

Señor Director

NUEVAS CREACIONES

Superintendencia de Industria y Comercio

E. S. D.

Referencia: Expediente No. 14138326

Asunto: Solicitud de patente para: ***“MÉTODO DE OBTENCIÓN DE EXTRACTO DIALIZABLE DE LEUCITOS”***

Solicitante: INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

Fecha de solicitud: 26 de Junio de 2014

RESPUESTA A PRIMER EXAMEN DE PATENTABILIDAD

ANDRÉS RINCÓN USCÁTEGUI, identificado como aparece al pie de mi firma, en mi condición de apoderado de la sociedad solicitante de la patente de la referencia, doy respuesta al Oficio **5488**, notificado por fijación en lista el 18 de abril de 2017.

I. MODIFICACIONES AL PLIEGO REIVINDICATORIO

En respuesta al examen de patentabilidad el solicitante decide aportar un nuevo capítulo reivindicatorio conformado por **02** reivindicaciones en las que se han incluido las siguientes modificaciones:

1. Se han eliminado las reivindicaciones 3 a 5, de manera que el nuevo pliego reivindicatorio no incluye reivindicaciones dependientes del proceso divulgado en la reivindicación 1.

Por lo tanto, estas modificaciones se ajustan al artículo 34 de la Decisión 486 de 2000 y no constituyen una ampliación de la protección que correspondería a la divulgación contenida en la solicitud inicial.

“EXCELENCIA LEGAL EN UN MUNDO SIN FRONTERAS”

BOGOTÁ - Edificio Siski - Carrera 4 No. 72 - 35 - Código Postal 110221 - Tel. (57-1) 347 3611 - Fax (57-1) 211 8650 - Fax in U.S.A: (1-305) 675 7743 - COLOMBIA
MEDELLÍN - San Fernando Plaza - Carrera 42 A No. 1 - 25 - Torre 4 - Oficina 303 - Código Postal 050021 - Tel: (57-4) 520 4760 - COLOMBIA
BARRANQUILLA - Calle 64 No. 50-22 - Código Postal 080002 - Barrio El Prado - Tel. (57-5) 3 51 64 40 - COLOMBIA

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

II. EN CUANTO A LA SUPUESTA FALTA DE CLARIDAD

1. Con respecto a las objeciones frente a las reivindicaciones 3 a 5, se desea poner de presente que dichas reivindicaciones han sido eliminadas del nuevo pliego reivindicatorio con el fin de darle mayor claridad al mismo. De manera que, considerando que ya no hacen parte de la materia a proteger en la presente invención, esta objeción se debe tener por superada.

2. Con respecto a la objeción frente a la reivindicación 1 por falta de claridad, se desea poner de presente que la expresión *“es un factor de transferencia que exhibe actividad anti-proliferativa”* incluida en el paso (d) hace referencia directa al producto ultrafiltrado obtenido en el paso (c), de manera que sí puede hacer parte caracterizante de dicho paso (d) pues representa una limitación del producto ultrafiltrado obtenido en el paso (c). Adicionalmente, considerando que la reivindicación 1 está dirigida a un proceso para la producción de un factor de transferencia, está claro que no es posible orientar dicha reivindicación a un producto como lo sería un factor de transferencia que exhibe actividad anti-proliferativa. Considerando lo anteriormente expuesto, esta objeción se debe tener por superada.

3. Con respecto a la objeción frente a la reivindicación 2 por falta de soporte en la descripción, se desea poner de presente inicialmente que dicha reivindicación está orientada a un producto, el cual corresponde a un factor de transferencia y no a una técnica para la cuantificación de péptidos. Adicionalmente, se debe mencionar que en la respuesta a la acción oficial anterior se especificó que los picos obtenidos en la figura 1 corresponden a un perfil de SE-UPLC (cromatografía líquida de ultra-resolución por exclusión molecular). Una persona normalmente versada en la materia a partir de esa información, estaría en capacidad de entender las características de la cromatografía, tales como el equipo, el tipo de columna, la composición de la fase móvil, y la velocidad de flujo empleadas para esta técnica y por lo cual, no se hace necesario ningún tipo de

especificación o aclaración posterior. También cabe señalar que en el ejemplo 4 divulgado en la descripción de la presente solicitud, se indica de manera explícita las condiciones del análisis cualitativo y cuantitativo por SE-UPLC. De igual manera, en el ejemplo 4 se describe la presencia de los 11 picos característicos con una intensidad suficiente para ser considerada significativa teniendo en cuenta la escala de todos los picos obtenidos. De acuerdo a lo anterior, esta objeción se debe tener por superada.

