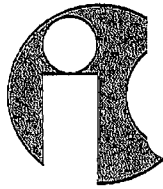




No. 14-138326- -00000-0000

Fecha: 2014-06-26 16:44:47 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 22



Industria y Comercio
S U P E R I N T E N D E N C I A

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO MÉTODO DE OBTENCIÓN DE EXTRACTO DIALIZABLE DE LEUCOCITOS

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

DOMICILIO MÉXICO, D.F, MÉXICO

74. APODERADO LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C 35.456.344 de Usaqué

22. BOGOTÁ, D.C., _____

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO No. 14-138326- -00000-0000 Fecha: 2014-06-26 16:44:47 Dep. 2020 DIR.NUEVASOR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 22
--	---

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL –PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad ☒ Capítulo I ☐ Capítulo II								
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)									
Solicitud Internacional No.		PCT/MX2012/000129								
Publicación Internacional No.		WO 2013/089550 A1								
Fecha		2012/12/17								
Fecha		2013/06/20								
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN									
MÉTODO DE OBTENCIÓN DE EXTRACTO DIALIZABLE DE LEUCOCITOS										
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)									
C07K 001/016, C07K 001/036, C07K 014/052										
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria									
<table><tr><td>APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL</td><td>NOMBRE</td><td>IDENTIFICACIÓN</td><td>TIPO</td></tr><tr><td>INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL</td><td></td><td></td><td></td></tr></table>			APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO	INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL			
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO							
INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL										
6	DATOS DEL SOLICITANTE									
DIRECCIÓN		Unidad Profesional “Adolfo López Mateos” Zacatenco, Del. Gustavo A. Madero, C.P. 07738, México, D.F., México								
CIUDAD		México, D.F.								
DEPARTAMENTO/ESTADO										
PAÍS DE RESIDENCIA		México								
No. TELÉFONO		3 47 36 11								
CORREO ELECTRÓNICO		clientes@cavelier.com								
NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN		México								
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria									
APELLIDOS		NOMBRES								
1 ESTRADA PARRA		Sergio								
2 ESTRADA GARCÍA		Iris Citlati Elvira								
3 PÉREZ TAPIA		Sonia Mayra								
		NACIONALIDAD								
		Mexicano								
		Mexicana								
		Mexicana								
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:										
8	DATOS INVENTOR (ES)									
PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD								
1 México		México, D.F.								
2 México		México, D.F.								
3 México		México, D.F.								
DIRECCIÓN										
1 Prolongación de Carpio Esquina Plan de Ayala S/N, Col. Santo Tomás, C.P.11340, México, D.F., México										
2 Prolongación de Carpio Esquina Plan de Ayala S/N, Col. Santo Tomás, C.P.11340, México, D.F., México										
3 Prolongación de Carpio Esquina Plan de Ayala S/N, Col. Santo Tomás, C.P.11340, México, D.F., México										
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		NOMBRES								
De Páez		Luz Clemencia								
		IDENTIFICACIÓN								
		C.C . 35.456.344 T.P . 23.555								
DIRECCIÓN		No. TELÉFONO								
Carrera 4ª No. 72-35		3 47 36 11								
CIUDAD		CORREO ELECTRÓNICO								
BOGOTA		cavelier@cavelier.com								
PAÍS		No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL								
COLOMBIA										

10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO			
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
MEXICO		MX	MX/a/2011/01385	2011/12/16
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. 14-0064187	Fecha: 2014/06/17
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			Firma	
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ				
C.C 35.456.344 de Usaquén			Tarjeta Profesional 23.555	

17	ANEXOS
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano 1. ☒ Descripción N° de folios: 10 2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 2 3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 3 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.	Documentación Jurídica 9. ☐ Poderes, si fuera el caso. 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 \$515.000. 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 reivindicación adicional a 10.

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional

WO 2013/089550 A1

(43) Fecha de publicación internacional
20 de junio de 2013 (20.06.2013)

WIPO | PCT

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C07K 14/52 (2006.01) C07K 1/36 (2006.01)
C07K 1/16 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/MX2012/000129

(22) Fecha de presentación internacional:
17 de diciembre de 2012 (17.12.2012)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
MX/a/2011/013852
16 de diciembre de 2011 (16.12.2011) MX

(71) Solicitante: INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
[MX/MX]; Unidad Profesional "Adolfo López Mateos"
Zacatenco, Del. Gustavo A. Madero, C.P. 07738 Mexico,
D.F. (MX).

(72) Inventores: ESTRADA PARRA, Sergio; Prolongación de
Carpio Esquina Plan de Ayala S/N, Col. Santo Tomás, C.P.
11340 México D.F. (MX). ESTRADA GARCÍA, Iris
Citlati Elvira; Prolongación de Carpio Esquina Plan de
Ayala S/N, Col. Santo Tomás, C.P. 11340 México D.F.
(MX). PÉREZ TAPIA, Sonia Mayra; Prolongación de
Carpio Esquina Plan de Ayala S/N, Col. Santo Tomás, C.P.
11340 México D.F. (MX).

