zeaxantina que son conocidas por proporcionar un efecto protector a los tejidos intraocular es, particularmente frente a la degeneración macular.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere al uso de uno o varios tintes naturales, solos o en combinación con otros tintes, para tinturar membranas y estructuras biológicas, en general, y al uso de tales compuestos para la preparación de composiciones para tinturar membranas y estructuras biológicas con el propósito de facilitar la identificación de estas durante procedimientos quirúrgicos o médicos.

La presente invención se refiere además a composiciones que comprenden uno o varios tintes naturales, solos o en combinación con otros tintes, en combinación con vehículos y estructuras aceptables en farmacia, para identificar membranas biológicas durante procedimientos quirúrgicos o médicos.

La presente invención también se refiere a procesos para producir composiciones que comprenden tintes naturales, solos o en combinación con otros tintes, usados en procedimientos quirúrgicos o médicos.

En otra modalidad, la invención se refiere a un proceso de identificación de membranas y estructuras biológicas con los tintes definidos en la presente.

Un objeto de la presente invención es la protección de tejidos y células, expuestos durante los procedimientos quirúrgicos, del daño debido a la luz presente en el campo quirúrgico

mediante la administración de uno o más tintes los cuales incorporan luteína y zeaxantina, los cuales absorben luz.

Otro objeto de la presente invención es proteger tejidos y células intraoculares mediante aplicación tópica al ojo (externamente o internamente) o mediante inyección adentro del ojo (externamente o internamente) D1 o más tintes que incluyen sustancias naturales tales como luteína y zeaxantina.

Breve descripción de las figuras

Fig. 1 es una carta colorimétrica que muestra la locación de diversos tintes y combinaciones de tintes de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a composiciones que comprenden uno o más tintes naturales, solos o en combinación con otros tintes, en combinación con vehículos aceptables en farmacia, para la identificación de membranas y estructuras biológicas durante procedimientos quirúrgicos o médicos.

En un método de acuerdo con la presente invención, la membrana o estructura biológica se tintura de manera selectiva de tal modo que el tejido biológico adyacente a las membranas o estructuras biológicas seleccionadas no se tinturan en una extensión sustancial, o al menos en una medida significativamente menor, de manera no perjudicial, que las membranas o estructuras biológicas seleccionadas para tinturarse. Por consiguiente, durante el procedimiento quirúrgico, la membrana o estructura biológica es claramente distinguible de los tejidos adyacentes y de esta manera se facilita el procedimiento quirúrgico y se reduce el riesgo de daño a los tejidos adyacentes.

Usando tintes de la presente invención, no se ha observado, o muy poco, un efecto nocivo sobre tejidos adyacentes. Además, cualquier tinte remanente en el campo quirúrgico se remueve en breve después del procedimiento por lo cual se reduce la posibilidad de efectos colaterales adversos del tinte.

Los tintes de la presente invención crean un nivel satisfactorio de tinturado a una concentración que es aceptable desde el punto de vista fisiológico y toxicológico. Se prefiere que se use una cantidad mínima de tinte que proporcionará una diferenciación visible entre las membranas o estructuras biológicas seleccionadas y el tejido adyacente.

Los tintes de la presente invención se seleccionan del grupo que comprenden ingredientes, porciones o extractos de luteína, zeaxantina, urucum, licopeno, astaxantina, beta-caroteno, y beta-criptoxantina, solos o en combinación entre sí. Tales tintes también pueden usarse en combinación con tintes seleccionados del grupo que comprende ingredientes, porciones o extractos de azul brillante, verde indocianina, verde infracianina, azul tripano, azul patente,

9
azul bromofenol, verde rápido, carmín de índigo, azul de Evans, verde ligero, triamcinolona, violeta cristal, fluoresceína, acetato de fluormetolona y rojo congo. En una modalidad más particular, las composiciones comprenden luteína y zeaxantina solas o combinadas con tripano o azul brillante.

5 Los vehículos aceptables en farmacia pueden seleccionarse del grupo que comprende amortiguador de pH de fosfato, soluciones salinas balanceadas (BSS), alcohol polivinílico, alcohol bencílico, agua purificada, fosfato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, cloruro de potasio, citrato de sodio, acetato de sodio, ácido bórico, bórax, metilcelulosa y derivados, ácido hialurónico, polisorbato de sodio dextrano, Tweens, sulfato de
10 condroitina, edetato de sodio, propilenglicol, polietilenglicol, fenilfosfato, ftalato de sodio, fosfato de potasio, ácido cítrico, carbomer 934, carbopol, ácido metafosfórico, ácido glicocólico y ácido acético.

Las composiciones de la presente invención pueden comprender desde aproximadamente 0.001% hasta aproximadamente 20%, preferiblemente cerca de 0.01% aproximadamente 5%, e
15 incluyendo todas las proporciones entre estos límites declarados del tinte.

Las membranas intravasculares referidas en esta invención se seleccionan preferiblemente del grupo que comprende la cápsula anterior y posterior, epitelio y endotelio de la córnea, membrana epirretiniana, membrana limitante interna, membrana vítrea, hialoidea posterior y otras membranas oculares.

20 En esta invención, membranas biológicas se refieren a cualquiera y a todas las membranas que necesitan identificarse en la cirugía puede el cuidado médico en general, particularmente en cirugía oftálmica, de cerebro, de articulaciones, abdominal, plástica, ginecológica y oncológica.

Las composiciones de la invención pueden usarse para identificación de membranas o
25 estructuras en procedimientos quirúrgicos o médicos generales. Procedimientos quirúrgicos comunes donde es necesario identificar estructuras y membranas incluyen cirugías oftálmicas, de cerebro, artro-ortopédicas, abdominales, plásticas, de articulaciones, ginecológicas y oncológicas. La invención es especialmente aplicable en la identificación de membranas intraoculares y estructuras biológicas en cirugías oftálmicas que incluyen como vitrectomía.
30 Preferiblemente, los tintes usados en esta invención son luteína y zeaxantina y sus combinaciones.

Luteína y zeaxantina, además de ser carotenoides, y más particularmente xantófilas, son conocidas y están estudiadas por su asociación con la prevención de maculopatía asociada a la edad.

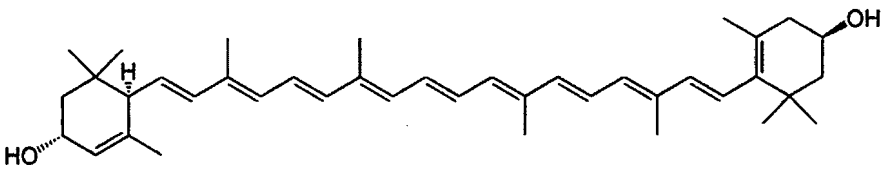
35 La presente invención se refiere al uso de luteína y/o zeaxantina como tintes o colorantes seguros y efectivos para procedimientos quirúrgicos tales como, entre otros, como vitrectomía, los cuales permiten una identificación fácil de membranas y estructuras biológicas tales como la

membrana epirretiniana, ILM, cápsula anterior y posterior, epitelio y endotelio de córnea, hialoidea vítrea y posterior, y su remoción completa, cuantos es necesario, mediante cirugía oftálmica.

En vista de las complicaciones retinianas iatrogénicas causadas por los procedimientos en la remoción de estas micro estructuras mostradas en el estado de la técnica, el uso de colorantes naturales, solos o en combinación con otros tintes, para tinturar membranas intraoculares y otras estructuras, hacen posible un avance tanto en la técnica quirúrgica como también en el perfil de toxicidad, con mejoramientos sustanciales en los resultados quirúrgicos.

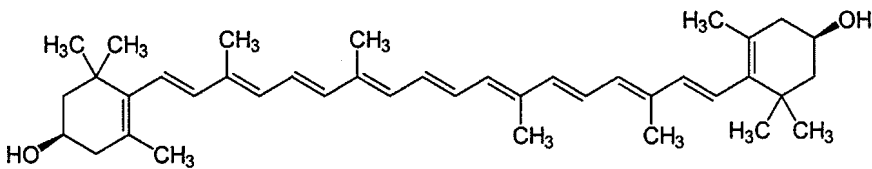
Luteína, que tiene la fórmula estructural de abajo:

10



y zeaxantina, que tiene las fórmula estructural de abajo:

15



20

25

30

Son pigmentos lipofílicos que pertenecen al grupo de carotenoides y tradicionalmente se encuentran en frutas y vegetales. Éstos dos carotenoides son isómeros estructurales y tienen un grupo hidroxilo en la porción terminal de la molécula, lo cual explica parcialmente su diferente polaridad y tropismo para ciertas estructuras biológicas tales como la mácula. Luteína y zeaxantina están asociadas con la posible prevención de maculopatías asociadas con la edad debido tanto a sus propiedades antioxidantes que pueden prevenir el progreso de la degeneración macular, como a su distribución reconocida en la mácula. Esta distribución selectiva y específica de estos carotenoides sugiere que desempeñan un papel importante en esta región, tanto como “un filtro” de luz azul, lo cual induce típicamente a la formación de especies de oxígeno radical, como también por su actividad como antioxidantes. El papel de luteína y zeaxantina en el ojo es un buen ejemplo de cómo el cuerpo humano puede defenderse contra un proceso de oxidación. De manera interesante, luteína y zeaxantina tienen un mecanismo de acción dual y sinérgico en la mácula. Luteína y zeaxantina están presentes en la región amarilla central (la fovea) que tiene una absorción máxima en 446 nm, la cual es por coincidencia la misma longitud de onda que la de la luz azul en el espectro electromagnético y de esta manera absorbe el exceso de la energía de

fotones. Exactamente debido a esta absorción, luteína y zeaxantina tienen grupos cromóforos responsables de su característico color amarillo-anaranjado.

En Europa la luteína se clasifica como un tinte para alimentos, registrado bajo el número E161b en EFSA (por European Food Safety Authority o Autoridad europea de seguridad alimentaria). El hecho de que es (i) una molécula GRAS (por Generally Recognized Safe o reconocida generalmente como segura, la más alta distinción concedida a un alimento/aditivo/tinte), (ii) reconocida por la FDA (por Food & Drug Administration o Administración de Alimentos y Medicamentos en los Estados Unidos de América) como tal, (iii) ampliamente estudiada y el objeto de varios artículos científicos publicados en revistas revisadas por pares, (iv) asociada con un efecto benéfico posible al prevenir las enfermedades retinianas principales de hoy día y (v) un tinte, la hace una sustancia interesante como un objeto de estudio e identificación de membranas intraoculares y otras estructuras biológicas no limitadas a, por ejemplo, membranas intraoculares.

En Europa la zeaxantina también está registrada como un tinte para alimentos por parte de la EFSA y tiene un número E asignado E161h. Zeaxantina es una molécula GRAS y ácido el objeto de artículos científicos publicados en revistas revisadas por pares. Como tinte, la zeaxantina se hace una sustancia interesante por ser un objeto de estudio e identificación de membranas intraoculares o estructuras biológicas, no limitadas a, por ejemplo, membranas intraoculares.

El uso combinado de luteína y/o zeaxantina, juntos o en combinación con otras sustancias tales como tintes y otros vehículos aceptables en farmacia, como una composición para tinturar cápsula anterior y posterior, epitelio y endotelio de la córnea, membrana epirretiniana, membrana limitante interna, la hialoidea vítrea y posterior, es ilustrado. Con los datos pertinentes a su acción por medio de ejemplos descritos más adelante.

A pesar del hecho de que ciertas definiciones sobre los tintes de luteína y zeaxantina y sus combinaciones en el campo de la cirugía oftálmicas se encuentran descritos con mayor detalle aquí, la invención también puede lograrse con otros tintes y campos de aplicación previamente definidos.

En la tabla 1 de abajo están listados los tintes que pueden usarse en la invención y sus rangos cuantitativos particulares.

Tabla 1

Componente	Concentración [% p/v]	Concentración preferible [% p/v]	Función dentro de la composición
Luteína	0.001% a 20%	0.01% a 5%	Activa
Zeaxantina	0.0007% a 20%	0.007% a 0.5%	Activa
Urucum	0.01% a 20%		Activa
Azul brillante	0.01% a 0.05%	0.0125% 0.025% ^a	Activa
Verde Indocianina	0.001% a 20%	0.5%	Activa
Verde Infracianina	0.001% a 20%	0.5%	Activa
Azul tripano	0.001% a 20%	0.04%	Activa
Azul patente	0.05% a 0.5%	0.24%	Activa
Azul bromofenol	0.05% a 0.5%	0.2%	Activa
Verde rápido	0.001% a 20%		Activa
Carmín de índigo	0.001% a 20%		Activa
Azul de Evans	0.001% a 20%		Activa
Verde ligero	0.001% a 20%		Activa
Triancinolona	0.001% a 20%		Activa
Violeta cristal	0.001% a 20%		Activa
Fluoresceína	0.001% a 20%		Activa
Acetato de fluormetolona	0.001% a 20%		Activa
Rojo Congo	0.001% a 20%		Activa
Amortiguador de pH fosfato	0.001% a 99.99%		Vehículo
Solución salina balanceada	0.001% a 99.99%		Vehículo
Ácido polivinílico	0.001% a 99.99%		Vehículo
Ácido bencílico	0.001% a 99.99%		Vehículo
Agua purificada	0.001% a 99.99%		Vehículo
Fosfato de sodio	0.001% a 99.99%		Vehículo
Cloruro de sodio	0.001% a 99.99%		Vehículo
Cloruro de calcio	0.001% a 99.99%		Vehículo
Cloruro de magnesio	0.001% a 99.99%		Vehículo
Cloruro de potasio	0.001% a 99.99%		Vehículo
Citrato de sodio	0.001% a 99.99%		Vehículo
Acetato de sodio	0.001% a 99.99%		Vehículo
Ácido bórico	0.001% a 99.99%		Vehículo
Borato de sodio	0.001% a 99.99%		Vehículo
Metilcelulosa y sus derivados	0.001% a 99.99%		Vehículo
Ácido hialurónico	0.001% a 99.99%		Vehículo
Dextrano	0.001% a 99.99%		Vehículo
Polisorbato de sodio	0.001% a 99.99%		Vehículo
Tweens	0.001% a 99.99%		Vehículo
Sulfato de condroitina	0.001% a 99.99%		Vehículo
Edetato de sodio	0.001% a 99.99%		Vehículo
Propilenglicol	0.001% a 99.99%		Vehículo
Polietilenglicol	0.001% a 99.99%		Vehículo
Fenilfosfato de sodio	0.001% a 99.99%		Vehículo
Ftalato de potasio	0.001% a 99.99%		Vehículo
Fosfato de potasio	0.001% a 99.99%		Vehículo

Ácido de cítrico	0.001% a 99.99%		Vehículo
Carbomer 934	0.001% a 99.99%		Vehículo
Carbopol	0.001% a 99.99%		Vehículo
Ácido metafosfórico	0.001% a 99.99%		Vehículo
Glicocol	0.001% a 99.99%		Vehículo
Ácido acético	0.001% a 99.99%		Vehículo

Hay muchos beneficios asociados con el uso de tintes naturales que incluyen: (i) fácil identificación de membrana y estructuras biológicas para identificar, retirar o trabajar con; (ii) prevención de efectos laterales causados por la remoción incompleta de membranas y estructuras biológicas; (iii) fácil reducción del tiempo de cirugía con reducción en las tarifas médicas y de hospital; (iv) seguridad incrementada porque el tinte propuesto es un tinte natural, solo o en combinación con otros tintes, no sintéticos, y todas las alternativas en el mercado hoy en día han demostrado toxicidad; y (v) posible asociado con el uso del tinte en la cirugía u otros procedimientos médicos.

Un proceso general de preparación de composiciones de la presente invención es como sigue. Se recibe el material de empaque. A continuación se pesan las materias primas necesarias para la fabricación. El manejo y/o la filtración se hacen en la habitación de clase ISO 8. Antes del llenado séptico o aséptico se realiza control de calidad durante el proceso. Si el llenado es aséptico sigue el siguiente flujo: llenado en la habitación de clase ISO 5, sellado en la habitación de clase ISO 7 y esterilización en la habitación de esterilización final. De manera inversa si el llenado séptico sigue el siguiente flujo: filtración esterilizante en la habitación de clase ISO 5, llenado en la habitación de clase ISO 5 y sellado en la habitación de clase ISO 7. Después de estos pasos, tiene lugar el empackado y el control de calidad del producto terminado.