III. EN CUANTO A LA SUPUESTA FALTA DE CLARIDAD DEL TÍTULO

Con respecto a la objeción frente al título de la presente solicitud, se desea poner de presente que de acuerdo con el capítulo descriptivo, la presente invención pertenece al campo técnico de procesos de producción de preparaciones medicinales que contienen extracto dializable leucocitario, de manera que sí corresponden con el objeto de la solicitud. Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, esta objeción se debe tener por superada.

IV. EN CUANTO A LA SUPUESTA FALTA DE CLARIDAD EN LA DESCRIPCIÓN

Con respecto a la objeción frente al capítulo descriptivo, se desea poner de presente que se presenta en conjunto con este documento un capítulo descriptivo modificado que no presenta errores de redacción. Sin embargo, respecto a la falta de claridad de la figura 1, se desea poner de presente nuestro desacuerdo dado que de acuerdo con las condiciones empleadas para llevar a cabo dicha cromatografía, los picos 7, 8, 9 y 11 no pueden ser considerados ruido de fondo, si además se considera la baja escala de intensidad de los picos identificados. Teniendo en cuenta las modificaciones realizadas, estas objeciones se deben tener por superadas.

V. PETICIÓN

Puesto que se ha dado respuesta a todas las objeciones formuladas por la Dirección de Nuevas Creaciones, se solicita proceder al otorgamiento de la solicitud de patente.

VI. ANEXOS

- 1.** Nuevo pliego reivindicatorio conformado por **02** reivindicaciones.
- 2.** Capítulo descriptivo modificado

Señor Director,

ANDRÉS RINCÓN USCÁTEGUI

C.C. 79.780.910 de Bogotá

T.P. 114.908

COLO-21260-0841-0001-6
DPG\DPG\ID-295239\WPC21260
No. M-2017-295239\DPG

REIVINDICACIONES MODIFICADAS

1. Un proceso para la producción de un factor de transferencia, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:
- a. someter un concentrado leucocitario a cinco ciclos de congelación/descongelación, en donde, en cada ciclo, el concentrado se congela a -20 °C durante una semana y, después se descongela completamente, para obtener un producto congelado-descongelado;
 - b. someter el producto congelado-descongelado obtenido en el paso (a) a diálisis empleando una membrana de diálisis con un corte de 12 kDa, para obtener un producto dializado;
 - c. someter el producto dializado obtenido en el paso (b), a un proceso serial de ultrafiltración tangencial, primero empleando un tamaño de corte de 10 kDa y luego un corte de 1 kDa, para obtener un producto ultrafiltrado;
 - d. someter el producto ultrafiltrado obtenido en el paso (c) a cromatografía líquida de ultra resolución por exclusión molecular (SE-UPLC) para su identificación; en donde dicho producto ultrafiltrado obtenido en el paso (c) es un factor de transferencia que exhibe actividad anti-proliferativa.
2. Un factor de transferencia que exhibe actividad anti-proliferativa obtenido por el proceso de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque presenta once picos cromatográficos en un análisis por SE-UPLC, los cuales eluyen a aproximadamente los siguientes tiempos de retención:

<i>Número de pico</i>	<i>Tiempo de retención (min)</i>
1	8.7
2	8.85

<i>3</i>	<i>9.4</i>
<i>4</i>	<i>9.6</i>
<i>5</i>	<i>10.0</i>
<i>6</i>	<i>10.2</i>
<i>7</i>	<i>10.6</i>
<i>8</i>	<i>10.9</i>
<i>9</i>	<i>11.1</i>
<i>10</i>	<i>11.8</i>
<i>11</i>	<i>12.15</i>

DPG\DPG\ID-488695\WPC21260

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 pequeños 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 en 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 NL2004000058. 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 °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 Tryptófano (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 μ L/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 (IC_{50}) 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 μ l 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 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 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 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 a 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.

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).

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.

DPG\DPG\ID-488693\WPC21260