(74) Mandatario: BLANCO SALAZAR, Claudia Alejandra;
Av. Luis Enrique Erro S/N, Unidad Profesional, "Adolfo

López Mateos", Col. Zacatenco, Delegación Gustavo A.
Madero, México, D. F. 07738 (MX).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección nacional admisible): AE,
AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN,
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, PA, 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.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección regional admisible):
ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ,
BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (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).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING A DIALYZABLE LEUKOCYTE EXTRACT

(54) Título : MÉTODO DE OBTENCIÓN DE EXTRACTO DIALIZABLE DE LEUCOCITOS

(57) Abstract: The present invention relates to a method for producing a transfer factor. The method comprises the following steps: freezing and thawing of peripheral-blood leukocytes, dialysis, tangential ultrafiltration, identification and quantification using high-resolution, molecular-exclusion liquid chromatography, and *in-vitro* biological validation. The resulting product is suitable for medical use.

(57) Resumen: La presente invención es relativa a un proceso para la producción de factor de transferencia. Este proceso consiste de las etapas de congelación y descongelación de leucocitos de sangre periférica, diálisis, ultrafiltración tangencial, identificación y cuantificación por cromatografía líquida de ultra resolución por exclusión molecular, y validación biológica *in vitro*. El producto de este proceso es útil para su aplicación médica.



WO 2013/089550 A1

MÉTODO DE OBTENCIÓN DE EXTRACTO DIALIZABLE DE LEUCOCITOS

Campo de la invención

La presente invención se relaciona al campo técnico de procesos de producción de preparaciones medicinales que contienen péptidos; más particularmente, pertenece al campo técnico de procesos de producción de preparaciones medicinales que contienen extracto dializable leucocitario.

Estado de la técnica

Los factores de transferencia, los cuales son producidos por leucocitos y linfocitos, son pequeñas polipéptidos solubles en agua de aproximadamente 44 aminoácidos que estimulan o transfieren la inmunidad mediada por células de un individuo a otro y a través de especies, pero no crea una respuesta alérgica. Ya que los factores de transferencia son más pequeños que los anticuerpos, ellos no transfieren respuestas medidas por anticuerpos, no son inmunogénicos por lo cual no inducen producción de anticuerpos. Las propiedades y características de los factores de transferencias han sido discutidas en las patentes US4816563, US5080895, US5840700, US5883224, y US6468534.

Los factores de transferencia han sido descritos como efectivos terapéuticos para tratar la infección de virus Herpes simplex, para el tratamiento del acné, y para el tratamiento de la infección por *Candida albicans*. También han sido utilizados para tratar la criptosporidiosis en receptores tratados con factor de transferencia específico. Por otro lado, también se ha utilizado para el tratamiento de varicela como un pretratamiento de niños con factor de transferencia de individuos que habían tenido varicela.

Durante muchos años se han utilizado diversas metodologías para la obtención del factor de transferencia. Por ejemplo, la solicitud de patente WO2007143957 describe un proceso para obtener el factor a partir de leucocitos; este proceso incluye las siguientes etapas: ajuste del homogenizado de leucocitos, diálisis y/o ultrafiltración, concentración mediante liofilización, ajuste de la solución médica en crudo, pruebas inter-operativas, homogenización, prefiltración, ultrafiltración, esterilización por filtración, inactivación térmica, empaque del producto, y liofilización. Sin embargo, en

dicho proceso se obtiene un factor muy crudo ya que contiene una gran cantidad de componentes que pueden enmascarar la acción del factor.

A su vez, la patente NLa2004000058 describe un método en donde un extracto leucocitario es sometido a esterilización por filtración, y cromatografía mediante sephadex G-15. Este proceso utiliza como control de calidad la prueba de quimiotaxis en sangre periférica o linfocitos de timo y bazo de rata. Sin embargo, dicho método al someterse sólo a una separación por sephadex no garantiza que la pureza del factor ya que contiene una multitud de componentes que puedan interferir con la acción metabólica del factor.

Por otro lado, la solicitud de patente US20030031686A1 describe un método para la obtención de factor de transferencia a partir de huevos de pollo. Este método consiste en inmunizar a las aves con determinado antígeno y a partir de los huevos obtener una fracción soluble en agua de la clara; esta fracción fue sometida a tres procesos de filtración consecutivos: a) por papel filtro, b) mediante vacío utilizando filtro de fibra de vidrio, y c) filtración mediante una membrana hidrofílica DURAPORE para remover lípidos y lipoproteínas. La fracción conteniendo las proteínas se colecta, congela, y liofiliza. Si bien, este proceso es sumamente sencillo cuenta con la desventaja de no tener una separación de polipéptidos de bajo peso molecular, y por lo tanto el producto obtenido contiene proteínas que interfieren con la acción del factor de transferencia.

Otro proceso para obtener factor de transferencia es aquél descrito en la solicitud de patente US20020044942. Dicho proceso consiste en obtener el factor a partir de huevos de gallina inmunizada, y contiene diversas etapas, entre ellas filtración, centrifugación, ultrafiltración, diálisis, cromatografía líquida de alta resolución, y liofilización. Sin embargo, este proceso cuenta con la desventaja de la difícil maniobra de los huevos debido a la separación manual de la yema y la clara, lo que trae como consecuencia una contaminación de la fracción proteica con la fracción lipídica.

De igual manera, la patente US5840700 describe un método para obtener factor de transferencia substancialmente puro que tiene una actividad específica de al menos 5000 unidades por AU214. El proceso consiste básicamente en contactar una muestra que contiene factor de transferencia a un antígeno inmovilizado al cual el factor se une específicamente bajo condiciones que favorezcan la formación del

complejo antígeno-factor de transferencia. Este complejo es separado posteriormente mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa, y cromatografía líquida de alta resolución por filtración en gel. A pesar del alto grado de pureza debido al paso de inmovilización antígeno-específica, este proceso cuenta con la gran desventaja de requerir una gran cantidad de antígeno, lo que resulta en un proceso bastante caro.