El proceso de fabricación de las composiciones que comprenden uno o varios tintes o pinturas, tales como luteína, zeaxantina, urucum, licopeno, astaxantina, beta-caroteno, beta-criptoxantina, solos o en combinación entre sí, y tales tintes y composiciones de tintes, solos o en combinación con azul brillante, indocianina verde, infracianina verde, azul tripano, azul patente, azul bromofenol, verde rápido, carmín de índigo, azul de Evans, verde ligero, triamcinolona, violeta cristal, fluoresceína, acetato de fluormetolona y rojo congo. Aquellas personas versadas en la materia serán capaces de utilizar mezclas de estos tintes siempre y cuando la mezcla cumpla los propósitos de tinturar los tejidos biológicos seleccionados para distinguirlos fácilmente de los tejidos biológicos adyacentes, preferiblemente en bajas cantidades y sin toxicidad, con muy poca, y sin residuos de tinte, o con muy poco, después del procedimiento. En general, la concentración del tinte o de la mezcla de tintes se minimiza mientras se tintura efectivamente el tejido biológico seleccionado y al mismo tiempo se minimiza el riesgo de posible daño o toxicidad al tejido biológico. La viscosidad de la solución del tinte puede ajustarse, por ejemplo, adicionando ácido hialurónico para lograr una adherencia mejorada al tejido biológico seleccionado. Adicionalmente, la solución puede formularse como una

dispersión. Es bien conocido en el Estado del arte seleccionar y formular una forma adecuada de la solución para aplicaciones particulares.

5

Ejemplo 1 – Tinturado de tejido ocular humano con Luteína y/o Zeaxantina

Se ensayaron 40 ojos humanos usando soluciones de otras sustancias que incluyen luteína/zeaxantina (L/Z) (Luteína 5% CWS/S-TG de DSM Nutritional Products, Inc., Parsippany, NJ), azul brillante (OPHT-Blue de Ophthalmos Industry, Sao Paolo) y /u otros
10 vehículos a concentraciones de luteína desde 0.01% hasta 20% y azul brillante desde 0.0125% hasta 0.025%. Las soluciones de tintura se prepararon tal como se describe en el ejemplo 2. La cápsula anterior, hialoidea vítrea, posterior y el endotelio de la córnea se tinturar un mediante precipitación inmediata de la solución de tinte en la membrana.

15 Para la córnea se utilizó la siguiente técnica de evaluación:

Calificación	Criterios de evaluación de la córnea ¹
0	Sin retención de tintura
1	Un cuarto (o menos) pero no cero
2	Mayor que un cuarto, pero menos de una mitad
3	Mayor que una mitad, pero menos de 3 cuartos
4	Mayor que tres cuartos hasta toda el área

¹ Draize, J.H. et al., J. Pharm. Exp. Ther., 82:377-390,1944

Para el ILM la evaluación usada fue: 0/4+ (ninguno), 1+/4+ (débil), 2+/4+ (regular), 3+/4+ (buena), 4+/4+ (intensa).

20 Se observó el tinturado de la cápsula anterior 3 + / 4 + y 4 + / 4 +, respectivamente con una solución de 0.25% y azul brillante 0.025% y una solución de L/Z 0.5% y azul brillante 0.025%. Este grado de tinturado obtuvo una calificación de 1+/4+ con una solución de L/Z a 1%. También se observó el tinturado de la vítrea a 4+/4+ con una solución de L/Z a 20% así como también el tinturado de ILM a 4+/4+ con una solución de L/Z a 0.3% y 0.025 azul brillante. La
25 solución de L/Z a 1% sola también que duró ILM a 2+/4+. Se observó un tinturado de endotelio de córnea a 2+/4+ con una solución de L/Z a 20%.

Estos experimentos establecen que luteína y zeaxantina en combinación con vehículos y/o tintes aceptables en farmacia pueden usarse para la preparación de una composición para facilitar la identificación de membranas y estructuras biológicas durante procedimientos
30 quirúrgicos, no limitados a, por ejemplo, procedimientos quirúrgicos oftálmicos.

Las cantidades de tintes en general, y más específicamente de luteína y zeaxantina, como también vehículos y/o tintes aceptables en farmacia se encuentran listados en la Tabla 1.

Mientras que luteína o zeaxantina pueden usarse solas o en combinación con otros tintes, la proporción preferida de luteína a zeaxantina en la composición se encuentra en el rango de 5:1 a 1:5 y todos los valores intermedios.

Ejemplo 2 – Composición de luteína y/o zeaxantina y azul brillante:

La técnica de preparación descrita abajo es válida para L/Z, cualquiera sea su forma química, pureza, cristalización o grado de esterificación y para todos los vehículos mencionados previamente.

L/Z no exhibe una buena solubilidad en agua, por lo tanto fue usado alcohol polivinílico como vehículo a una concentración de 1.4% disuelto en amortiguador de pH de fosfato a pH 7.0. Este alcohol puede disolverse en otro amortiguador de pH o en una solución salina simple o balanceada.

15 Materiales:

L/Z 0.5 g

Azul brillante: 0.025 g

Fosfato de sodio monobásico: 0.004 g

Fosfato de sodio dibásico. 0.028 g

20 Cloruro de sodio. 0.85 g

Povidona 0.4 g

Alcohol polivinílico 1.4 g

Agua q.s.p. 100 mL

25 Preparación:

Pesar los componentes activos: azul brillante y L/Z y, revolviendo disolverlo en una solución amortiguadora de pH (pH: 7.0 a 7.4) que contiene 1.4% de alcohol polivinílico.

Verificar el pH.

30 Proceder con el llenado en el área limpia ISO Clase 5 (Clase 100) en un vial con un tapón de caucho y un sello de aluminio Flip-Off (tapa levadiza de fácil abertura) que contiene 0.5 mL. (Dosis única).

Esterilizar en la autoclave durante 30 min a 121 °C.

35 El proceso inicia disolviendo los componentes en una solución salina balanceada o cualquier otra solución que tenga compatibilidad con los componentes de la fórmula I proporcione estabilidad, pH y osmolalidad compatibles con el uso ocular, incluidas diversas formas y dosificaciones de los componentes activos y sus vehículos. En la tabla 2 están incluidos algunos ejemplos de fórmulas.

Tabla 2 – Formulaciones de composiciones ejemplares

#	Color	% p/v de un primero o único tinte	% p/v de un segundo tinte
1	Azul verdoso	0.50% L/Z	0.05% Azul brillante
2	Verdoso	0.50% L/Z	0.025% Azul brillante
3	Verde	0.50% L/Z	0.0125% Azul brillante
4	Azul verdoso	0.25% L/Z	0.025% Azul brillante
5	Verdoso	0.25% L/Z	0.0125% Azul brillante

Otras modalidades preparadas incluyen: (1) 20% L/Z dispersable / soluble en agua independientemente de la forma física y ácido polivinílico 1.4% qs 100%; (2) 0.5% de L/Z dispersable / soluble en agua independientemente de la forma física, 0.025% de azul brillante, y ácido polivinílico 1.4% qs 100%; y (3) 0.5% de L/Z dispersable / soluble en agua independientemente de la forma física, 0.0125% de azul brillante, y ácido polivinílico 1.4% qs 100%.

Las principales técnicas de manipulación usadas incluyen: (i) disolución; (2) agitación; (3) filtración; y (4) esterilización.

La etapa de esterilización, cuando es necesaria, se realiza mediante calor húmedo, en la autoclave con temperaturas en los rangos desde 80° a 140°C, mediante filtración esterilizante, mediante radiación o mediante otro método compatible.

El pH se observa en un rango desde 3 a 12 y la osmolaridad y osmolalidad están en un rango desde 100 a 2000 mOsm, y las formulaciones preferidas tienen una osmolalidad alrededor de 300mOsm.

Ejemplo 3 - Desarrollo de formulaciones intraoculares

Además del uso de un solo tinte en una composición, tal como se había mencionado previamente, también es posible preparar una composición que comprende una combinación de más de un tinte. En esta invención no solamente se proporcionan y se identifican concentraciones de vehículo y compuestos activos que difiere del arte previo, sino que también el uso específico y el sitio de deposición que se hace directamente a las membranas del ojo o a otras estructuras biológicas. Esto no había sido suministrado por el arte previo en el cual se administraban oralmente luteína y zeaxantina (cápsulas, tabletas, barras de cereal o leches fortificadas). La presente invención proporciona una composición en forma de un tinte inyectable formulado a partir de materias primas que incluyen luteína y/o zeaxantina. El arte previo no enseñaba composiciones que pudieran administrarse durante procedimientos quirúrgicos en una forma de administración inyectable las aplicaciones específicas incluyen una solución o dispersión de inyección, un implante ocular para protección contra la degeneración macular o la progresión de degeneración macular, y una forma de liberación lenta de L/Z colocada en el ojo.

Luteína y/o Zeaxantina

La disolución se hace con los vehículos identificados en la tabla 1 de arriba. La solución de L/Z se pesa y se diluye con agua destilada en diversas concentraciones que están en el rango entre 0.01% y 20%. La osmolalidad de las soluciones se calcula mediante el osmómetro ATM Osmomette (Precision Systems, Inc., Sudbury, MA) u otros osmómetros aplicables. Una solución salina balanceada (BSS por balanced salt solution) es usada como control usando una osmolaridad u osmolalidad de 100 a 2000 mOsm.

Las etapas principales están listadas abajo:

1. Determinar un vehículo de la tabla 1 de manera que la solución final sea soluble en agua; se realizaron ensayos de solubilidad en agua y en diversos vehículos que incluyen aquellos mostrados en la tabla. Se encontraron solubilidades en el rango entre 0.02 y 110 mg / m.

2. Caracterizar la absorbancia de la solución de L/Z; se usó espectrofotometría UV. Se observó absorbancia entre 2-5 dentro de un rango de longitud de onda de 250 nm a 1000 nm a una velocidad de 600 nm/min y usando 1.4% de alcohol polivinílico como un estándar blanco.

3. Identificar el color resultante de los grupos cromosómicos; se analizaron mezclas que comprenden diferentes colores dentro del espectro visible.

4. Ensayar los parámetros físico químicos de pH, osmolaridad/osmolalidad y concentración óptimos; se siguieron los procedimientos descritos arriba.

Ejemplo 4 - Estudio de ojos cadavéricos

Se ensayaron 120 ojos cadavéricos humanos de donantes de córnea humana usando soluciones de luteína y zeaxantina solas o combinadas con azul brillante y azul tripano. Inicialmente se retiró la parte anterior del ojo o la córnea mediante incisión del limbo 360° como rutina y se mantuvo para un trasplante de córnea. El resto del globo ocular se descartó usualmente con la única excepción del tejido escleral que puede usarse eventualmente como un implante para corregir el adelgazamiento escleral humano o en cirugía de enucleación. Antes de la eliminación de la mayoría de tejidos oculares y la preparación escleral, se realizaron experimentos coloreando diferentes membranas del ojo y estructuras intraoculares.

Pronto después de retirar la córnea, se aplicaron 0.1-0.3 mL del tinte (L/Z 0,25-20% solo combinado con azul brillante (0.0125% -0.025%) o azul tripano (0.01% - 0.15%) a la cápsula anterior del cristalino. Después de 30 segundos se retiró el tinte con una irrigación leve de 10 mL de BSS. Luego se retiró la cápsula de los clientes con fórceps de capsulorrexis Utrata aplicando un movimiento circular con 360 grados. Después de retirar el exceso de ojo, la intensidad de tintura se emitió mediante la nota 0 (sin tintura), + (tinturado ligero), ++ (tinturado moderado), + + + /++++ (tinturado intenso), por parte de tres cirujanos experimentados que no conocían las sustancias y que estuvieron operando de manera independiente. Las cápsulas anteriores retiradas se evaluaron mediante espectrofotometría.

El cristalino fue retirado para los experimentos usando fórceps quirúrgicos para la escisión vítrea en bloque. Todo el vítreo completo se sumergió en 1 mL de cada solución de tinte por 1 minuto, seguido de una inmersión del mismo vítreo en 1 mL de BSS.

En el último experimento, la capacidad en las antes del tinte en ILM fue evaluada después de la inyección intravítrea de la ILM. Un total de 0.1-0.3 mL de cada solución de tinte se inyectó a la cavidad vítrea en la ILM. El exceso de ojos se retiró por una infusión de 0.1 mL de BSS. Después de retirar el ojo en exceso, se evaluaron la intensidad de tinturado en la ILM y vítrea con la nota 0 (sin tinturado), + (ligeramente tinturado), ++ (moderadamente tinturado), +++/++++ (intensamente tinturado) por parte de tres cirujanos expertos vitreoretinianos que no conocen las sustancias usadas y estaban operando de manera independiente. Luego se usó una aguja calibre 27, doblada, para crear una plaqueta en la ILM, y se usaron pinzas quirúrgicas de vitrectomía calibre 20 para sostener y retirar suavemente la ILM. Las ILMs retiradas se evaluaron por medio de espectrofotometría.

15 Ejemplo 5 - Análisis histológico

ILM y la cápsula anterior del cristalino se retiraron y se fijaron en una solución de formalina a 10% por 24 horas. A esto le siguió empapar el tejido en Araldite® (Huntsman International, LLC) para secciones histológicas. El material se recogió desde dos áreas diferentes en los sitios de inyecciones previas de cada solución de tinte. Todas las muestras se recogieron en áreas separadas por un mínimo de 500 µm una de otra. Las muestras se analizaron mediante microscopía de luz y microscopía electrónica. Para la microscopía de luz, se examinaron secciones delgadas de tejido después de tinturar con tinte azul de toluidina. Para microscopía electrónica se colocaron secciones ultra delgadas sobre micro soportes o rejillas de cobre, se tinturó con acetato de uranilo y citrato de plata, y se examinaron con el microscopio electrónico Jeol JX 1500TM (Jeol Ltd., Tokio, Japón).

25 Ejemplo 6 - Estudios de toxicidad en conejos

30 Conejos holandeses con pesos entre 1.5 y 2 kg fueron usados de acuerdo con estándares de investigación de la Declaración de Helsinki, y las Reglas de la Asociación para investigación en nutrición y oftalmología (ARVO por Association for Research in Vision y Ophthalmology) y los estándares de Ética en investigación de la Universidad de Sao Paulo respecto de los experimentos en animales. Todos los experimentos y procedimientos quirúrgicos se hicieron bajo anestesia después de una inyección intramuscular de 35mg/kg de clorhidrato de ketamina (Phoenix Scientific Inc., USA) y 5 mg/kg de clorhidrato de ketamina (Phoenix Scientific Inc., USA). La pupila fue dilatada antes de la cirugía mediante la instilación de 35 clorhidrato de ciclopentolato 1% (Bausch & Lomb Pharmaceuticals Inc., USA) y fenilefrina 5% (Bausch & Lomb Pharmaceuticals Inc., USA).

Inyección intravítrea y técnica quirúrgica. Se usaron dos técnicas quirúrgicas para hacer la aplicación de la inyección subretiniana o intravítrea del tinte. En una primera técnica, se evaluó la toxicidad subretiniana del tinte. Se realizó la anestesia mediante inyección intramuscular de 35 mg / kg de clorhidrato de xilazina y 5 mg / kg de clorhidrato de ketamina, a lo cual le sigue la colocación de un blefarostato en el ojo derecho de los animales y una gota de yodo-povidona al 5% tópico para preparación del ojo para vitrectomía con 3 esclerotomías. En la esclerótica temporal se dispuso una infusión para mantener la presión intraocular en 30 mm de Hg y se fijó con suturas de Vycril 7-0 (Ethicon, Inc.). Luego se realizaron dos esclerotomías temporales, nasal y superior, 2.5 mm posteriores al limbo. Se realizó vitrectomía pars plana usando un sistema de calibre 20 con el instrumento para vitrectomía Accurus™ - (Alcon, Fort Worth, Texas, USA).

El siguiente paso quirúrgico fue la aplicación de dos marcas de fotocoagulación con láser de diodo FTC / TTT / IPDT 2000™ (Electronica Opto, São Carlos, SP, Brasil) con los parámetros de 100 µm in diámetro, 100 milivatios y duración de 300 milisegundos, en la retina temporal y nasal 4 mm debajo del nervio óptico. La función de las marcas de láser es delimitar la región que es inyectada al ojo en el área subretiniana para análisis histológico. La administración del tinte fue hecha con una cánula de infusión calibre 41 para translocación macular (Bausch & Lomb, USA). La cánula se posicionó 2 mm por encima de la marca de fotocoagulación de láser previa. El tinte usarse se inyectó al espacio subretiniano en diferentes concentraciones, y a 2 mm por debajo de la marca de fotocoagulación temporal. El tinte se infundió continuamente hasta que se formó una burbuja de 3 mm in diámetro mediante una infusión de 0.02 mL del tinte. A continuación, se infundió 0.02 mL de solución de control BSS con la misma forma que la marca de láser nasal. El ojo se suturó con hilo 7-0 Vicryl en las tres esclerotomías. Este experimento se repitió en dos animales con cada tinte a diferentes concentraciones. Los conejos se sacrificaron con inyección intravenosa de 2 mL de fenobarbital y los ojos se retiraron mediante enucleación con láser 24 horas después de la cirugía.

En un segundo experimento, se evaluó la toxicidad de tinte intravítreo. Se inyectó un total de 0.1 mL de tinte a la cavidad vítrea de los ojos y se repitió en dos animales adicionales. En el ojo contralateral de un animal se inyectó 0.1 mL de BSS (290 mOsm) como control. La técnica de inyección intravítrea sigue patrones internacionales²². En breve se colocó un blefarostato seguido de instilación de una gota de yodo-povidona al 5% en el ojo. Bajo el microscópico quirúrgico se conectó una aguja calibre 27 a una jeringa de 1 mL que contiene el tinte o BSS y se inyectó en la región esclerótica supratemporal, 2 mm posterior al limbo. Se examinaron los ojos para escribir desprendimiento de retina, hemorragia vítrea o heridas al cristalino. Al final del procedimiento se aplicó una gota de gotas oftálmicas estériles con antibióticos y esteroides. Los conejos fueron sacrificados con inyección intravenosa de 2 mL de fenobarbital y los ojos se

retiraron mediante enucleación por láser 24 horas después de la inyección y se fijaron en glutamaldehído a 2.5%.

Fundoscopia y angiografía de fluoresceína. Se realizó angiografía de fluoresceína mediante inyección intravenosa por 30 segundos de 0.3 mL de fluoresceína de sodio 10% en la vena auricular de la magna animal. La angiografía se realizó usando una cámara específica del fondo del ojo (Topcon TRC, Topcon, Tokio, Japón) cada 20 segundos hasta cinco minutos después de la inyección inicial. Se realizó un examen de angiografía de fluoresceína seis horas y 24 horas después de la aplicación intravítrea del tinte. La inyección de tinte se realizó lentamente para evitar la ruptura iatrogénica de la barrera hematorretiniana por una inyección de bolo rápido que puede suceder en estos animales.

Histología. Los ojos fueron enucleados y fijados en una solución de 2% de paraformaldehído, 2% de glutaraldehído y amortiguador de pH de fosfato 0.1 mol/L y pH 7.4 por 24 horas. A esto le siguió empapar el tejido en Araldite® para secciones histológicas. El material se recogió desde dos áreas diferentes en los sitios de las inyecciones previas del ojo. Todas las muestras se recogieron en áreas separadas 500 µm una de otra. Las muestras se analizaron mediante microscopia óptica y microscopía electrónica. Para microscopia óptica las secciones delgadas de tejido se examinaron después de tinturarlas con tinte azul de toluidina. Para microscopia electrónica se colocaron secciones ultra delgadas en micro estructuras de cobre pinturas con acetato de uranilo y citrato de plata y se examinaron con el microscopio electrónico Jeol JX 1500TM (Jeol Ltd., Tokio, Japón).

Lo siguiente describe las acciones tomadas en cada punto del estudio:

Tiempo cero: Antisepsis y anestesia del animal, inyección intravítrea / subretiniana de tinte (grupo experimental), e inyección intravítrea / subretiniana de solución salina balanceada (grupo de control).

Tiempo seis horas: angiografía de fluoresceína del fondo y examen de la retina.

Tiempo 24 horas: angiografía de fluoresceína del fondo y examen de la retina, asepsis y anestesia del animal; sacrificio del animal por una sobredosis de pentobarbital.

Después del procedimiento: recolección de datos para histología, microscopia electrónica y análisis estadístico de resultados.

Tiempo 7 días: angiografía de fluoresceína de fondo y examen de la retina, asepsis y anestesia del animal, y sacrificio del animal por una sobredosis de pentobarbital.

Ejemplo 7 - Uso como tintura histopatológica.

Las presentes composiciones son útiles como tintes para tinturado histopatológico, tanto in vitro como en la superficie externa del ojo. Las composiciones de tinte usadas fueron una dispersión de (L/Z) 0.1-0.7% asociadas con azul brillante 0.0125%-0.05% en una solución acuosa de amortiguador de pH a un rango de pH [6-7.4] y un rango de osmolalidad de [280-320]

Osm/kg. 2ml de estas soluciones se envasaron en viales de 3ml. Los tejidos usados para tinturar fueron la conjuntiva, córnea, párpados y tejido epitelial retiniano. El tinturado se hizo mediante el siguiente proceso: se obtuvo todo el globo ocular y se sumergió en un fijador de Karnovski compuesto de glutaraldehído 2.5% y paraformaldehído 2% en amortiguador de pH de cacodilato de sodio 0.1M manteniendo la solución al pH 7.2.

La solución se mantuvo por 24 horas y se cortaron los tejidos de la retina, conjuntiva y de la córnea. Luego se realizó el primer proceso de enjuague tres veces usando un amortiguador de pH cacodilato de sodio 0.1M durante 15 minutos. El segundo proceso de enjuague se realizó luego dejando el tejido en solución por una noche con el mismo amortiguador de pH. El segundo proceso de fijación se realiza con tetraóxido de osmio 2% en amortiguador de pH cacodilato de sodio 0.1M por 2 h, seguido de un enjuague por 10 minutos con el mismo amortiguador de pH. Después de eso el material pasó el proceso de deshidratación/secado, comenzando con etanol 70% (15min, dos veces), 90% (15min, dos veces) y 100% (15min, 4 veces) y terminando con óxido de propileno (30min, 3 veces). Luego, el material se sometió a infiltración con resina Epon® (Miller-Stephenson) en una solución 1:1 de Epon®: óxido de propileno por una noche, con el párpado abierto. El día después, el material se re-infiltra con Epon® por 4h en condiciones al vacío. Después de esto, el material se incluyó en un molde y se llevó al proceso de polimerización a 60 °C por 48h. Después de recortar, se hicieron cortes semi-delgados con espesor de 40 µm en un micrótopo Leyca Reichert Ultracut #702501 y finalmente se tinturar un con la solución de tinte mencionada previamente. Hubo un tinturado adecuado del material cortado proporcionando un tinturado azul-verdoso a todos los materiales.

Ejemplo 8 - Protección frente al daño del tejido durante procedimientos quirúrgicos.

Los procedimientos quirúrgicos involucran normalmente una exposición de tejidos y células al ambiente de la sala quirúrgica, la cual típicamente tiene oxígeno y luz. Específicamente, la mayoría de salas de cirugía poseen iluminadores potentes (endoiluminadores) cuya única función es proporcionar la mejor iluminación posible para que el cirujano visualice las áreas objetivo y sea capaz de realizar sin problema todas las etapas de la cirugía. El endoiluminador está descrito en la literatura científica como una fuente poderosa de luz azul que puede proporcionar un efecto foto tóxico en la retina.³² La luz azul se describe en la literatura científica como una fuente inherente de radicales libres.³³ Los radicales libres se han descrito de manera extensa en la literatura como atacadores de la integridad de la membrana lipofílica fotorreceptor, causando muerte celular prematura y conduciendo a degeneración macular asociada a la edad, la causa destacada de seguida en el mundo occidental. Los radicales libres también proporcionan la acumulación de drusas en el cristalino lo que conduce al inicio prematuro de cataratas.³⁴ Luteína y Zeaxantina (L/Z) pueden estabilizar, aplacar o atrapar

radicales libres evitando más daños al fotorreceptor o la integridad del cristalino y, por lo tanto, contribuyendo a disminuir la severidad o incluso la incidencia de estas condiciones. Por otra parte, L/Z tienen la propiedad de absorber longitudes de onda azul de la luz en el área de los 446 nm, disminuyendo por lo tanto la exposición del cristalino o de los fotorreceptores retinianos a la luz peligrosa (3-23). El siguiente párrafo retrata una descripción del mecanismo de acción de L/Z. El endoiluminador es una fuente de exposición intensa a la luz, principalmente luz azul. La sala de cirugía está llena de oxígeno, el combustible perfecto para la formación de radicales libres. El uso intraocular de soluciones de L/Z proporcionará una protección extra a la cirugía dada por su mecanismo de acción como filtro y antioxidante. Costa et al concluye que “la toxicidad retiniana inducida por la luz del endoiluminador depende de factores tales como la duración de uso, tipo, potencia y longitud de onda de la fuente de luz. El peligro de la radiación de luz se incrementa al disminuir la longitud de onda debido a que en los efectos fototóxicos más potentes intervienen rayos ultravioleta y luz azul, tal como se muestra en estudios experimentales.” Además, puesto que la oxidación es un problema sistémico que puede ocurrir en cualquier parte en los tejidos del cuerpo humano y puesto que la exposición al endoiluminador está presente en todas las cirugías, no solamente en cirugías oftálmicas, la presencia de L/Z como una ayuda quirúrgica puede disminuir el contacto y el ataque de los fotones de luz azul y los radicales libres a los tejidos, acelerando su degeneración (y enfermedades degenerativas consecuentes), virtualmente en todas las partes del cuerpo.

Luteína y zeaxantina son pigmentos lipofílicos que pertenecen al grupo de los carotenoides y se encuentran tradicionalmente en frutas y vegetales. Estos dos carotenoides son isómeros estructurales y tienen un grupo hidroxilo en la porción terminal de la molécula lo cual explica parcialmente su polaridad y tropismo diferentes para ciertas estructuras biológicas tales como la mácula. Existe una variedad significativa de estudios previos publicados, revisados por pares, que muestran que L/Z están asociadas con la posible prevención de maculopatías asociadas con la edad debido a (i) su mecanismo antioxidante que puede prevenir el progreso de la degeneración macular y (ii) su distribución exclusiva en la mácula. La distribución selectiva y específica de estos carotenoides sugiere que estos desempeñan un papel importante en esta región, tanto como un "filtro" de luz azul y como un antioxidante. La luz azul es bien conocida por ser uno de los mayores generadores de radicales hidroxilo, un espécimen de oxígeno reactivo que ataca estructuras biológicas tales como fotorreceptores. Las especies de oxígeno reactivo (ROS por Reactive Oxygen Species) se generan continuamente en la retina por la existencia de varias reacciones metabólicas, considerables niveles de oxígeno, ácidos grasos poliinsaturados y fotones de luz azul. La continua exposición a estos fotones en la retina conducirá a la formación de ROS los cuales en su búsqueda de estabilización capturarán un electrón de cualquier foto sensibilizante tal como un fotorreceptor, atacando esta estructura. Con una cadena poliénica

extensa, L/Z, si están presentes en el cristalino y en la región retiniana, pueden donar electrón necesitado para que las ROS formadas como resultado de la presencia de luz azul, sofocando la etapa tripleta de ambos fotosensibilizantes así como también el oxígeno singlete, inhibiendo más formación de ROS y previniendo la lipo-peroxidación. De manera interesante, las moléculas de L/Z absorben luz en la región del espectro visible, alrededor de 446nm, lo cual coincide exactamente con la región azul del espectro electromagnético. Por esta razón, es conocido que L/Z pueden ser absorbentes naturales de luz azul, disminuyendo su prevalencia negativa en el cristalino y en la retina. El uso de suplementos orales de L/Z con el objetivo de prevenir maculopatía asociadas con la edad ha sido registrado por varios años.

Ejemplo 10 - Formulación de tinte que incluyen L/Z y azul brillante (BB)/azul tripano (TB)

En referencia a la Fig. 1, basada en el principio del colorímetro, el eje *a* es desde verde a rojo, el eje *b* es desde azul amarillo y el eje *L* es desde negro a blanco. L/Z tiene un color naranja, de modo que su color está entre amarillo (b+) y rojo (a+); BB y TB tienen cada uno un color azul de modo que su color resultante cae entre azul (b-) y verde (a-). A fin de obtener un color verde para la solución, se necesite incrementar la cantidad de BB / TB o disminuir la cantidad de L/Z para obtener un valor *a* negativo. Pero con el fin de disminuir la toxicidad de la formulación es necesario incrementar la cantidad de L/Z y disminuir la cantidad de BB / TB.

Con base en los experimentos, una combinación en la proporción de L/Z 0.3%+BB0.025% (cercana a 10:1) tiene un buen color verde y posee alta actividad como tinte y baja toxicidad. L/Z 0.3%+TB 0.1% (3:1) también tiene un color verde interesante e intensidad intensa como tinte pero cierta toxicidad. A fin de disminuir la cantidad de TB a 0.05%, debemos aceptar una solución de color verde un poco oscuro (L/Z 0.5%+TB 0.05%) o aceptar una actividad como tinte un poco baja (L/Z 0.15%+TB0.05%). Una proporción 10:1 L/Z-BB es óptima para la relación color/toxicidad. Una proporción 3:1 L/Z – TB es óptima para el color pero no para la toxicidad. La proporción 10:1 parece el mejor balance entre color/solubilización/toxicidad con cada solución. Asimismo, las concentraciones de BB por debajo de 0.025% y de TB por debajo de 0.05% parecen tener eficacia de tinturado que fue perjudicada en ojos cadavéricos. Adicionalmente, las concentraciones de L/Z por encima de 0.5% pueden resultar en precipitación desde la solución y plantean un reto para la disolución. Además, parece que la concentración limitante de L/Z es 0.5% en cada combinación con BB o TB usando diferentes concentraciones de amortiguador de pH, tiempo de agitación y temperatura.

La descripción precedente y los dibujos comprenden modalidades ilustrativas de las presentes invenciones. Las modalidades precedentes y los métodos descritos en la presente pueden variar con base en la habilidad, experiencia y preferencia de aquellos versados en la

materia. El simple listado de las etapas del método en un cierto orden no constituye una limitación en el orden de las etapas del método. La descripción precedente y los dibujos simplemente explican que ilustran la invención y la invención no se limita a los mismos, excepto en la medida que las reivindicaciones las limiten. Aquellos versados en la materia que tienen la
5 revelación ante sí serán capaces de hacer modificaciones y variaciones en la misma sin apartarse del alcance de la invención.

Referencias

1. Heij ECL, Hendrikse F, Kessels AGH, Derhaag PJFM: Vitrectomy results in diabetic macular edema without evident vitreomacular traction (Resultados de vitrectomía en edema macular diabéticos tracción vítreomacular evidente). Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2001;239:264-70.
2. Gyorfer A, Messmer EM, Ulbig MW, Kampik A: Resolution of diabetic macular edema after surgical removal of the posterior hialoidea and the inner limiting membrane (Resolución de edema macular diabetic de la hialoidea posterior y la membrana limitante interior). Retina 2000;20:126-133.
3. Rodrigues EB, Meyer CH, Kroll P. Chromovitrectomy: a new field in vitreoretinal surgery (Cromovitrectomía: un nuevo campo en la cirugía víteorretiniana). Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2005;243:291-3.
4. Burk SE, Da Mata AP, Snyder ME, et al. Indocyanine green-assisted peeling of the retinal internal limiting membrane (Separación de la membrana limitante interna retiniana asistido con indocianina verde). Ophthalmology 2000;107:2010-2014.
5. Gyorfer A, Messemer EM, Ulbig MW, et al: Indocyanine green selectively stains the internal limiting membrane (Indocianina verde tintura selectivamente la membrana limitante interna). Am J Ophthalmol 2001;131:387-88.
6. Rodrigues EB, Meyer CH, Farah ME, Kroll P. Intravitreal staining of the internal limiting membrane using indocyanine green in the treatment of macular holes (Tinturado intravítreo de la membrana limitante interna utilizando indocianina verde en el tratamiento de agujeros maculares). Ophthalmologica 2005;219:251-62.
7. Enaida H, Sakamoto T, Hisatomi T, et al: Morphological and functional damage of the retina caused by intravitreal indocyanine green in rat eyes (Daño morfológico y funcional de la retina causada por indocianina verde intravítrea en ojos de rata). Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2002;240:209-13.
8. Maia M, Margalit E, Tso MOM, et al: Effects of intravitreal indocyanine green injection in rabbits (Efectos de inyección de indocianina verde intravítrea en conejos). Retina 2004;24:69-79.
9. Maia M, Kellner L, de Juan E, Jr., et al: Effects of indocyanine green injection on the retinal surface and into the subretinal space in rabbits (Efectos de inyección de indocianina verde en las superficies retiniana y adentro del espacio sub retiniano en Conejos). Retina 2004;24:80-91.
10. Stalmans P, Van Aken EH, Melles G, et al: Trypan blue not toxic for retinal pigment epithelium in vitro (Azul tripano no tóxico para el epitelio del pigmento retiniana in vitro). Am J Ophthalmol 2003;135:234-36.