Finalmente, la solicitud de patente EP0143445A2 describe un método de obtención de factor de transferencia a partir del calostro de vacas lactantes. Dicho método consiste básicamente de las siguientes etapas: centrifugado para obtención de un precipitado celular, eliminación de la caseína, ultrafiltración y diálisis, cromatografía y liofilización. Este proceso cuenta con la gran desventaja de la poca disposición del calostro de las vacas o cualquier mamífero en etapa de lactación.

Especificación de la invención

De acuerdo a lo analizado en el estado de la técnica, se puede observar que existe un problema técnico en cuanto a la metodología de obtención del factor de transferencia. Dicho problema consiste en no tener un factor de transferencia con un alto grado de pureza. Este problema puede derivarse a partir de la fuente del factor, por ejemplo a partir de clara de huevo de gallinas inmunizadas, o por carecer de etapas específicas más finas de purificación.

En este sentido, la presente invención mejora razonablemente la problemática técnica. En primera instancia, al obtener el factor de transferencia a partir de sangre periférica permite evitar el difícil manejo de los huevos de gallinas inmunizadas establecidas en la solicitudes de patente US20020044942 y US20030031686A1. De la misma forma, se tiene una fuente mayor del factor a diferencia del calostro de vacas establecido en la solicitud de patente EP0143445A2. Por otro lado, presenta la ventaja de obtención de un factor con mayor grado de pureza al utilizarse una etapa de purificación basada una cromatografía líquida de ultraresolución por exclusión molecular; esta etapa primordial supera las desventajas presentes en aquellos procesos descritos en las solicitudes de patentes WO2007143957 y NLa2004000058. Finalmente, este proceso resulta ser de bajo costo debido a que no se utiliza antígeno para la purificación del factor, a diferencia de lo descrito en la patente US5840700.

Adicionalmente, la presente invención cuenta con una etapa de validación biológica del factor, lo que permite descartar aquellos lotes de factor de transferencia que no cumplan con dicha prueba.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 es una curva de calibración del factor de transferencia mediante cromatografía líquida de ultra-resolución por exclusión molecular. Las diversas líneas son diversos lotes sobre los cuales se llevo a cabo la prueba.

La figura 2 es una curva estándar de peso molecular.

La figura 3 es una curva de calibración del factor de transferencia.

La figura 4 es una curva de calibración del factor de transferencia.

La figura 5 es una gráfica correspondiente al efecto del factor de transferencia sobre la proliferación de la línea celular MG-63.

La figura 6 es una gráfica correspondiente al efecto del factor de transferencia sobre la proliferación de la línea celular A20.

Mejor método para llevar a cabo la invención

Ahora, la invención se describirá en base a ejemplos concretos. Estos ejemplos, son únicamente para uso ilustrativo y de forma alguna debe entenderse como limitativos del alcance de la invención.

Ejemplo 1. Etapa de congelación/descongelación

El factor de transferencia se obtiene a partir de unidades de concentrados leucocitarios. Las unidades se proceden a congelar y posteriormente sufren cinco etapas de congelación/descongelación. En este sentido, los paquetes de concentrados leucocitarios se agrupan para formar lotes de 20 concentrados leucocitarios en bolsas de plástico. Se inician los ciclos de congelación almacenando los lotes a -20 °C durante una semana. Una vez cumplida la semana se realiza la descongelación de los paquetes de concentrado leucocitario colocando estos en una tarja bajo chorro de

agua. Al estar completamente descongelados se vuelven a colocar a -20°C y se almacenan durante una semana. Así sucesivamente, hasta cumplir con los cinco ciclos de congelación/descongelación.

Ejemplo 2. Etapa de diálisis

El proceso de diálisis inicia cortando una membrana para 12 KDa a un largo de 1 metro con 40 cm. Esta membrana se coloca dentro de un vaso de precipitado de 4 litros que contenga 2.5 litros de agua Elix y hervir durante 10 minutos. Después, se saca la membrana de diálisis y se coloca en otro vaso de precipitado de 4 litros que contenga 2.5 litros de agua Elix y se pone a hervir durante 10 minutos. Posteriormente se saca la membrana de diálisis y se coloca en otro vaso de precipitado de 4 litros que contenga 2.5 litros de agua Elix y esterilizar durante 15 minutos a 121°C . La membrana de diálisis se mantiene dentro del agua estéril hasta su uso.

Una vez preparada la membrana de diálisis, se procede llenar dicha membrana con el extracto leucocitario sometido a los procesos de congelación/descongelación. Este proceso inicia limpiando las bolsas que contiene el concentrado leucocitario con alcohol al 70%; posteriormente, se corta uno de los extremos de la bolsa utilizando tijeras quirúrgicas estériles. Se vacía y se mide el contenido del concentrado leucocitario por decantación dentro de una probeta. Después se vacía el contenido de la probeta hacia un frasco de vidrio de 1 litro. Se repiten los pasos con las diversas bolsas hasta tener un volumen de 1.100 litros de concentrado leucocitario dentro del frasco. Posteriormente, se miden 800 mililitros de agua pisa en una probeta, y este volumen se pasa hacia un frasco estéril de 2 litros. Utilizando guantes estériles se saca un extremo de la membrana de diálisis y realizar un nudo a 10 cm del extremo, se realiza un segundo nudo a 7 cm del extremo y se ata entre los dos nudos hilo quirúrgico. Después, se saca el otro extremo de la membrana de diálisis y se introduce un dedo dentro de la membrana, con el se empuja la membrana de diálisis hasta formar un acordeón. El dedo se retira y en su lugar se coloca el cuello de un embudo, cuidando de no romper la membrana. Se saca la membrana y se coloca el extremo que tiene los nudos dentro de un frasco de 2 litros estéril, cuidando de dejar el hilo quirúrgico fuera del frasco. Luego, se sujeta el extremo del hilo quirúrgico que se encuentra fuera del frasco con pinzas quirúrgicas y se vacía por decantación el concentrado leucocitario de frasco hacia el embudo hasta verter todo dentro de la membrana de diálisis, cuidando de meter la membrana poco a poco dentro del frasco de 2 litros. Posteriormente, se retira el embudo del extremo de la membrana de diálisis

y realizar doble nudo dejando 3 cm de distancia. Se coloca una pinza estéril (clip) entre los dos nudos y se coloca una tapa de aluminio estéril y dejar dializando durante 20 horas. Una vez cumplidas las 20 horas de diálisis se toman muestras para su análisis correspondiente. Después de esto se vierte el producto de la diálisis en un vaso de 4 litros estéril por decantación, procurando que el líquido decantado toque lo menos posible los extremos de la membrana de diálisis. Se filtra por 0.22 μm , se colecta en un frasco de 2 litros estéril, se mide el volumen obtenido como producto de diálisis, y se almacena a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta iniciar la ultrafiltración tangencial.

Ejemplo 3. Etapa de ultrafiltración tangencial

Para realizar la ultrafiltración del producto de acuerdo a lo siguiente: se muestrea el cartucho de 10 KDa y determinará la cantidad de endotoxina presente. Se verifican las presiones del sistema (10 psi en el puerto de alimentación y 5 psi en el de retenido). Posteriormente, se conecta una manguera al puerto de alimentación instalarla en el cabezal de la bomba peristáltica e introducir el otro extremo en el garrafón que contiene el producto dializado a 12 KDa. Conectar una segunda manguera al puerto de permeado de la unidad de filtración e introducirla en un garrafón limpio de 20 L rotulado como PERMEADO 1. Conectar una tercera manguera al puerto de retenido e introducirla en un tercer garrafón de 20 L rotulado como RETENIDO 1 (nota: Preparar un garrafón mas rotulado como RETENIDO 1,1 debido a que se obtendrán dos garrafones de producto retenido). Encender la bomba peristáltica y programarla a 1 L/min. Ultrafiltrar todo el producto. Medir con probeta de 2 L la cantidad total de cada producto obtenido. Recircular el producto RETENIDO 1 y RETENIDO 1,1 a volumen de cero de la siguiente manera: introducir la manguera de alimentación en uno de los garrafones que contiene el producto retenido (RETENIDO 1 o RETENIDO 1,1), introducir la manguera de retenido en el mismo garrafón que la manguera de alimentación (RETENIDO 1 o RETENIDO 1,1), introducir la manguera de permeado en otro garrafón identificándolo como PERMEADO 2 (nota: como se obtendrán 2 garrafones de producto permeado se preparará otro garrafón identificándolo como PERMEADO 2,1. Encender la bomba peristáltica y programarla a 1 L/min. Ultrafiltrar el producto retenido hasta un volumen de cero. Medir con probeta de 2L el volumen total de los productos obtenidos. Se homogeniza el producto de los tres garrafones con producto permeado (PERMEADO 1, PERMEADO 2 y PERMEADO 2,1) de la siguiente manera: introducir una manguera al garrafón que contiene el producto PERMEADO 2,1 instalar la manguera en el cabezal de una bomba peristáltica e introducir el otro extremo en el garrafón que contiene el producto

PERMEADO 1, programar la bomba a 1 L/min y trasladar la mitad de la cantidad contenida en el garrafón de PERMEADO 2,1 al de PERMEADO 1. Repetir los pasos a y b para trasladar la otra mitad de la cantidad de producto PERMEADO 2,1 al garrafón que contiene el PERMEADO 2, quedando dos garrafones con producto permeado se introducen dos mangueras en el garrafón de PERMEADO 1 se instalan en los cabezales de dos bombas peristálticas (una bomba para cada manguera) e introducir los otros extremos en el garrafón de PERMEADO 2. Programar las bombas peristálticas en sentidos contrarios (una con giro a la izquierda y la otra con giro a la derecha) y a una velocidad de 13 L/min. Iniciar el funcionamiento de ambas bombas y mantenerlo por 20 min. Identificar ambos garrafones como PERMEADO TOTAL. Medir con probeta de 2L el total del volumen obtenido y cuantificar proteínas. Efectuar de acuerdo a las indicaciones anteriores una ultrafiltración utilizando un cartucho de 1 KDa.