11. Rodrigues EB, Costa EF, Penha FM, Melo GB, Bottós J, Dib E, Furlani B, Lima VC, Maia M, Meyer CH, Höfling-Lima AL, Farah ME. *SurvOphthalmol.* 2009 Sep-Oct;54(5):576-617. Dyes in ocular surgery: principles for use in chromovitrectomy (Tintes en cirugía ocular: principios para uso en cromo vitrectomía).
- 5 12. Farah ME, Maia M, Rodrigues EB. *Am J Ophthalmol.* 2009 Sep;148(3):332-40. Epub 2009 Mayo 24.
13. Rodrigues EB, Penha FM, Farah ME, de Paula Fiod Costa E, Maia M, Dib E, Bottós J, Freymuller E, Furlani B, Meyer CH, Magalhães O Jr, Lima-Filho AA, Safatle A. *Retina.* 2009 Abr;29(4):497-510.
- 10 14. Costa Ede P, Rodrigues EB, Farah ME, Dib E, Penha F, Magalhães O Jr, Furlani BA, Lima Filho AA, de Mirya A, Maia M. Vital dyes and light sources for chromovitrectomy: comparative assessment of osmolarity, pH, and spectrophotometry. Current concepts of trypan blue in chromovitrectomy (Tintes vitales y fuentes de luz para cromo vitrectomía: evaluación comparativa de osmolaridad, pH y espectrofotometría. Conceptos actuales de azul tripano en cromo vitrectomía) *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009 Enero;50(1):385-91. Epub 2008 Agosto 8.
- 15 15. Maia M, Penha FM, Farah ME, Dib E, Príncipe A, Lima Filho AA, Magalhães O Jr, Freymüller E, Rodrigues EB. Subretinal injection of preservative-free triamcinolonaacetone and supernatant vehicle in rabbits: an electron microscopy study (Inyección subretiniana de triamcinolonaacetona y vehículo sobrenadante en conejos: un estudio de microscopía electrónica). *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2008 Mar;246(3):379-88. Epub 2007 Dic 11.
- 20 16. Maia M, Penha F, Rodrigues EB, Príncipe A, Dib E, Meyer CH, Freymuller E, Moraes N, Farah ME. *Curr Eye Res.* 2007 Abr;32(4):309-17.
- 25 17. Maia M, Farah ME, Belfort RN, Penha FM, Lima Filho AA, Aggio FB, Belfort R Jr. Effects of intravitreal triamcinolona acetone injection with and without preservative. Effects of subretinal injections of indocyanine green, trypan blue, and glucose in rabbit eyes (Efectos de inyección de triamcinolona acetona con y sin preservativo. Efectos de inyecciones de indocianina verde, azul tripano y glucosa en ojos de conejo). *Br J Ophthalmol.* 2007 Sep;91(9):1122-4. Epub 2007 Mar 23.
- 30 18. Penha FM, Maia M, Eid Farah M, Príncipe AH, Freymüller EH, Maia A, Magalhães O Jr, Smith RL *Ophthalmology.* 2007 May;114(5):899-908. Epub 2007 Feb 8.
- 35 19. Farah, M. E., Maia, M, Rodrigues, E. B. Dyes in Ocular Surgery: Principles for Use in Chromovitrectomy (Tintes en cirugía ocular: principios para uso en cromovitrectomía). *American Journal of Ophthalmology*, v.23, p.1 - 1, 2009. Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Impresso, Home page: doi:10.1016/j.ajo.2009.04.003].

20. Rodrigues, E. B., Penha, F. M., Farah M. E., Costa, E. F., Maia, M, dib, E., Bottos, J. M., Freymuller, E., Furlani, B. A., Meyer, C., Magalhaes Jr., O., Lima-Filho, A. A. S., Safatle, A. Preclinical investigation of the retinal biocompatibility of six novel vital dyes for chromovitrectomy. *Retina (Philadelphia)* (Investigación clínica de la biocompatibilidad retiniana de seis tintes vitales novedosos para cromovitrectomía), v.29, p.497 - 510, 2009. Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Impresso.
21. Maia, M, Farah M. E., Rodrigues, E. B., Malerbi, F. Subretinal brilliant blue G migration during internal limiting membrane peeling (Migración de azul brillante G subretiniana durante el desprendimiento de la membrana limitante interna). *British Journal of Ophthalmology*, v.93, p.330 - 331, 2009. Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Impresso.
22. Dib, E., Rodrigues, E. B., Maia, M, Meyer, C., Penha, F. M., Furlani, B. A., Farah, M. E. Vital Dyes in chromovitrectomy (Tintes vitales en cromovitrectomía). *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* (Impresso), v.72, p.845 - 850, 2009. Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Impresso.
23. Penha, F. M., Maia, M., Farah, M. E., Dib, E., Príncipe, A. H., Devin, F., Rodrigues, E. B., Duprat, J. P., Freymüller, E. Morphologic y Clinical Effects of Subretinal Injection of Indocyanine green y Infracyanine Green in Rabbits (Efectos morfológicos y químicos de infección subretiniana de indocianina verde e infracianina verde en conejos). *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, v.24, p.52 - 61, 2008. Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Meio digital (DOC. F2).
24. Maia, M., Penha, F. M., Farah, M. E., Dib, E., Principe, A., Lima Filho, A. S., Magalhaes Jr., O., Freymuller, E., Rodrigues, E. B. Subretinal injection of preservative-free triamcinolona acetate and supernatant vehicle in rabbits: an electron microscopy study. (Inyección sub retiniana de triamcinolona acetona y vehículo sobrenadante en conejos) *Graef's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, v.246, p.379 - 388, 2008. Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Meio digital (DOC. F4).
25. Rodrigues, E. B., Maia, M., Penha, F. M., Dib, E., Bordon, A. F., Magalhães JR., O., Farah, M. E. Técnica para injeção intravítrea de drogas no tratamento de doenças vítreoretinianas. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, v.71, p.902 - 907, 2008. Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Meio digital, Home page: doi:10.1590/s0004-27492008000600028].
26. Rodrigues, E. B., Maia, M., Penha, F. M., Dib, E., Bordon, A. F., Magalhães JR., O., Farah, M. E. Técnica para injeção intravítrea de drogas no tratamento de doenças vítreoretinianas. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, v.71, p.902, 2008. Referências adicionais: Português. Meio de divulgação: Meio digital, Home page:[doi:10.1590/s0004-27492008000600028].

27. Penha, F. M., Maia, M., Farah, M. E., Kawakami, L. T., Hofling-Lima, A. L. Thermal damage to a light probe using a xenon light source (Daño térmico a una muestra de luz usando una fuente de luz de xenón). *Acta Ophthalmologica Scyinaica*, v.86, p.461 - 462, 2008. Referências adicionais: Inglês. Meio de divulgação: Meio digital (DOC. F5).
- 5 28. Massanat, Y., Shenoy, H., Speirs, V., Hanby, A., Horgan, K. Properties y characteristics of the dyes injected to assist axillary sentinel node localization in breast surgery (Propiedades características de los tintes inyectados para ayudar localización del nodo centinela axilar en cirugía de mama). *European Journal of Surgical Oncology*, 2006, vol. 32, no4, pp. 381-384.
- 10 29. Prien, S.D., Dunn, C., Messer, R. H. Adhesion-promoting properties of dyes routinely used during fertility surgeries (Propiedades de promoción de adhesión de tintes usados rutinariamente durante cirugías de fertilidad). *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 1995, Volumen 12, Número 2, 136-140.
- 15 30. Kim, S. H., Milson, J.M. Perioperative tumor localization for laparoscopic colorectal surgery *Surgical Endoscopy* (Localización de tumor perioperativo para cirugía colorrectal laparoscópica. *Endoscopia quirúrgica*), 1997, volumen 11, número 10, 1013-1016.
31. Sorsby, A., Wright, A. D., Vital Staining in Brain Surgery (Tinturado vital en cirugía de cerebro). *A Preliminary Note Proc R Soc Med*. 1943 January; 36(3): 137–140.
- 20 32. Costa E.dP.F, Rodrigues E.B., Farah M.E., Dib E., Penha F., Magalhaes, O. Jr, et al. Vital Dyes y Light Sources for Chromovitrectomy: Comparative Assessment of Osmolarity, pH, y Spectrophotometry (Tintes y fuentes de luz para cromovitrectomía: evaluación comparativa de osmolaridad, pH y espectrofotometría). *IOVS*. 2009;50:385-91.
- 25 33. Beatty S., Boulton M., Henson D., Koh H.H., and Murray I.J. Macular pigment y age related macular degeneration (Pigmento macular y degeneración macular asociada con la edad). *Br J Ophthalmol* 83: 867-877, 1999. Antioxidant status y neovascular age-related macular degeneration. Eye Disease Case-Control Study Group (Estado antioxidante y degeneración macular, asociada con la edad, neovascular. Estudio de control de caso de enfermedad ocular. *Arch Ophthalmol* 111: 104-109, 1993.
- 30 34. Brown L., Rimm E.B., Seddon J.M., Giovannucci E.L., Chasan-Taber L., Spiegelman D., Willett W.C., and Hankinson S.E. A prospective study of carotenoid intake y risk of cataract extraction in US men (Un estudio prospectivo de ingesta de carotenoide y riesgos de extracción de catarata en hombres de Estados Unidos). *Am J Clin Nutr* 70: 517-524, 1999.
- 35 35. Acosta M.M., Boyce H.W. Chromoendoscopy-where is it useful? (Cromoendoscopia: ¿dónde es útil? *J Clin Gastroenterol*. 1998;27:13-20.
36. Sorsby A. Vital staining of the fundus (Tinturado vital del fondo). *Trans Ophthal Soc UK*. 1939;59:727-730.

37. Gifford H. Use of fluorescein intravenously as an aid to ophthalmic diagnosis y treatment (Uso de fluoresceína por vía intravenosa como una ayuda al diagnóstico y tratamiento oftálmicos). *Arch Ophthalmol*. 1940;24:122-131.

38. Rodrigues, E, y Meyer, C. Current Dyes in Chromovitrectomy: Pros y Cons (Tintes actuales en cromo vitrectomía: pros y contras) Mayo 2005
<http://www.retinianaphysician.com/article.aspx?article=100086>.

Reivindicaciones

1. Un método para tratar tejidos, membranas u otras estructuras, todos biológicos, el cual comprende seleccionar un tinte natural seleccionado del grupo que consiste de luteína, zeaxantina, urucum, licopeno, astaxantina, beta-caroteno, y beta-criptoxantina, solo o en combinación entre sí, u otros tintes sintéticos, y aplicar el tinte al tejido, membranas u otra estructura biológicos puede.
2. Un método, tal como se define en la reivindicación 1, donde la aplicación del tinte a los tejidos, membranas u otras estructuras biológicas dan lugar a tinturado en el tejido, las membranas u otras estructuras.
3. Un método, tal como se define en la reivindicación 2, que comprende además la etapa de separar los tejidos, membranas u otras estructuras biológicas temporadas del tejido circundante.
4. Un método, tal como se define en la reivindicación 3, donde la etapa de separación se selecciona del grupo consistente de cirugías oftálmicas, de cerebro, abdominal, artro-ortopédica, plástica, ginecológica y de cáncer.
5. Un método, tal como se define en la reivindicación 1, que comprende además una etapa de adicionar un segundo tinte seleccionado del grupo que consiste en azul brillante, indocianina verde, infracianina verde, azul tripano, azul patente, azul bromofenol, verde rápido, carmín de índigo, azul de Evans, verde ligero, triamcinolona, violeta cristal, fluoresceína, acetato de fluormetolona y rojo de congo y combinaciones de los mismos.
6. Un método, tal como se define en la reivindicación 1, donde dicho tinte se aplica al tejido, membranas u otra estructura biológica para protegerlos de daño por luz al exponerse durante un procedimiento médico.
7. Un método, tal como se define en la reivindicación 6, donde dicho tinte consiste esencialmente de luteína y zeaxantina.
8. Un método, tal como se define en la reivindicación 1, donde el tejido, las membranas u otra estructura biológica consiste en un tejido, membranas u otra estructura biológica del ojo y dicho tinte se aplica inyectándolo sobre el tejido, las membranas u otra estructura biológica del ojo.

9. Un método, tal como se define en la reivindicación 8, donde un implante ocular que incluye luteína y zeaxantina se inserta en el tejido ocular (superficie externa o intraocularmente) para protección contra la degeneración macular o para retrasar la progresión de la degeneración macular.

5

10. Un método, tal como se define en la reivindicación 8, donde el tinte comprende una forma de liberación lenta de una combinación consistente en luteína y zeaxantina colocada en el ojo.

10 11. Una composición para tinturar tejidos, membranas u otras estructuras biológicas que comprende un tinte natural seleccionado del grupo consistente en luteína, zeaxantina, urucum, licopeno, astaxantina, beta-caroteno, y beta-criptoxantina, solos o en combinación entre sí y un vehículo aceptable en farmacia.

15 12. Una composición de acuerdo con la reivindicación 11, el cual comprende además un tintes seleccionados del grupo consistente en azul brillante, indocianina verde, infracianina verde, azul tripano, azul patente, azul bromofenol, verde rápido, carmín de índigo, azul de Evans, verde ligero, triamcinolona, violeta cristal, fluoresceína, acetato de fluormetolona y rojo de congo y combinaciones de los mismos.

20

13. Una composición de acuerdo con la reivindicación 12, donde el tinte está presente en una concentración de 0.001% a 20%.

25 14. Una composición de acuerdo con la reivindicación 11, donde dicho límite natural consiste esencialmente de luteína y zeaxantina, solas o combinadas.

15. Una composición de acuerdo con la reivindicación 11, donde el vehículo se selecciona del grupo consistente en amortiguador de pH de fosfato, solución de sal balanceada, alcohol polivinílico, alcohol bencílico, agua purificada, fosfato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, cloruro de potasio, citrato de sodio, acetato de sodio, ácido bórico, borato de sodio, metilcelulosa y sus derivados, ácido hialurónico, dextrano, polisorbato de sodio, Tweens, sulfato de condroitina, edetato de sodio, propilenglicol, polietilenglicol, sodio fenilo, ftalato de potasio, fosfato de potasio, ácido cítrico, carbomer 934, Carbopol, ácido meta fosfórico, ácido glicocólico, ácido acético, y combinaciones de los mismos.

35

16. Una composición de acuerdo con la reivindicación 12, donde la composición comprende un primer y un segundo tintes a una tasa que están en un rango entre 0.001% y 20%.