Ejemplo 4. Etapa de identificación y cuantificación por cromatografía líquida de ultra-resolución por exclusión molecular

Esta etapa se realizó en condiciones para el análisis cualitativo y cuantitativo por SEC-UPLC en el sistema Acquity UPLC System Clase H utilizando la columna de exclusión molecular Acquity BEH200 1.7 μm de 4.6 x 150mm. La separación de los péptidos se realizó con una solución amortiguadora de fosfatos 50mM con 150 mM de Cloruro de sodio a pH 7.0 y a un flujo isocrático de 0.2 mL/min, con un tiempo de elución total de 15 min. Las condiciones cromatográficas mencionadas anteriormente fueron utilizadas para la obtención de una curva de calibración para determinaciones cuantitativas. Se obtuvieron los perfiles cromatográficos del factor de transferencia Lote 11B01, donde se pueden observar 11 picos característicos, estos resultados se muestran en la figura 1. Estos 11 picos eluyen en un intervalo de tiempo de retención entre 8.5 y 13.5 min. Los estándares de peso molecular se muestran en la figura 2. Una vez obtenidos los picos característicos del factor de transferencia se realizó una curva de calibración utilizando un lote de factor de transferencia como estándar interno, inyectando diferentes volúmenes: 0.3, 1, 2, 3, 4 y 5 μL . Se procesaron los datos utilizando las aplicaciones del software Empower para la construcción de la curva de calibración, los resultados se presentan en las figuras 3 y 4.

Este método cromatográfico nos permite hacer un análisis cualitativo para detectar los 11 picos característicos de factor de transferencia en un intervalo de tiempo de retención de 8.5 a 13.5 min. Para conocer el intervalo aproximado de peso

molecular de la población de péptidos de factor de transferencia se utilizaron los marcadores de peso molecular de Biorad (1.35 - 670 kDa) y Triptófano (62 Daltons), por lo que podemos inferir que los péptidos del factor de transferencia tienen un peso molecular menor a 17 kDa correspondiente a la mioglobina del estándar de Biorad. Sin embargo, debido a que no se cuenta con la aplicación GPC del software Empower, no es posible determinar con precisión los pesos moleculares de cada uno de los picos, por lo tanto, estos se reportan como menores a 17 kDa y con un tiempo de retención de intervalo de 8.5 a 13.5 min. Por otro lado tampoco se cuenta con un marcador de peso molecular de bajo rango, razón por la cual se utilizó el triptófano solamente como referencia de un peso molecular de 62 Daltons aproximadamente. En lo que respecta al método cuantitativo, la curva de calibración se obtuvo con un coeficiente de correlación r^2 de 0.99, lo que nos indica que el método es lineal y que cumple con el criterio de aceptación establecido de ≥ 0.98 . Por lo anterior, el método puede ser utilizado también para determinaciones cuantitativas.

Ejemplo 5. Etapa de validación biológica in vitro

La línea celular MG-63 (ATCC CRL-1427) son células de osteosarcoma humano. Las células MG-63 se siembran en placas de cultivo CORNING de 12 pocillos a una densidad de 1×10^4 células por pozo en 500 μ l medio de cultivo EMEM (GIBCO No cat. 30-2003) suplementado con SFB al 10% (GIBCO No. Cat 16000-044), las células estimuladas, se tratan con factor de transferencia una concentración de 100 μ g/ml, se coloca un testigo de proliferación, en el cual se coloca células sin estímulo. Las células son incubadas durante 24, 48 y 72 horas. El experimento se realiza por triplicado en cada condición.

Determinación de proliferación por exclusión de azul tripano. Después de cada tiempo de incubación se determina el número de células y la viabilidad celular mediante la prueba de exclusión del colorante azul tripano 0.4 % (SIGMA No. Cat T8124). Las células son despegadas por tripsinización (TripLE GIBCO No. Cat 12563) y son centrifugadas a 125 X g durante 5 min, posteriormente se realiza la cuenta en una cámara de Neubauer (figura 6).

El efecto del factor de transferencia sobre la línea celular se determinó utilizando la prueba del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT, por sus siglas en inglés. Brevemente, 1×10^4 células/pozo fueron tratadas con 100 μ g/ml. Después de 24, 48 y 72 horas de incubación las células se lavaron dos veces

con solución salina de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés) y MTT (0.5 mg/mL PBS) fue añadido a cada pozo e incubado a 37 °C durante 30 minutos. Los cristales de formazan que se formaron fueron disueltos al añadir dimetil sulfoxido (100 µL/pozo), y la absorbancia se leyó a 570 nm utilizando un lector de microplaca (Model 3550; BIO-RAD, Richmond, USA). La reducción en la viabilidad celular después del tratamiento con factor de transferencia se expreso en términos de células control (células sin tratamiento). Los porcentajes de la sobrevivencia celular fueron calculados como sigue: % sobrevivencia celular= (absorbancia de células tratadas/absorbancia de células con solvente vehículo) X 100. La concentración media inhibitoria (IC₅₀) se calcula de la curva de dosis-respuesta obtenida al graficar el porcentaje de la sobrevivencia celular *versus* la concentración de factor de transferencia.

También se realizaron las mismas pruebas sobre Las células A20 son linfocitos B murinos provenientes de una neoplasia de ratones de la cepa BALB/cAnN. Las células A20 se siembran en placas de cultivo CORNING de 96 pocillos a una densidad de 4×10^3 células por pozo en 200 µl medio de cultivo RPMI (GIBCO) suplementado con SFB al 10%(GIBCO), 0.05mM 2 mercaptoetanol (SIGMA), las células estimuladas, se tratan con factor de transferencia a una concentración de 100 µg/ml, se coloca un testigo de proliferación, en el cual se coloca células sin estímulo. Las células son incubadas durante 24, 48 y 72 horas. El experimento se realiza por triplicado en cada condición.

Determinación de proliferación por exclusión de azul tripano. Después de cada tiempo de incubación se determina el número de células y la viabilidad celular mediante la prueba de exclusión del colorante azul tripano 0.4 % (SIGMA No. Cat T8124). Las células son centrifugadas a 125 X g durante 5 min, posteriormente se realiza la cuenta en una cámara de Neubauer (figura 5).