17. Una composición para tinturar tejidos, membranas u otras estructuras biológicas, la cual comprende (a) uno o más tintes seleccionados del grupo consistente en aquellos estados en las primeras tres filas de la siguiente tabla dentro del rango declarado; (b) opcionalmente uno o
5 varios tintes seleccionados del grupo consistente en aquellos que están listados en las filas “activas” restantes de la siguiente tabla dentro del rango declarado; y (c) uno o varios vehículos seleccionados del grupo consistente en aquellos que están listados en la fila “vehículo” de la siguiente tabla dentro del rango declarado:

Componente	Concentración [% p/v]	Concentración preferible [% p/v]	Función dentro de la composición
Luteína	0.001% a 20%	0.01%-5%	Activa
Zeaxantina	0.0007% a 20%	0.007%-0.5%	Activa
Urucum	0.01% a 20%		Activa
Azul brillante	0.01% a 0.05%	0.0125%-0.025%	Activa
Verde Indocianina	0.001% a 20%	0.5%	Activa
Verde Infracianina	0.001% a 20%	0.5%	Activa
Azul tripano	0.001% a 20%	0.04%	Activa
Azul patente	0.05% a 0.5%	0.24%	Activa
Azul bromofenol	0.05% a 0.5%	0.2%	Activa
Verde rápido	0.001% a 20%		Activa
Carmín de índigo	0.001% a 20%		Activa
Azul de Evans	0.001% a 20%		Activa
Verde ligero	0.001% a 20%		Activa
Triancinolone	0.001% a 20%		Activa
Violeta cristal	0.001% a 20%		Activa
Fluoresceína	0.001% a 20%		Activa
Acetato de fluormetolona	0.001% a 20%		Activa
Rojo de Congo	0.001% a 20%		Activa
Amortiguador de pH fosfato	0.001% a 99.99%		Vehículo
Solución salina balanceada	0.001% a 99.99%		Vehículo
Ácido polivinílico	0.001% a 99.99%		Vehículo
Ácido bencílico	0.001% a 99.99%		Vehículo
Agua purificada	0.001% a 99.99%		Vehículo
Fosfato de sodio	0.001% a 99.99%		Vehículo
Cloruro de sodio	0.001% a 99.99%		Vehículo
Cloruro de calcio	0.001% a 99.99%		Vehículo
Cloruro de magnesio	0.001% a 99.99%		Vehículo
Cloruro de potasio	0.001% a 99.99%		Vehículo
Citrato de sodio	0.001% a 99.99%		Vehículo
Acetato de sodio	0.001% a 99.99%		Vehículo
Ácido bórico	0.001% a 99.99%		Vehículo
Borato de sodio	0.001% a 99.99%		Vehículo
Metilcelulosa y sus derivados	0.001% a 99.99%		Vehículo

Componente	Concentración [% p/v]	Concentración preferible [% p/v]	Función dentro de la composición
Ácido hialurónico	0.001% a 99.99%		Vehículo
Dextrano	0.001% a 99.99%		Vehículo
Polisorbato de sodio	0.001% a 99.99%		Vehículo
Tweens	0.001% a 99.99%		Vehículo
Sulfato de condroitina	0.001% a 99.99%		Vehículo
Edetato de sodio	0.001% a 99.99%		Vehículo
Propilenglicol	0.001% a 99.99%		Vehículo
Polietilenglicol	0.001% a 99.99%		Vehículo
Fenilfosfato de sodio	0.001% a 99.99%		Vehículo
Ftalato de potasio	0.001% a 99.99%		Vehículo
Fosfato de potasio	0.001% a 99.99%		Vehículo
Ácido cítrico	0.001% a 99.99%		Vehículo
Carbomer 934	0.001% a 99.99%		Vehículo
Carbopol	0.001% a 99.99%		Vehículo
Ácido meta fosfórico	0.001% a 99.99%		Vehículo
Glicocol	0.001% a 99.99%		Vehículo
Ácido acético	0.001% to 99.99%		Vehículo

5

10 Traducción realizada por Rafael Baracaldo
Id. 253709 - WPCL1390

Resumen

La presente invención se refiere al uso de uno o varios tintes naturales, solos o en combinación con otros tintes, para la preparación de una composición para tinturar membranas y estructuras biológicas, a fin de facilitar su identificación durante procedimientos quirúrgicos. La

5 presente invención se refiere al uso de uno o varios tintes naturales, solos o en combinación con otros tintes, para tinturar membranas y estructuras biológicas a fin de facilitar su identificación durante procedimientos quirúrgicos.

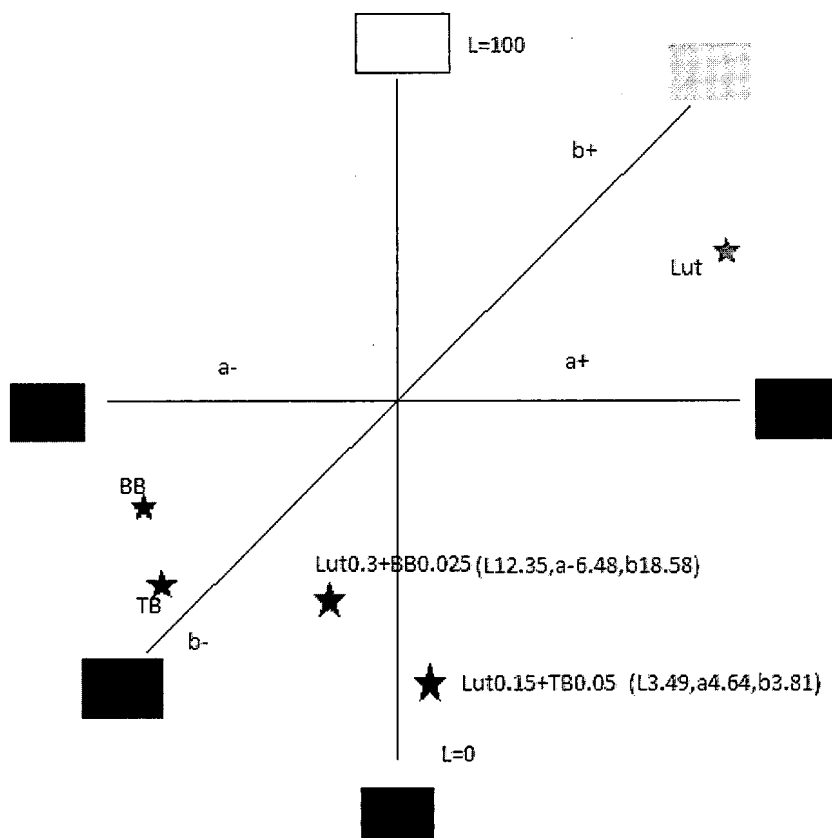


FIG.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 4532670/97620	FOR FURTHER ACTION	See Form PCT/IPEA/416																
International application No. PCT/US12/31098	International filing date (day/month/year) 29 March 2012 (29.03.2012)	Priority date (day/month/year) 29 March 2011 (29.03.2011)																
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC IPC: A61K 9/00(2006.01) USPC: 424/400																		
Applicant KEMIN INDUSTRIES, INC.																		
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of <u>2</u> sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☒ (sent to the applicant and to the International Bureau) a total of <u>1</u> sheets, as follows: ☒ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority, unless those sheets were superseded or cancelled, and any accompanying letters (see Rules 46.5, 66.8, 70.16, 91.2, and Section 607 of the Administrative Instructions). ☐ sheets containing rectifications, where the decision was made by this Authority not to take them into account because they were not authorized by or notified to this Authority at the time when this Authority began to draw up this report, and any accompanying letters (Rules 66.4bis, 70.2(e), 70.16 and 91.2). ☐ superseded sheets and any accompanying letters, where this Authority either considers that the superseding sheets contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, or the superseding sheets were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box (see Rule 70.16(b)). b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) _____ containing a sequence listing, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see paragraph 3bis of Annex C of the Administrative Instructions).																		
4. This report contains indications relating to the following items: <table><tr><td>☒ Box No. I</td><td>Basis of the report</td></tr><tr><td>☐ Box No. II</td><td>Priority</td></tr><tr><td>☒ Box No. III</td><td>Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</td></tr><tr><td>☒ Box No. IV</td><td>Lack of unity of invention</td></tr><tr><td>☒ Box No. V</td><td>Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</td></tr><tr><td>☐ Box No. VI</td><td>Certain documents cited</td></tr><tr><td>☐ Box No. VII</td><td>Certain defects in the international application</td></tr><tr><td>☐ Box No. VIII</td><td>Certain observations on the international application</td></tr></table>			☒ Box No. I	Basis of the report	☐ Box No. II	Priority	☒ Box No. III	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability	☒ Box No. IV	Lack of unity of invention	☒ Box No. V	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement	☐ Box No. VI	Certain documents cited	☐ Box No. VII	Certain defects in the international application	☐ Box No. VIII	Certain observations on the international application
☒ Box No. I	Basis of the report																	
☐ Box No. II	Priority																	
☒ Box No. III	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability																	
☒ Box No. IV	Lack of unity of invention																	
☒ Box No. V	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement																	
☐ Box No. VI	Certain documents cited																	
☐ Box No. VII	Certain defects in the international application																	
☐ Box No. VIII	Certain observations on the international application																	
Date of submission of the demand 29 January 2013 (29.01.2013)	Date of completion of this report 13 March 2013 (13.03.2013)																	
Name and mailing address of the IPEA/ US Mail Stop PCT, Attn: IPEA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201	Authorized officer NISSA WESTERBERG Telephone No. (571) 272-0700																	

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.

PCT/US12/31098

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the **language**, this report is based on:

- ☒ the international application in the language in which it was filed.
- ☐ a translation of the international application into English which is the language of a translation furnished for the purposes of:
- ☐ international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).
 - ☐ publication of the international application (Rule 12.4(a)).
 - ☐ international preliminary examination (Rules 55.2(a) and/or 55.3(a) and (b)).

2. With regard to the **elements** of the international application, this report is based on (*replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report*):

- ☐ the international application as originally filed/furnished
- ☒ the description:
pages 1-25 as originally filed/furnished
pages* NONE received by this Authority on _____
pages* NONE received by this Authority on _____
- ☒ the claims:
pages none as originally filed/furnished
pages* NONE as amended (together with any statement) under Article 19
pages* 26-28 received by this Authority on 07 February 2013(07.02.2013)
pages* NONE received by this Authority on _____
- ☒ the drawings:
pages 1/1 as originally filed/furnished
pages* NONE received by this Authority on _____
pages* NONE received by this Authority on _____
- ☐ a sequence listing - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing.

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/figs _____
- ☐ the sequence listing (*specify*): _____

4. ☒ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since either they are considered to go beyond the disclosure as filed, or they were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rules 70.2(c) and (c-bis)):

- ☐ the description, pages _____
- ☒ the claims, Nos. 22
- ☐ the drawings, sheets/figs _____
- ☐ the sequence listing (*specify*): _____

5. ☐ This report has been established:

- ☐ taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rules 66.1(d-bis) and 70.2(e)).
- ☐ without taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rules 66.4bis) and 70.2(e)).

6. ☐ Supplementary international search report(s) from Authority(ies) _____ has/have been received and taken into account in establishing this report (Rule 45bis.8(b) and (c)).

* If item 4 applies, some or all of those sheets may be marked "superseded."

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/US12/31098

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 19-24
- because:
- ☐ the said international application, or the said claim Nos. _____ relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):
- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☒ no international search report has been established for said claims Nos. 19-24
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:
 - ☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.
 - ☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.
 - ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13ter.1(a) or (b) and 13ter.2.
- ☐ See Supplemental Box for further details

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/US12/31098

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has, within the applicable time limit:

- ☐ restricted the claims.
- ☒ paid additional fees.
- ☐ paid additional fees under protest, and, where applicable, the protest fee.
- ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid.
- ☐ neither restricted the claims nor paid additional fees.

2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is:

- ☐ complied with.
- ☒ not complied with for the following reasons:

Group I - claims 1-12 drawn to a method of staining biological tissues, membranes or other structures, comprising selecting a carotenoid and applying the dye directly to the biological tissue, membrane or other structure. The first invention si restricted to lutein.

Group II - claims 13 - 18, drawn to a composition for staining biological tissues, membranes or other structures comprising a carotenoid dye in a pharmacologically acceptable vehicle;

Groups I and II lack unity of invention because even though the inventions of these groups require the technical feature of a composition of a natural dye such as lutein, this technical feature is not a special technical feature as it does not make a contribution over the prior art in view of US 2011/0021465 A1 to Minatelli et al. (hereinafter Minatelli) that discloses composition for staining biological tissues, membranes or other structures that comprises lutein and/or trans-zeaxanthin or meso-zeaxanthin and a pharmaceutically acceptable vehicle (krill oil; claim 1). As said composition is known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

Another special technical feature of the inventions is the specific dyes recited therein. As said dyes were known in the art at the time of the invention, the inventions do not share a special technical feature. Without a shared technical feature, the inventions lack unity with one another.

Groups I and II therefore lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:

- ☐ all parts.
- ☒ the parts relating to claims Nos. 1-18 limited to lutein

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/US12/31098

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement			
Novelty (N)	Claims	<u>2,4,6,7,9,11,14 and 16-18</u>	YES
	Claims	<u>3,5,8,10,12,13 and 15</u>	NO
Inventive Step (IS)	Claims	<u>NONE</u>	YES
	Claims	<u>1-18</u>	NO
Industrial Applicability (IA)	Claims	<u>1-18</u>	YES
	Claims	<u>NONE</u>	NO

2. Citations and Explanations (Rule 70.7)
Please See Continuation Sheet

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/US12/31098

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.
Continuation of:

Continuation for the new matter
The specification only disclosed "a slow-release form of L/Z placed in the eye" and the claim limitation in claim 22 of a slow delivery system for any carotenoid applied directly to the eye goes beyond the original disclosure.

V. 2. Citations and Explanations:
Claims 1, 3, 5, 8, 10, 12 and 13 lack novelty under PCT Article 33(2) as being anticipated by US 2008/0254140 A1 to Widder et al. (hereinafter Widder).

Regarding claim 1, Widder teaches a method of treating biological tissues comprising selecting a natural dye consisting of lutein and applying the dye to the biological tissue such as the eye by intraocular injection, subretinal injection, intravitreal injection, periocular administration, intracameral injection (including in to the anterior or vitreous chamber), ophthalmic solutions, ophthalmic suspensions or ocular implants (para [00043] - [0044] and [0108], which reads on applying the dye directly to the tissue (e.g. intravitreal is directly to the vitreous; periocular administration directly to the cornea or sclera)

Regarding claim 3, Widder teaches lutein and zeaxanthin (para [0043]).

Regarding claim 5, the routes include intraocular injection.

Regarding claim 8, the internal limiting membrane and posterior hyaloid membrane cover the retina and the administration routes of Widder read on direct application to these tissues (para [0108]).

Regarding claim 10, intravitreal injection applies the dye to the vitreous (para [0108]).

Regarding claim 12, the administration routes of Widder such as subretinal read on application to neuronal tissue.

Regarding claim 13, Widder teaches the dye comprises a slow-release form of a combination consisting essentially of lutein placed in the eye (para [0043]-[0044], [0108]).

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/US12/31098

Supplemental Box

Claims 13 and 15 lacks novelty under PCT Article 33(2) as being anticipated by US 2011/0021465 to Minatelli et al. (hereinafter Minatelli).

Regarding claims 13 and 15, Minatelli teaches a composition for staining biological tissues, membranes or other structures, comprising a natural dye such as lutein, zeaxanthin or astaxanthin and a pharmaceutically acceptable vehicle (para [0052], claim 1).

Claims 6, 7, 9 and 11 lack inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Widder.

Regarding claim 6, Widder does not specifically teach application to the anterior lens capsule. Widder teaches that the compositions are used to protect from ophthalmic conditions such as macular degeneration, protect the eyes of mammal from light (para [0010]). It would have been obvious to a skilled artisan at the time to apply the composition to this portion of the eye which is exposed to light from that light by application of the lutein containing composition.

Regarding claim 7, application of the composition will protect the surrounding portions of the eye during the lens removal process (capsulorhexis).

Regarding claim 9, Widder does not specifically teach internal limiting membrane or posterior hyaloid membrane staining during vitreoretinal surgery. It would have been obvious to a skilled artisan at the time to apply the formulation to the vitreous during vitreoretinal surgery to provide the protective effects to the portions of the eye that may be adversely affected by the surgery which would result in application to these structures.

Regarding claim 11, Widder does not specifically teach intravitreal injection during vitreoretinal surgery. It would have been obvious to a skilled artisan at the time to apply the formulation to the vitreous during vitreoretinal surgery to provide the protective effects to the portions of the eye that may be adversely affected by the surgery.

Claims 2 and 4 lack inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Widder in view of Wu

Regarding claim 2, Widder does not teach separating the stained tissue from the surrounding unstained tissues. Wu teaches applying the natural dye lutein and also exposing the tissues to indocyanine green (ICG; abstract, p 539, para 4, p 537, last para, p 538 para 1). Wu teaches peeling of the stained tissues from the surrounding tissues, abstract and p 537, para 2). It would have been obvious to a skilled artisan at the time to have applied the ICG and lutein to a tissue and then to separate the stained tissue from unstained purpose, the staining highlighting the tissue to differentiate the tissue to be removed from the tissue that should remain behind as the skilled artisan would have readily appreciated.

Regarding claim 4, Wu teaches the combination of lutein with the synthetic dye ICG.

Claims 14, 16 and 17 lack inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Minatelli in view of Wu et al. entitled "Phototoxicity of Indocyanine Green on Human retinal Pigment Epithelium in Vitro and its reduction by lutein" (hereinafter Wu).

Regarding claims 14 and 17, Minatelli does not specifically teach the composition further comprising a dye (para [0054] - [0055]) such as those listed in claim 14. Wu teaches treatment of an eye by application of a composition comprising both lutein (abstract and p 538, para 4) and application of a dye comprising 0.5% indocyanine green (abstract, p 538, para 3). It would have been obvious to a skilled artisan at the time to have provided a composition for staining biological tissues as claimed, further comprising a dye consisting of indocyanine green in view of Minatelli teaching treatment of an eye comprising application of a composition comprising lutein and a dye (para [0054]-[0055]) in light of Wu teaching treatment of an eye by application of a composition comprising lutein (abstract and p 538, para 4) and application of a dye comprising indocyanine green (abstract) since a skilled artisan would have readily appreciated application of a composition of both lutein and indocyanine green during ocular surgery would reduce the number of compositions needed to perform ocular surgery treatment, thus improving efficiency.

Regarding claim 16, Minatelli teaches the dye is present in a concentration of 0.001% to 20% (para 0233)).

Claim 18 lacks inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Minatelli in view of US 2009/0035369 A1 to Sela, Y. (hereinafter Sela).

Regarding claim 18, Minatelli does not specifically teach a vehicle selected from the list in claim 18 although the formulation is formulated for ocular treatment (para [0054]. Sela teaches a composition comprising lutein and vehicle selected from water or an alcohol such as benzyl alcohol (para [0036], [0157], [0165]). It would have been obvious to one of ordinary skill in the art at the time to have provided the lutein as an ocular composition as taught by Minatelli wherein the vehicle is water or alcohol in light of Sela teaching compositions of lutein and a vehicle selected from water and alcohol for ocular administration since a skilled artisan would readily appreciate use of water or benzyl alcohol as a vehicle suitable for a lutein composition for ocular administration.

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/US12/31098

Supplemental Box

Claims 1 - 18 have industrial applicability as defined by PCT Article 33(4) because the subject matter can be made or used in industry.

We claim:

1. A method of staining biological tissues, membranes, or other structures, comprising selecting a dye consisting of carotenoids, alone or in combination with each other or other synthetic dyes, and applying the dye directly to the biological tissue, membrane, or other structure to be stained.
2. A method as defined in claim 1, further comprising the step of separating the stained biological tissue, membrane, or other structure from surrounding unstained tissues.
3. A method as defined in claim 1, wherein the carotenoids are selected from the group of lutein, zeaxanthin, lycopene, astaxanthin, beta-carotene, and beta-cryptoxanthin, alone or in combination with each other.
4. A method as defined in claim 1, wherein the synthetic dye is selected from the group consisting of brilliant blue, trypan blue, patent blue, indocyanine green, infracyanine green, bromophenol blue, fast green, indigo carmine, evans blue, light green, triamcinolone, crystal violet, fluorescein, flurometolone acetate and congo red, and combinations thereof.
5. A method as defined in claim 1, wherein the biological tissues, membranes, or other structures are intraocular.
6. A method as defined in claim 5, wherein the biological structure consists of the anterior lens capsule.
7. A method as defined in claim 6, wherein the anterior lens capsule is stained during capsulorhexis.
8. A method as defined in claim 5, wherein the biological membrane is selected from the group consisting of the internal limiting membrane, epiretinal membrane, and posterior hyaloid membrane.

#2257186

9. A method as defined in claim 8, wherein the biological membrane is stained during vitreoretinal surgery.
10. A method as defined in claim 5, wherein the biological structure consists of the vitreous.
11. A method as defined in claim 10, wherein the vitreous is stained during vitreoretinal surgery.
12. A method as defined in claim 1, wherein the biological tissues, membranes, or other structures are gynecological, abdominal, neural, or orthopedic.
13. A composition for staining biological tissues, membranes, or other structures comprising a carotenoid dye selected from the group of lutein, zeaxanthin, lycopene, astaxanthin, beta-carotene, and beta-cryptoxanthin, alone or in combination with each other or other synthetic dyes in a pharmacologically acceptable vehicle.
14. A composition according to claim 13, wherein the synthetic dye is selected from the group consisting of brilliant blue, trypan blue, patent blue, indocyanine green, infracyanine green, bromophenol blue, fast green, indigo carmine, evans blue, light green, triamcinolone, crystal violet, fluorescein, flurometolone acetate and congo red, and combinations thereof.
15. A composition according to claim 13, wherein the carotenoid dye is lutein and/or zeaxanthin.
16. A composition according to claim 15, wherein the carotenoid dye is present in concentrations of 0.001% to 20%.
17. A composition according to claim 14, wherein the synthetic dye is present in concentrations of 0.0001% to 5%.

18. A composition according to claim 13, wherein the pharmaceutically acceptable vehicle is selected from the group consisting of phosphate buffer, balanced salt solution, polyvinyl alcohol, benzyl alcohol, purified water, sodium phosphate, sodium chloride, calcium chloride, magnesium chloride, potassium chloride, sodium citrate, sodium acetate, boric acid, sodium borate, methyl cellulose and its derivatives, hyaluronic acid, dextran, sodium polysorbate, polysorbates, chondroitin sulfate, sodium edetate, propylene glycol, polyethylene glycol, phenyl sodium, potassium phthalate, potassium phosphate, citric acid, carbomer 934, carbopol, metaphosphoric acid, glycocholic acid, acetic acid, and combinations thereof.

19. A method of directly applying carotenoids to the eye.

20. A method as defined in claim 19, wherein the direct application of carotenoids to the eye results in one or more effects selected from the group consisting of protection against macular degeneration, delaying the progression of macular degeneration, acting as a neuroprotectant, and protecting against or delay the progression of other eye diseases.

21. A method as defined in claim 19, wherein carotenoids are directly applied via intravitreal injection.

22. A method as defined in claim 19, wherein the carotenoids are directly applied utilizing a slow delivery system.

23. A method as defined in claim 22, wherein the slow delivery system comprises via ocular implant.

24. A method as defined in claim 19, wherein the carotenoids are selected from the group consisting of lutein and zeaxanthin.

REPLY TO DES MOINES OFFICE

January 29, 2013

Mail Stop PCT
Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Re: Amendment under Article 34
PCT/US12/031098
Applicant: Kemin Industries, Inc.

Dear Sir or Madam:

This Article 34 Amendment is being submitted in response to the Written Opinion dated September 4, 2012.

Claims 1-17 were replaced with claims 1-24 in an Amendment filed under Article 19 on November 2, 2012.

Anticipation Rejections

Claims 1-7 are asserted to lack novelty under PCT Article 33(2) as being anticipated by Wu et al. This ground of rejection is traversed.

Claim 1 has been amended to specify that the carotenoid dye is applied directly to the biological tissues, membranes or other structure. Wu et al., indeed all of the references cited against the claims, are directed to the well known health benefits from the oral ingestion of carotenoids by the consumption of foods or supplements containing carotenoids; nothing about their effectiveness as dyes. Wu et al. also teaches only a protective effect of lutein on isolated, cultured retinal pigment epithelial (RPE) cells. Such cells cannot be considered to be biological tissues, membranes or structures.¹

¹ "Tissue" is defined in Taber's Cyclopedic Medical Dictionary, 20th Edition, as "A group or collection of similar cells and their intercellular substance that perform a particular function. Examples include epithelial, connective, muscular and nervous tissues."

#2288609

John D. Shors
Robert F. Holz, Jr.
Robert A. Gamble
Michael G. Kulik
Frank J. Carroll
Bruce I. Campbell
Jonathan C. Wilson
Steven L. Nelson
David B. VanSickel
Gene R. La Suer
Deborah M. Tharnish
Kent A. Herink
Robert J. Douglas, Jr.
Mark D. Walz
Gary M. Myers
Stanley J. Thompson
David M. Erickson
Lori Torgerson Chesser
Jo Ellen Whitney
Becky S. Knutson
Julie Johnson McLean
Beverly Evans
Margaret Van Houten
Thomas E. Stanberry
Christopher P. James
Sharon K. Malheiro
Kris Holub Tilley
William A. Bosawright
Thomas J. Houser
Kendall R. Watkins
Joseph A. Happe
Scott M. Brennan
William E. Hanigan
Debra Rectenbaugh Pettit
Matthew E. Laughlin
Judith R. Lynn Boes
William P. Kelly
Susan J. Freed
Jason M. Ross
Jason M. Stone
Amy M. Landwehr
John C. Picilla
Emily E. Harris
B. J. Miller
Jodie Clark McDougal
Jeffrey D. Ewoldt
Tara Z. Hall
Courtney Strutt Todd
Nichole Miras Mordini
Mark D. Wickham
Kelly A. Deters
Brian D. Torresi
Krystle L. Campa
Sarah K. Franklin
Christopher E. James
Robert W. Dixon
Michael C. Richards
Christopher S. Talcott
Elizabeth R. Meyer
Michele L. Warnock
Jessica S. Harder
Sarah E. Crane
Jana M. Lottenecker
Ann E. Naffier
Matthew Warner-Blankenship

Intellectual Property
Kent A. Herink
Emily E. Harris
Sean D. Solberg
Matthew Warner-Blankenship

Of Counsel
Jeffrey A. Baker
Donald J. Brown
Denise R. Claton
C. Carleton Frederici
Dennis D. Jerde
William J. Koehn
Stephen M. Morain
Joseph M. Pawlosky
Richard E. Ramsay
Stephen W. Roberts
Thomas E. Salsbery
Neal Smith
Sean D. Solberg

A. Arthur Davis
1928-1997
A. J. Greffeuus
1924-2011

Commissioner of Patents
January 29, 2013
Page 2

Further, there is absolutely no teaching in Wu et al. of any staining of the RPE cells by the application of lutein. Neither Wu et al. or any of the other cited references teach the direct application of carotenoids as staining dyes for biological tissues, membranes or other structures. Similarly, Widder teaches only the possible therapeutic effects of compounds including lutein, and nothing whatsoever about its effectiveness as a staining dye for biological tissues, membranes and other structures. Claim 1 and its dependent claims 2-12 are patentably distinct from Wu et al. and Widder et al.

Claim 13 also recites staining dyes for biological tissues, membranes or other structures based on carotenoids. Again, there is no teaching in Wu et al. or Widder et al. of the effectiveness of lutein or any other carotenoids as staining dyes for biological tissues, membranes or other structures. Claim 13 and its dependent claims 14-18 are patentably distinct from Wu et al. and all of the other references as well.

Reconsideration and withdrawal of the rejections of the claims is respectfully requested in view of these remarks.

Sincerely yours,

DAVIS, BROWN, KOEHN, SHORS & ROBERTS, P.C.

/kentaherink, 31025/

Kent A. Herink
Registration No. 31025

KAH/psl

REPLY TO DES MOINES OFFICE

January 29, 2013

Mail Stop PCT
Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Re: Amendment under Article 34
PCT/US12/031098
Applicant: Kemin Industries, Inc.

Dear Sir or Madam:

This Article 34 Amendment is being submitted in response to the
Written Opinion dated September 4, 2012.

Claims 1-17 were replaced with claims 1-24 in an Amendment filed
under Article 19 on November 2, 2012.

Anticipation Rejections

Claims 1-7 are asserted to lack novelty under PCT Article 33(2) as
being anticipated by Wu et al. This ground of rejection is traversed.

Claim 1 has been amended to specify that the carotenoid dye is applied
directly to the biological tissues, membranes or other structure. Wu et al.,
indeed all of the references cited against the claims, are directed to the well
known health benefits from the oral ingestion of carotenoids by the
consumption of foods or supplements containing carotenoids; nothing about
their effectiveness as dyes. Wu et al. also teaches only a protective effect of
lutein on isolated, cultured retinal pigment epithelial (RPE) cells. Such cells
cannot be considered to be biological tissues, membranes or structures.¹

¹ "Tissue" is defined in Taber's Cyclopedic Medical Dictionary, 20th Edition, as "A group or
collection of similar cells and their intercellular substance that perform a particular function.
Examples include epithelial, connective, muscular and nervous tissues."
#2288609

49

John D. Shors
Robert F. Holz, Jr.
Robert A. Gamble
Michael G. Kulik
Frank J. Carroll
Bruce I. Campbell
Jonathan C. Wilson
Steven L. Nelson
David B. VanSickel
Gene R. La Suer
Deborah M. Tharnish
Kent A. Herink
Robert J. Douglas, Jr.
Mark D. Walz
Gary M. Myers
Stanley J. Thompson
David M. Erickson
Lori Torgerson Chesser
Jo Ellen Whitney
Becky S. Knutson
Julie Johnson McLean
Beverly Evans
Margaret Van Houten
Thomas E. Stanberry
Christopher P. Jannes
Sharon K. Malheiro
Kris Holub Tilley
William A. Boatwright
Thomas J. Houser
Kendall R. Watkins
Joseph A. Happe
Scott M. Brennan
William E. Hanigan
Debra Recetenbaugh Pettit
Matthew E. Laughlin
Judith R. Lynn Boes
William P. Kelly
Susan J. Freed
Jason M. Ross
Jason M. Stone
Amy M. Landwehr
John C. Pietila
Emily E. Harris
B. J. Miller
Jodie Clark McDougal
Jeffrey D. Ewoldt
Tara Z. Hall
Courtney Strutt Todd
Nichole Miras Mordini
Mark D. Wickham
Kelly A. Deters
Brian D. Torresi
Krystle L. Campa
Sarah K. Franklin
Christopher E. James
Robert W. Dixon
Michael C. Richards
Christopher S. Talcott
Elizabeth R. Meyer
Michele L. Warnock
Jessica S. Harder
Sarah E. Crane
Jana M. Lutteneegger
Ann E. Naffier
Matthew Warner-Blankenship

Intellectual Property
Kent A. Herink
Emily E. Harris
Sean D. Solberg
Matthew Warner-Blankenship

Of Counsel
Jeffrey A. Baker
Donald J. Brown
Denise R. Claton
C. Carleton Frederici
Dennis D. Jerde
William J. Koehn
Stephen M. Morain
Joseph M. Pawlosky
Richard E. Ramsay
Stephen W. Roberts
Thomas E. Salsbery
Neal Smith
Sean D. Solberg

A. Arthur Davis
1928-1997
A. J. Greffenius
1924-2011

50

Commissioner of Patents
January 29, 2013
Page 2

Further, there is absolutely no teaching in Wu et al. of any staining of the RPE cells by the application of lutein. Neither Wu et al. or any of the other cited references teach the direct application of carotenoids as staining dyes for biological tissues, membranes or other structures. Similarly, Widder teaches only the possible therapeutic effects of compounds including lutein, and nothing whatsoever about its effectiveness as a staining dye for biological tissues, membranes and other structures. Claim 1 and its dependent claims 2-12 are patentably distinct from Wu et al. and Widder et al.

Claim 13 also recites staining dyes for biological tissues, membranes or other structures based on carotenoids. Again, there is no teaching in Wu et al. or Widder et al. of the effectiveness of lutein or any other carotenoids as staining dyes for biological tissues, membranes or other structures. Claim 13 and its dependent claims 14-18 are patentably distinct from Wu et al. and all of the other references as well.

Reconsideration and withdrawal of the rejections of the claims is respectfully requested in view of these remarks.

Sincerely yours,

DAVIS, BROWN, KOEHN, SHORS & ROBERTS, P.C.