Las células A20 se siembran en placas de cultivo CORNING de 96 pocillos a una densidad de 4×10^3 células por pozo en 200 µl medio de cultivo EMEM (GIBCO No cat. 30-2003) suplementado con SFB al 10%(GIBCO No. Cat 16000-044), las células estimuladas, se tratan con factor de transferencia a una concentración de 100 µg/ml, se coloca un testigo de proliferación, en el cual se coloca células sin estímulo. Las células son incubadas durante 24, 48 y 72 horas. El experimento se realiza por triplicado en cada condición.

Para el ensayo de MTT, se añaden 20 μ l de solución de MTT (5 mg/ml en PBS) a cada pozo, 3 h antes de cada uno de los puntos de tiempo deseado, y las células se incuban a 37°C por 3h. Posteriormente al tiempo de incubación se retira el medio de cultivo y se añaden 100 μ l de DMSO en cada uno. La placa se gira suavemente en un agitador orbital durante 10 minutos para disolver por completo la precipitación. Se lee la absorbancia a 570 nm con un lector de microplacas Epoch (Biotek USA).

REIVINDICACIONES

1. Proceso de producción de factor de transferencia, caracterizado porque comprende las siguientes etapas: a) congelación y descongelación, b) diálisis, c) ultrafiltración tangencial, d) identificación y cuantificación por cromatografía líquida de ultra-resolución por exclusión molecular, e) validación biológica *in vitro*; en donde la etapa de congelación/descongelación comprende cinco ciclos de congelación a -20 °C durante una semana, y la respectiva descongelación a chorro de agua una vez terminada la congelación; en donde la etapa de diálisis comprende la utilización de membrana de diálisis para 12 KDa; en donde la etapa de ultrafiltración tangencial comprende la ultrafiltración seriada para 10 KDa y 1 KDa, respectivamente; en donde en la etapa de identificación y cuantificación por cromatografía líquida de ultra-resolución por exclusión molecular se obtiene el producto graficado en la figura 1; en donde la etapa de validación biológica *in vitro* se lleva a cabo utilizando la actividad anti-proliferativa del factor de transferencia mediante el ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.
2. El producto obtenido mediante el proceso de la reivindicación 1.

RESUMEN

La presente invención es relativa a un proceso para la producción de factor de transferencia. Este proceso consiste de las etapas de congelación y descongelación de leucocitos de sangre periférica, diálisis, ultrafiltración tangencial, identificación y cuantificación por cromatografía líquida de ultra resolución por exclusión molecular, y validación biológica in vitro. El producto de este proceso es útil para su aplicación médica.