/kentaHerink, 31025/

Kent A. Herink
Registration No. 31025

KAH/psl

We claim:

1. A method of staining biological tissues, membranes, or other structures, comprising selecting a dye consisting of carotenoids, alone or in combination with each other or other synthetic dyes, and applying the dye directly to the biological tissue, membrane, or other structure to be stained.
2. A method as defined in claim 1, further comprising the step of separating the stained biological tissue, membrane, or other structure from surrounding unstained tissues.
3. A method as defined in claim 1, wherein the carotenoids are selected from the group of lutein, zeaxanthin, lycopene, astaxanthin, beta-carotene, and beta-cryptoxanthin, alone or in combination with each other.
4. A method as defined in claim 1, wherein the synthetic dye is selected from the group consisting of brilliant blue, trypan blue, patent blue, indocyanine green, infracyanine green, bromophenol blue, fast green, indigo carmine, evans blue, light green, triamcinolone, crystal violet, fluorescein, fluometolone acetate and congo red, and combinations thereof.
5. A method as defined in claim 1, wherein the biological tissues, membranes, or other structures are intraocular.
6. A method as defined in claim 5, wherein the biological structure consists of the anterior lens capsule.
7. A method as defined in claim 6, wherein the anterior lens capsule is stained during capsulorhexis.
8. A method as defined in claim 5, wherein the biological membrane is selected from the group consisting of the internal limiting membrane, epiretinal membrane, and posterior hyaloid membrane.

9. A method as defined in claim 8, wherein the biological membrane is stained during vitreoretinal surgery.
10. A method as defined in claim 5, wherein the biological structure consists of the vitreous.
11. A method as defined in claim 10, wherein the vitreous is stained during vitreoretinal surgery.
12. A method as defined in claim 1, wherein the biological tissues, membranes, or other structures are gynecological, abdominal, neural, or orthopedic.
13. A composition for staining biological tissues, membranes, or other structures comprising a carotenoid dye selected from the group of lutein, zeaxanthin, lycopene, astaxanthin, beta-carotene, and beta-cryptoxanthin, alone or in combination with each other or other synthetic dyes in a pharmacologically acceptable vehicle.
14. A composition according to claim 13, wherein the synthetic dye is selected from the group consisting of brilliant blue, trypan blue, patent blue, indocyanine green, infracyanine green, bromophenol blue, fast green, indigo carmine, evans blue, light green, triamcinolone, crystal violet, fluorescein, fluometolone acetate and congo red, and combinations thereof.
15. A composition according to claim 13, wherein the carotenoid dye is lutein and/or zeaxanthin.
16. A composition according to claim 15, wherein the carotenoid dye is present in concentrations of 0.001% to 20%.
17. A composition according to claim 14, wherein the synthetic dye is present in concentrations of 0.0001% to 5%.

18. A composition according to claim 13, wherein the pharmaceutically acceptable vehicle is selected from the group consisting of phosphate buffer, balanced salt solution, polyvinyl alcohol, benzyl alcohol, purified water, sodium phosphate, sodium chloride, calcium chloride, magnesium chloride, potassium chloride, sodium citrate, sodium acetate, boric acid, sodium borate, methyl cellulose and its derivatives, hyaluronic acid, dextran, sodium polysorbate, polysorbates, chondroitin sulfate, sodium edetate, propylene glycol, polyethylene glycol, phenyl sodium, potassium phthalate, potassium phosphate, citric acid, carbomer 934, carbopol, metaphosphoric acid, glycocholic acid, acetic acid, and combinations thereof.

19. A method of directly applying carotenoids to the eye.

20. A method as defined in claim 19, wherein the direct application of carotenoids to the eye results in one or more effects selected from the group consisting of protection against macular degeneration, delaying the progression of macular degeneration, acting as a neuroprotectant, and protecting against or delay the progression of other eye diseases.

21. A method as defined in claim 19, wherein carotenoids are directly applied via intravitreal injection.

22. A method as defined in claim 19, wherein the carotenoids are directly applied utilizing a slow delivery system.

23. A method as defined in claim 22, wherein the slow delivery system comprises via ocular implant.

24. A method as defined in claim 19, wherein the carotenoids are selected from the group consisting of lutein and zeaxanthin.

REPLY TO DES MOINES OFFICE

January 29, 2013

Mail Stop PCT
Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Re: Amendment under Article 34
PCT/US12/031098
Applicant: Kemin Industries, Inc.

Dear Sir or Madam:

This Article 34 Amendment is being submitted in response to the
Written Opinion dated September 4, 2012.

Claims 1-17 were replaced with claims 1-24 in an Amendment filed
under Article 19 on November 2, 2012.

Anticipation Rejections

Claims 1-7 are asserted to lack novelty under PCT Article 33(2) as
being anticipated by Wu et al. This ground of rejection is traversed.

Claim 1 has been amended to specify that the carotenoid dye is applied
directly to the biological tissues, membranes or other structure. Wu et al.,
indeed all of the references cited against the claims, are directed to the well
known health benefits from the oral ingestion of carotenoids by the
consumption of foods or supplements containing carotenoids; nothing about
their effectiveness as dyes. Wu et al. also teaches only a protective effect of
lutein on isolated, cultured retinal pigment epithelial (RPE) cells. Such cells
cannot be considered to be biological tissues, membranes or structures.¹

¹ "Tissue" is defined in Taber's Cyclopedic Medical Dictionary, 20th Edition, as "A group or
collection of similar cells and their intercellular substance that perform a particular function.
Examples include epithelial, connective, muscular and nervous tissues."
#2288609

John D. Shors
Robert F. Holz, Jr.
Robert A. Gamble
Michael G. Kulik
Frank J. Carroll
Bruce I. Campbell
Jonathan C. Wilson
Steven L. Nelson
David B. VanSickle
Gene R. La Suer
Deborah M. Tharnish
Kent A. Herink
Robert J. Douglas, Jr.
Mark D. Walz
Gary M. Myers
Stanley J. Thompson
David M. Erickson
Lori Torgerson Chesser
Jo Ellen Whitney
Becky S. Knutson
Julie Johnson McLean
Beverly Evans
Margaret Van Houten
Thomas E. Stanberry
Christopher P. Jannes
Sharon K. Malheiro
Kris Holub Tilley
William A. Boatwright
Thomas J. Houser
Kendall R. Watkins
Joseph A. Happe
Scott M. Brennan
William E. Hanigan
Debra Rectenbaugh Pettit
Matthew E. Laughlin
Judith R. Lynn Boes
William P. Kelly
Susan J. Freed
Jason M. Ross
Jason M. Stone
Amy M. Landwehr
John C. Pietila
Emily E. Harris
B. J. Miller
Jodie Clark McDougal
Jeffrey D. Ewoldt
Tara Z. Hall
Courtney Strutt Todd
Nichole Miras Mordini
Mark D. Wickham
Kelly A. Deters
Brian D. Torresi
Krystle L. Campa
Sarah K. Franklin
Christopher E. James
Robert W. Dixon
Michael C. Richards
Christopher S. Talcott
Elizabeth R. Meyer
Michele L. Warnock
Jessica S. Harder
Sarah E. Crane
Jana M. Luttenegger
Ann E. Naffier
Matthew Warner-Blankenship

Intellectual Property
Kent A. Herink
Emily E. Harris
Sean D. Solberg
Matthew Warner-Blankenship

Of Counsel
Jeffrey A. Baker
Donald J. Brown
Denise R. Claton
C. Carleton Frederici
Dennis D. Jerde
William J. Koehn
Stephen M. Morain
Joseph M. Pawlosky
Richard E. Ramsay
Stephen W. Roberts
Thomas E. Salsbery
Neal Smith
Sean D. Solberg

A. Arthur Davis
1928-1997
A. J. Greffenius
1924-2011

Commissioner of Patents
January 29, 2013
Page 2

Further, there is absolutely no teaching in Wu et al. of any staining of the RPE cells by the application of lutein. Neither Wu et al. or any of the other cited references teach the direct application of carotenoids as staining dyes for biological tissues, membranes or other structures. Similarly, Widder teaches only the possible therapeutic effects of compounds including lutein, and nothing whatsoever about its effectiveness as a staining dye for biological tissues, membranes and other structures. Claim 1 and its dependent claims 2-12 are patentably distinct from Wu et al. and Widder et al.

Claim 13 also recites staining dyes for biological tissues, membranes or other structures based on carotenoids. Again, there is no teaching in Wu et al. or Widder et al. of the effectiveness of lutein or any other carotenoids as staining dyes for biological tissues, membranes or other structures. Claim 13 and its dependent claims 14-18 are patentably distinct from Wu et al. and all of the other references as well.

Reconsideration and withdrawal of the rejections of the claims is respectfully requested in view of these remarks.

Sincerely yours,

DAVIS, BROWN, KOEHN, SHORS & ROBERTS, P.C.

/kentaHerink, 31025/

Kent A. Herink
Registration No. 31025

KAH/psl

We claim:

1. A method of staining biological tissues, membranes, or other structures, comprising selecting a dye consisting of carotenoids, alone or in combination with each other or other synthetic dyes, and applying the dye directly to the biological tissue, membrane, or other structure to be stained.
2. A method as defined in claim 1, further comprising the step of separating the stained biological tissue, membrane, or other structure from surrounding unstained tissues.
3. A method as defined in claim 1, wherein the carotenoids are selected from the group of lutein, zeaxanthin, lycopene, astaxanthin, beta-carotene, and beta-cryptoxanthin, alone or in combination with each other.
4. A method as defined in claim 1, wherein the synthetic dye is selected from the group consisting of brilliant blue, trypan blue, patent blue, indocyanine green, infracyanine green, bromophenol blue, fast green, indigo carmine, evans blue, light green, triamcinolone, crystal violet, fluorescein, flurometolone acetate and congo red, and combinations thereof.
5. A method as defined in claim 1, wherein the biological tissues, membranes, or other structures are intraocular.
6. A method as defined in claim 5, wherein the biological structure consists of the anterior lens capsule.
7. A method as defined in claim 6, wherein the anterior lens capsule is stained during capsulorhexis.
8. A method as defined in claim 5, wherein the biological membrane is selected from the group consisting of the internal limiting membrane, epiretinal membrane, and posterior hyaloid membrane.

#2257186

AMENDED SHEET - IPEA/US

9. A method as defined in claim 8, wherein the biological membrane is stained during vitreoretinal surgery.
10. A method as defined in claim 5, wherein the biological structure consists of the vitreous.
11. A method as defined in claim 10, wherein the vitreous is stained during vitreoretinal surgery.
12. A method as defined in claim 1, wherein the biological tissues, membranes, or other structures are gynecological, abdominal, neural, or orthopedic.
13. A composition for staining biological tissues, membranes, or other structures comprising a carotenoid dye selected from the group of lutein, zeaxanthin, lycopene, astaxanthin, beta-carotene, and beta-cryptoxanthin, alone or in combination with each other or other synthetic dyes in a pharmacologically acceptable vehicle.
14. A composition according to claim 13, wherein the synthetic dye is selected from the group consisting of brilliant blue, trypan blue, patent blue, indocyanine green, infracyanine green, bromophenol blue, fast green, indigo carmine, evans blue, light green, triamcinolone, crystal violet, fluorescein, flurometolone acetate and congo red, and combinations thereof.
15. A composition according to claim 13, wherein the carotenoid dye is lutein and/or zeaxanthin.
16. A composition according to claim 15, wherein the carotenoid dye is present in concentrations of 0.001% to 20%.
17. A composition according to claim 14, wherein the synthetic dye is present in concentrations of 0.0001% to 5%.

18. A composition according to claim 13, wherein the pharmaceutically acceptable vehicle is selected from the group consisting of phosphate buffer, balanced salt solution, polyvinyl alcohol, benzyl alcohol, purified water, sodium phosphate, sodium chloride, calcium chloride, magnesium chloride, potassium chloride, sodium citrate, sodium acetate, boric acid, sodium borate, methyl cellulose and its derivatives, hyaluronic acid, dextran, sodium polysorbate, polysorbates, chondroitin sulfate, sodium edetate, propylene glycol, polyethylene glycol, phenyl sodium, potassium phthalate, potassium phosphate, citric acid, carbomer 934, carbopol, metaphosphoric acid, glycocholic acid, acetic acid, and combinations thereof.

19. A method of directly applying carotenoids to the eye.

20. A method as defined in claim 19, wherein the direct application of carotenoids to the eye results in one or more effects selected from the group consisting of protection against macular degeneration, delaying the progression of macular degeneration, acting as a neuroprotectant, and protecting against or delay the progression of other eye diseases.

21. A method as defined in claim 19, wherein carotenoids are directly applied via intravitreal injection.

22. A method as defined in claim 19, wherein the carotenoids are directly applied utilizing a slow delivery system.

23. A method as defined in claim 22, wherein the slow delivery system comprises via ocular implant.

24. A method as defined in claim 19, wherein the carotenoids are selected from the group consisting of lutein and zeaxanthin.

**REIVINDICACIONES MODIFICADAS
PARA REALIZAR EL EXAMEN DE
PATENTABILIDAD**

PCT/US12/31098 07-02-2013

Reivindicaciones

1. Un método de coloración de tejidos, membranas u otras estructuras, todos biológicos, el cual comprende seleccionar un tinte que consiste de carotenoides, solos o en combinación entre sí, u otros tintes sintéticos, y aplicar el tinte directamente a los tejidos, membranas u otras estructuras, todos biológicos, que se van a tinturar.
2. Un método, tal y como se define en la reivindicación 1, que comprende además la etapa de separar los tejidos, membranas u otras estructuras biológicos teñidos de los tejidos circundantes no teñidos.
3. Un método, tal y como se define en la reivindicación 1, en donde los carotenoides son seleccionados del grupo de luteína, zeaxantina, licopeno, astaxantina, beta-caroteno, y beta-criptoxantina, solos o en combinación entre sí.
4. Un método, tal y como se define en la reivindicación 1, en donde el tinte sintético es seleccionado del grupo que consiste en azul brillante, azul de tripano, azul patentado, indocianina verde, infracianina verde, azul bromofenol, verde rápido, carmín de índigo, azul de Evans, verde ligero, triamcinolona, violeta cristal, fluoresceína, acetato de fluormetolona y rojo de congo y combinaciones de los mismos.
5. Un método, tal y como se define en la reivindicación 1, en donde los tejidos, membranas u otras estructuras, todos biológicos, son intraoculares.
6. Un método, tal y como se define en la reivindicación 5, en donde la estructura biológica consiste en la cápsula anterior del cristalino.
7. Un método, tal y como se define en la reivindicación 6, en donde la cápsula anterior del cristalino se tiñe durante la capsulorrexia.
8. Un método, tal y como se define en la reivindicación 5, en donde la membrana biológica se selecciona del grupo que consiste de la membrana limitante interna, la membrana epirretiniana, y la membrana hialoidea posterior.

9. Un método, tal y como se define en la reivindicación 8, en donde la membrana biológica se tiñe durante la cirugía vítreorretiniana.
10. Un método, tal y como se define en la reivindicación 5, en donde la estructura biológica consiste en el cristalino.
11. Un método, tal y como se define en la reivindicación 10, en donde el cristalino se tiñe durante la cirugía vítreorretiniana.
12. Un método, tal y como se define en la reivindicación 1, en donde los tejidos, membranas u otras estructuras, todos biológicos, son ginecológicos, abdominales, neurales u ortopédicos.
13. Una composición para tinturar tejidos, membranas u otras estructuras biológicas, que comprende un colorante carotenoide seleccionado del grupo de luteína, zeaxantina, licopeno, astaxantina, beta-caroteno, y beta-criptoxantina, solos o en combinación entre sí, u otros tintes sintéticos en un vehículo farmacológicamente aceptable.
14. Una composición de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el tinte sintético es seleccionado del grupo que consiste en azul brillante, azul de tripano, azul patentado, indocianina verde, infracianina verde, azul bromofenol, verde rápido, carmín de índigo, azul de Evans, verde ligero, triamcinolona, violeta cristal, fluoresceína, acetato de fluormetolona y rojo de congo y combinaciones de los mismos.
15. Una composición de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el colorante carotenoide es luteína y/o zeaxantina.
16. Una composición de acuerdo con la reivindicación 15, en donde el colorante carotenoide está presente en concentraciones en un rango entre 0.001% y 20%.
17. Una composición de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el tinte sintético está presente en concentraciones en un rango entre 0.0001% y 5%.
18. Una composición de acuerdo con la reivindicación 13, donde el vehículo farmacéuticamente aceptable se selecciona del grupo consistente en amortiguador de fosfato, solución de sal balanceada, alcohol polivinílico, alcohol bencílico, agua purificada, fosfato de

sodio, cloruro de sodio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, cloruro de potasio, citrato de sodio, acetato de sodio, ácido bórico, borato de sodio, metilcelulosa y sus derivados, ácido hialurónico, dextrano, polisorbato de sodio, polisorbatos, sulfato de condroitina, edetato de sodio, propilenglicol, polietilenglicol, sodio fenilo, ftalato de potasio, fosfato de potasio, ácido cítrico, carbomer 934, Carbopol, ácido meta fosfórico, ácido glicocólico, ácido acético, y combinaciones de los mismos.

19. Un método para la aplicación directa de carotenoides en el ojo.
20. Un método tal y como se define en la reivindicación 19, en donde la aplicación directa de carotenoides en el ojo resulta en uno o más efectos seleccionados del grupo que consiste de protección contra la degeneración macular, retrasar la evolución de la degeneración macular, actuar como neuroprotector, y protección contra o retraso de la evolución de otras enfermedades oculares.
21. Un método tal y como se define en la reivindicación 19, en donde los carotenoides se aplican directamente mediante inyección intravítrea.
22. Un método tal y como se define en la reivindicación 19, en donde los carotenoides se aplican directamente mediante un sistema de liberación lenta.
23. Un método tal y como se define en la reivindicación 22, en donde el sistema de liberación lenta es a través de un implante ocular.
24. Un método tal y como se define en la reivindicación 19, en donde los carotenoides se seleccionan del grupo que consiste en luteína y/o zeaxantina.

August 27, 2007

IOWA

1390
7369

SECRETARY OF STATE

KEMIN INDUSTRIES
CINDEE
2100 MAURY ST
DES MOINES, IA 50306 USA

APOSTILLE
(Convention de La Hague du 5 octobre 1961)

- 1 Country: United States of America
- 2 This public document has been signed by: CYNTHIA J TATE
- 3 Acting in the capacity of: NOTARY PUBLIC
- 4 Bearing the seal/stamp: NOTARY PUBLIC IN AND FOR THE STATE OF IOWA

CERTIFIED

- 5 at: DES MOINES, IOWA, UNITED STATES OF AMERICA
- 6 date: AUGUST 24, 2007
- 7 by: the Secretary of State of the State of Iowa, United States of America
- 8 No. 07-071759
- 9 Seal
- 10 Signature



Michael A. Mauro
MICHAEL A. MAURO SECRETARY OF STATE



CAVELIER

ABOGADOS

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTÁ, 8 - COLOMBIA

181

Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation and Power-of-Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

KEMIN INDUSTRIES, INC.

domiciliado (s) en/of :2100 Maury Street Des Moines,

Iowa 50306, U.S.A.

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y DANIEL PEÑA, tpa. 65.620, domiciliados en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el párrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and DANIEL PEÑA, tpa. 65620, domiciled at Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which

apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso- administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

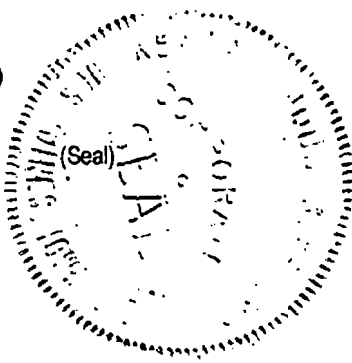
purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights: actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this 2007-08-24

en/in Des Moines, Iowa 50306-0070 United Status of America

por/by Elizabeth A. Nelson, Secretary Kemin Industries, Inc.

Firma/Signature Elizabeth A. Nelson Secretary



CERTIFICACIÓN NOTARIAL (INDIVIDUO)

A los _____ días del mes de _____
de 200 _____ ante mí, Notario Público o Funcionario Autorizado de _____

compareció(eron) personalmente _____
a quien(es) doy fe de conocer y me consta que es(son) la(s) persona(s)
firmante(s) del documento que precede, y quien(es) tiene(n) capacidad legal
para otorgarlo

--- NOTARIO PÚBLICO O FUNCIONARIO AUTORIZADO --- NOTARY PUBLIC OR ATTESTING OFFICIAL ---

CERTIFICACIÓN NOTARIAL (SOCIEDAD)

A los _____ 24th _____ días del mes de _____ Agosto
de 200 _____ compareció(eron) ante mí,

Elizabeth A. Nelson
Quien(es) conozco personalmente y que firma(n) este documento en
representación de la Sociedad/compañía denominada **Kemin Industries, Inc.**

Certifico:

1. Que he visto los siguientes documentos:*
Articles of Incorporation 1963
Amended 1968,
Restated Articles of Incorporation 1995
Amended 1998
Amended 2003
Restated Bylaws dated 2003
2. Que dichos documentos prueban lo siguiente:
2.1. Que es una Sociedad
legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes del Estado de
Iowa
- 2.2. Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es _____
2100 Maury Street P.O. Box 70 Des Moines, IA 50306 USA
- 2.3. Que el objeto u objetos para los cuales se otorga el presente poder están
comprendidos dentro del objeto social de la mencionada Sociedad/Compañía.
- 2.4. Que el(los) _____ Elizabeth A. Nelson
está(n) autorizado(s) para otorgar el presente Poder.
- Ciudad _____ Des Moines
- Estado _____ Iowa
- Hoy _____ 24th días del mes de Agosto _____ de 200 _____ 7

--- NOTARIO PÚBLICO O FUNCIONARIO AUTORIZADO --- NOTARY PUBLIC OR ATTESTING OFFICIAL ---

Cynthia J. Tate

* Los documentos deben identificarse con fecha y origen

NOTARIAL CERTIFICATION (INDIVIDUAL)

On this _____ day of _____
200 _____ before me, a Notary Public or Attesting Official of _____

personally appeared _____
to me known, and known to me to be the person(s) who executed that foregoing
document, and who has(have) legal capacity to execute it.

NOTARIAL CERTIFICATION (CORPORATION)

On this _____ 24th _____ day of _____ August
200 _____ appeared before me

Elizabeth A. Nelson
who(m) I know personally and who(m) signed this document as representative(s)
of the Corporation named **Kemin Industries, Inc.**

I certify:

1. That I have seen the following documents:*
Articles of Incorporation 1963, **IOWA, U.S. A.**
Amended 1968,
Restated Articles of Incorporation 1995
Amended 1998
Amended 2003
Restated Bylaws dated 2003
2. That the above documents duly prove the following:
2.1. That is a Corporation
legally constituted and in existence in accordance with the laws of the State of
Iowa
- 2.2. That the domicile of said Corporation/Company is _____
2100 Maury Street P.O. Box 70, Des Moines, IA 50306 USA
- 2.3. That the purpose or purposes for which the present Power of Attorney is
granted are comprised within the corporation purposes set forth in the charter of
the mentioned Corporation/Company.
- 2.4. That _____ Elizabeth A. Nelson
is(are) authorized to grant the present Power of Attorney
- City _____ Des Moines
- State _____ Iowa
- This _____ 24th _____ day of _____ August _____ 200 _____ 7

Cynthia J. Tate

* Documents must be identified with date and origin

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: . United States of Ameerica.
This public document
2. has been signed by Elizabeth A. Nelson
3. acting in the capacity of Secretary and
4. bears the seal/stamp of Kemin Industries, Inc.

Certified

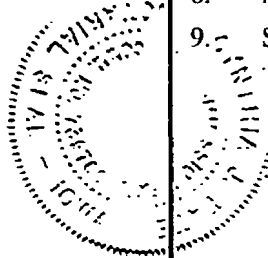
5. at Des Moines, Iowa United States of America
6. the 24th day of August, 2007
7. by Cyndee Tate

8. No. 739766

9. Seal/stamp

10. Signature

Cynthia J. Tate



STATE OF IOWA

ss

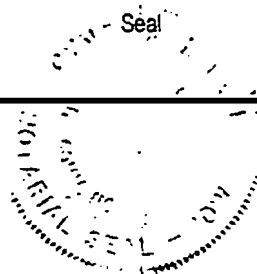
COUNTY OF POLK

This instrument was acknowledged before me on August 24, 2007 by Elizabeth A. Nelson
Secretary of Kemin Industries, Inc.

Cynthia J. Tate

Notary Public for the County and State above
My Commission Expires
on:

3/20/09



TRADUCCIÓN OFICIAL 232/2007 DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLÉS Y EN ESPAÑOL DE ACUERDO CON EL CUAL KEMIN INDUSTRIES, INC. EMPRESA DOMICILIADA EN 2100 MAURY STREET DES MOINES, IOWA 50306, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA OTORGA PODER A EMILIO FERRERO, TPA 31929; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, TPA 23555 Y A DANIEL PEÑA, TPA 65620.

EXPEDIDO Y FIRMADO HOY 24 DE AGOSTO DE 2007 EN DES MOINES, IOWA ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA, POR ELIZABETH A. NELSON, SECRETARIO DE KEMIN INDUSTRIES INC.

FIRMADO: ELIZABETH A. NELSON, SECRETARIA

CERTIFICACIÓN NOTARIAL EN INGLÉS Y EN ESPAÑOL, DE FECHA 24 DE AGOSTO DE 2007 PARA CERTIFICAR LA COMPARECENCIA DE ELIZABETH A. NELSON, COMO REPRESENTANTE, EL DOMICILIO DE DICHA EMPRESA Y SU EXISTENCIA LEGAL DE ACUERDO CON LAS LEYES DE IOWA.

DES MOINES, IOWA, 24 DE AGOSTO DE 2007.

FIRMADO: CYNTHIA J TATE, NOTARIO

APOSTILLA

(CONVENCIÓN DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961)

1. PAIS: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

Este documento público

2. ha sido firmado por ELIZABETH A. NELSON

3. quien actúa en su calidad de SECRETARIA

4. y lleva el sello/estampilla de KEMIN INDUSTRIES INC.

CERTIFICADO

5. en Des Moines, Iowa, Estados Unidos de América

6. el 24 de agosto de 2007

7. por Cyndee Tate

8. 739766

9. Sello:

10. Firma: C. Tate

ESTADO DE IOWA, CONDADO DE POLK, DECLARACIÓN JURADA

Este documento fue reconocido ante mi el 24 de agosto de 2007 por Elizabeth A. Nelson, secretaria de Kemin Industries In.

Firmado: Cynthia J Tate, notario público para el condado y estado arriba nombrados. Mi cargo vence el 20 de marzo de 2009.

IOWA

SECRETARÍA DE ESTADO
KEMIN INDUSTRIES
CINDEE

2100 MAURY ST. DES MOINES, IA 50306, USA

APOSTILLA

(CONVENCIÓN DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

Este documento público

2. ha sido firmado por CYNTHIA J TATE

3. quien actúa en su calidad de NOTARIO PÚBLICO

4. lleva el sello/estampilla de NOTARIO PÚBLICO PARA EL ESTADO DE IOWA

CERTIFICADO

5. en DES MOINES, IOWA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA 6. el

24 de agosto de 2007

7. por el Secretario de estado, estado de Iowa, Estados Unidos de América

8. 07-071759

9. Sello/estampilla: SECRETARIO DE ESTADO, ESTADO DE IOWA

10. Firma: MICHAEL A MAURO, SECRETARIO DE ESTADO

ECN\ID-108805\WPCL002G

COLO-1390-701-014-7

Bogotá, 25 de septiembre de 2007.

Edmundo Calado
Reg. 22.000.000.000.000

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

90-1197
Edmundo Calado
Cuya Firma Aparece en el
DOCUMENTO DESEMPLEA
LAS FUNCIONES INDICADAS

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

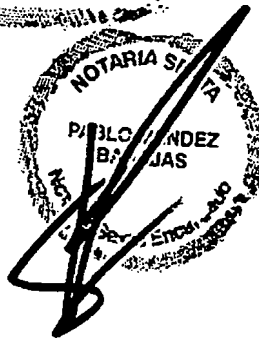
2007 SET 25 A 11:58

[Signature]
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE
BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) FIRMA(S) DE
Edmundo Calado Paez

COINCIDE(N) CON LA FIRMA REGISTRADA POR
EL (ELLOS) EN ESTA NOTARIA
SANTAFE DE BOGOTA, 25 SEP 2007

 CODEJURIS CIVIL



1109
2007/09/25

20

CAVELIER

ABOGADOS

WEB SITE: www.cavelier.com
E-MAIL: cavelier@cavelier.com

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTA 8, COLOMBIA

TELEFONO: (57) (1) 347-3611
TELEFAX: (57) (1) 217-9211 (57) (1) 310-4995

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E. S. D.

Poderdante : KEMIN INDUSTRIES, INC.

Poder conferido el : 24/08/2007

Yo, EMILIO FERRERO, obrando como apoderado principal del poderdante arriba mencionado, mediante el presente escrito sustituyo el poder a mi otorgado a la doctora LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, identificada con cédula de ciudadanía No. 35.456.344 y Tarjeta Profesional N°23.555, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil.



EMILIO FERRERO

T.P.A. N° 31.929

C.C. N° 438.019 de Usaquén

Acepto:



LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

T.P.A. N° 23.555

C.C. No. 35.456.344 de Usaquén

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA
RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL
 Bogotá, D.C. 3 - NOV. 2009
 Ante mí AMPARO QUINTERO ARTURO,
 NOTARIA SEXTA DEL CÍRCULO DE
 BOGOTÁ, D.C.
 Compareció(eron) *Emilio Jarama*
Willy San Juan Alemencia
Suarez de Guzman
 Quien(ase) exhibió(eron) la(s) C.C.
TP 31929 de 132017
TP 23585 de 33452344
 Y declaró(aron) que la(s) firma(s) que aparece(n)
 en el presente documento es(son) la(s) suya(s) y
 que el contenido del mismo es cierto.
 En constancia se firma esta diligencia.

Emilio Jarama
Suarez de Guzman



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 13 - 106848

Bogotá D.C., Octubre 22 de 2013 - 16:44:17

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	189814192	22/10/2013	17.230.000.00

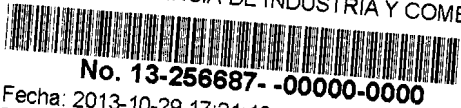
*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00	500.000.00
				\$500.000.00

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____
*****_
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-256687-00000-0000
Fecha: 2013-10-29 17:21:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 73

COLO: 01390-841-001-5

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 107861
		Bogotá D.C., Octubre 24 de 2013 - 16:49:10

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS	NI 860.041.367
---------------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	107851	24/10/2013		2.472.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO Vr. CONCEPTO
14	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00 420.000.00
			\$420.000.00

SON: **CUATROCIENTOS VEINTE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-256687- -00000-0000
Fecha: 2013-10-29 17:21:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 73

0020'0139.0-841-001-J.

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD FASE NACIONAL PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: A61K 049/000	
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) KEMIN INDUSTRIES, INC.	
(30) Prioridad	(31) Prioridad 61/468,838 13/433,526	(32) Fecha 2011/03/29 2012/03/29	(33) País US US
		(72) Inventor(es) DIOGO DE SOUSA MARTINS Y OTROS	
		(74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
(85)	Fecha limite inicio fase nacional: 2013/10/29		(87) Publicación internacional
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 2012/10/04
	Fecha de presentación de la solicitud: 2012/03/29		N° publicación: WO 2012/135432 A2
	No. de solicitud PCT/US2012/031098		
(54) Titulo: TINTES PARA MEMBRANAS Y ESTRUCTURAS BIOLÓGICAS			

Resumen:

La presente invención se refiere al uso de uno o varios tintes naturales, solos o en combinación con otros tintes, para la preparación de una composición para tinturar membranas y estructuras biológicas, a fin de facilitar su identificación durante procedimientos quirúrgicos. La presente invención se refiere al uso de uno o varios tintes naturales, solos o en combinación con otros tintes, para tinturar membranas y estructuras biológicas a fin de facilitar su identificación durante procedimientos quirúrgicos.



No. 13-256687- -00000-0000

Fecha: 2013-10-29 17:21:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 73

PATENTE DE INVENCION ☐ MODELO DE U

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