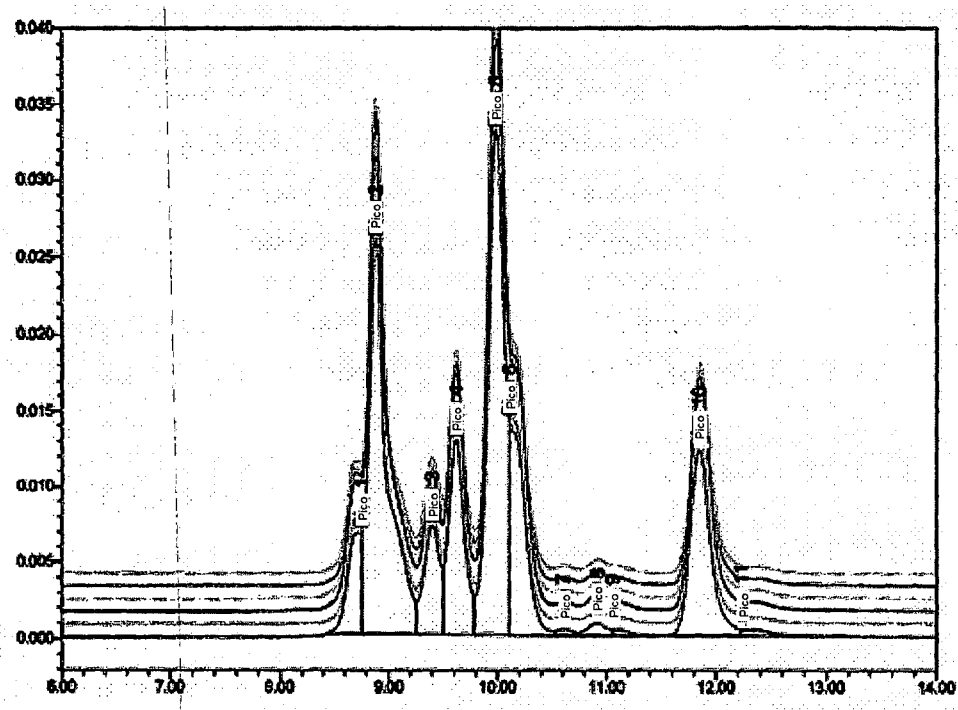


FIGURA 1

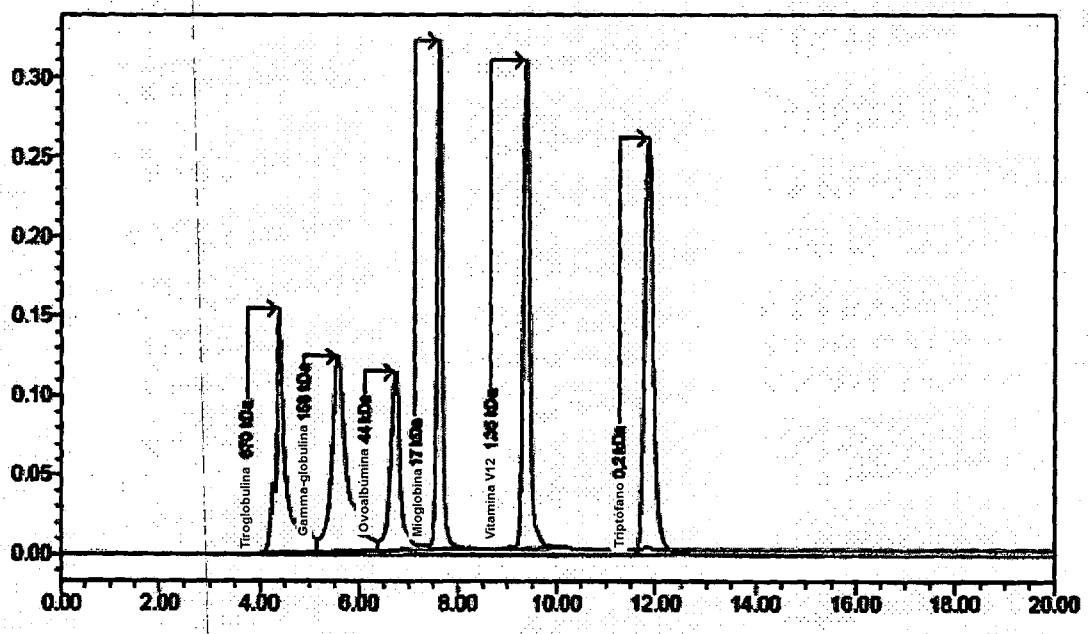


FIGURA 2

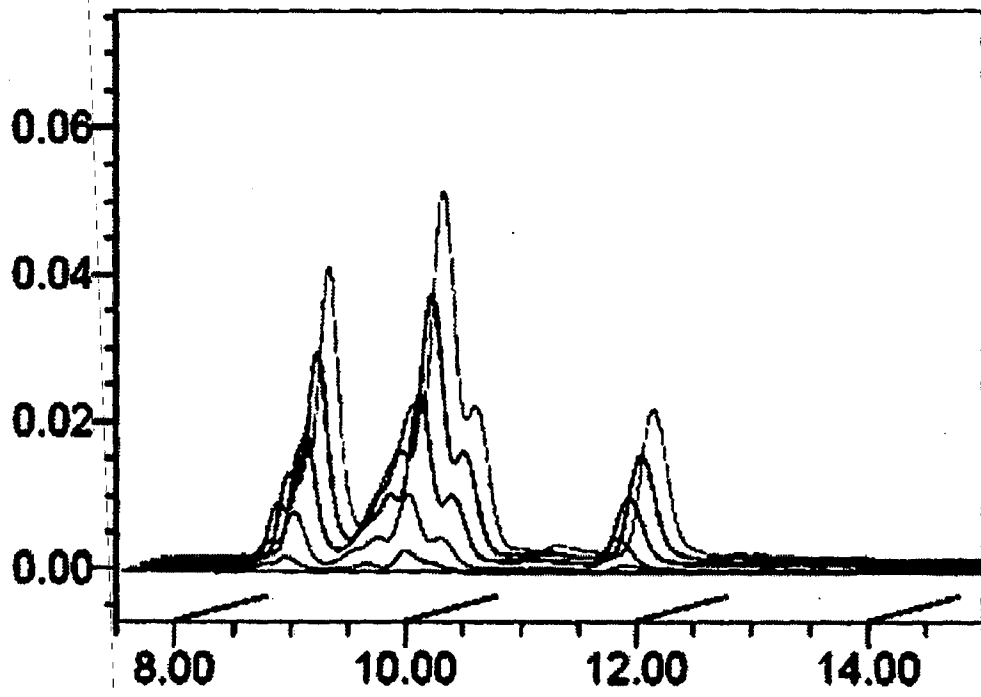


FIGURA 3

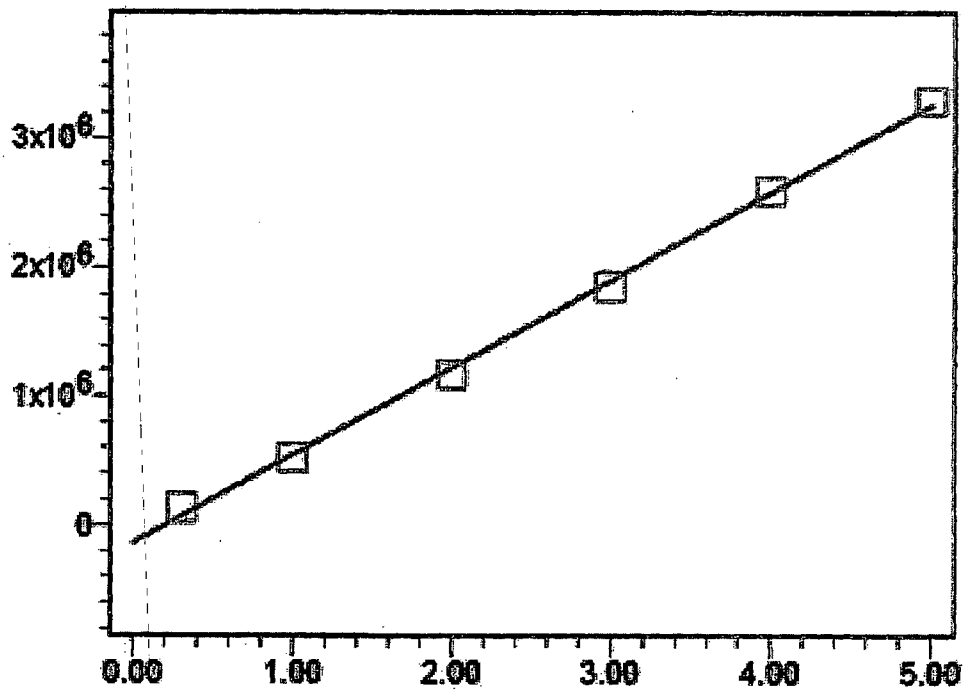


FIGURA 4

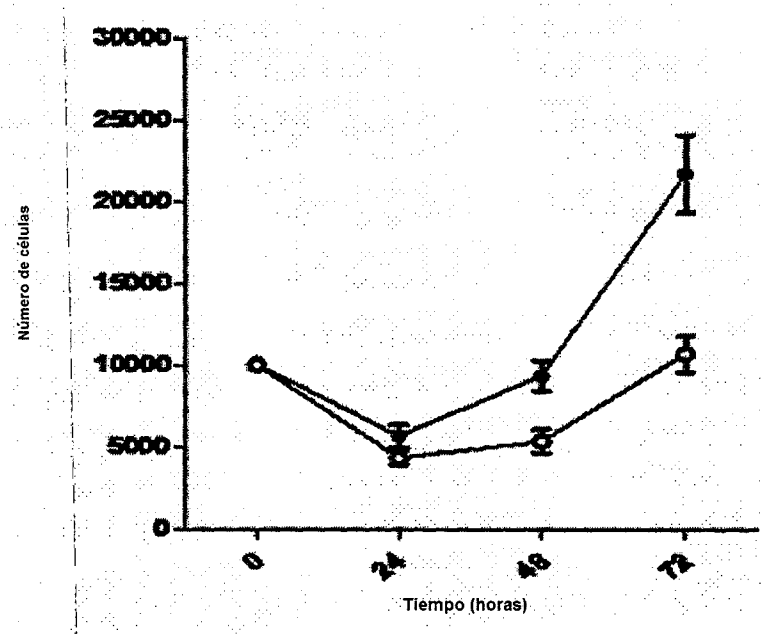


FIGURA 5

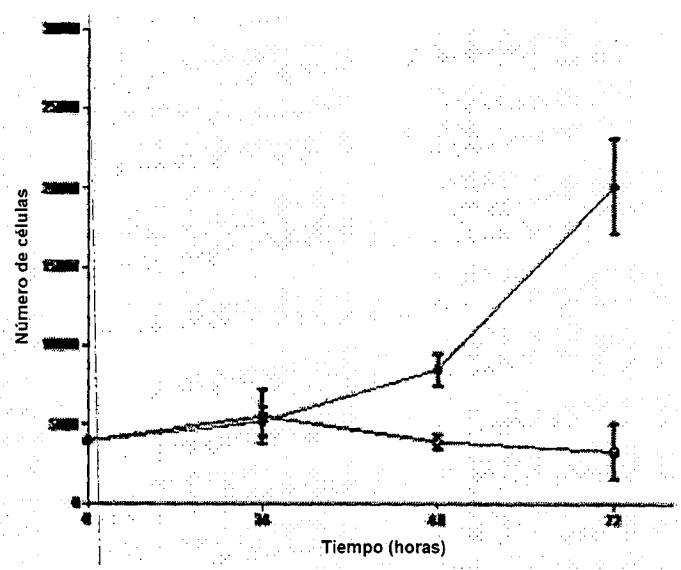


FIGURA 6

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0064187

Bogotá D.C., Junio 17 de 2014 - 11:28:37

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	644039185	17/06/2014	14.671.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	515.000.00	515.000.00
			\$515.000.00

SON: **QUINIENTOSQUINCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-138326-00000-0000

Fecha: 2014-06-26 16:44:47
Tra. 11 PATENTE IYII
Act. 411 PRESENTACIONDep. 2020 DIR. NUEVAS CR
Eve: 378 FASE NACIONAL I
Folios: 22

COLO: 21260-841-001-6

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

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

Junio 17 de 2014 - 11:28:43

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: C07K 014/052	
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL	
(30) Prioridad	(31) Prioridad MX/a/2011/013852	(32) Fecha 2011/12/16	(33) País MX
		(72) Inventor(es) SERGIO ESTRADA PARRA Y OTROS	
		(74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
(85) Fecha limite inicio fase nacional:	(87) Publicación internacional		
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT	Fecha: 2013/06/20		
Fecha de presentación de la solicitud: 2012/12/17	N° publicación: WO 2013/089550 A1		
No. de solicitud PCT/MX2012/000129			
(54) Título:		MÉTODO DE OBTENCIÓN DE EXTRACTO DIALIZABLE DE LEUCOCITOS	

Resumen:

La presente invención es relativa a un proceso para la producción de factor de transferencia. Este proceso consiste de las etapas de congelación y descongelación de leucocitos de sangre periférica, diálisis, ultrafiltración tangencial, identificación y cuantificación por cromatografía líquida de ultra resolución por exclusión molecular, y validación biológica in vitro. El producto de este proceso es útil para su aplicación médica.



No. 14-138326-00000-0000

Fecha: 2014-06-26 16:44:47
Tra. 11 PATENTE IYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 22

22

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DI

☐	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 ☐