

**PROCESOS PARA LA EXTRACCIÓN, DESLIPIDIZACIÓN Y  
CONCENTRACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS IgY Y FORMULACIONES  
CONCENTRADAS DE LAS MISMAS**

5

**CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION**

La presente invención se relaciona con el campo de la medicina veterinaria, en particular con el tratamiento de enfermedades en animales, y más específicamente con la  
10 prevención o tratamiento del Síndrome Respiratorio y Reproductivo o PRRS (por las siglas del Inglés, Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome) en los porcinos, la Diarrea Epidémica Porcina (DEP), el síndrome de la mancha blanca en camarón, mastitis bovina, las  
15 infecciones producidas por *Actinobacillus pleuropneumoniae* en porcinos, las coccidiosis en aves y las intoxicaciones producidas por toxinas de los hongos, mediante la administración de una formulación de inmunoglobulinas concentrada de origen aviar, obtenida de  
20 yema de huevo proveniente de gallinas previamente hiperinmunizadas con una formulación de vacuna emulsionada.

**ANTECEDENTES**

25

La sanidad de los animales es la clave principal para obtener alimentos sanos y de calidad. Es por ello que el control de las enfermedades y el empleo de todas las herramientas disponibles para ello resulta ser de  
30 suma importancia. La vacunación es una herramienta más de las muchas que se emplean diariamente en las granjas, existiendo otras como medidas de bioseguridad para evitar la entrada de patógenos provenientes de otras

explotaciones, la aplicación de pautas de higiene y el manejo de los animales para reducir la diseminación de enfermedades entre los animales de la misma explotación, control estricto de la alimentación, o la creación de un  
5 ambiente confortable para los animales de la granja.

No obstante a la fecha existen enfermedades que no ha sido posible controlar de manera adecuada. Dentro de estas enfermedades se encuentran las producidas por los virus, tal como la ocasionada por el virus del Síndrome  
10 Respiratorio y Reproductivo del Cerdo, que es una enfermedad severa en los porcinos, la cual fue reportada en los Estados Unidos en 1987 y posteriormente se identificó en muchos otros países europeos. En 1991, en Holanda se reportó el aislamiento del agente etiológico  
15 llamándole virus Lelystad y debido a la sintomatología que presentaban los cerdos se le conocía como Síndrome Respiratorio y/o Aborto Epidémico del Cerdo.

Otra enfermedad viral que no ha sido posible controlar es la Diarrea Epidémica Porcina (PED), la cual  
20 es una enfermedad viral exclusiva de los porcinos, muy contagiosa y en la mayoría de las veces ocasiona la muerte. Esta enfermedad afecta el sistema digestivo y los lechones mueren en un periodo de 3-5 días a causa de la diarrea y deshidratación.

Otra enfermedad más es la ocasionada por el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV), principal  
25 patógeno del camarón y responsable de grandes pérdidas de producción y ganancias en esta industria a nivel mundial. Hasta ahora no existe ningún tratamiento efectivo para  
30 controlar la infección.

El tratamiento de las enfermedades causadas por coronavirus y rotavirus bovino también resulta de interés.

Por otra parte encontramos las enfermedades ocasionadas por bacterias, tal como la mastitis bovina que produce una inflamación de la glándula mamaria y sus tejidos secretores, reduciendo la producción del volumen de leche y alterando su composición, e incluso su sabor, además de elevar su carga bacteriana normal. De acuerdo con su duración, se puede clasificar en aguda o crónica. En relación a sus manifestaciones clínicas, puede ser clínica o subclínica. Esta enfermedad provoca graves pérdidas económicas a la industria lechera.

También encontramos las enfermedades provocadas por el *Actinobacillus pleuropneumoniae*, bacteria responsable de problemas respiratorios en porcinos con distribución mundial, conociéndose desde hace 50 años, y teniendo una elevada incidencia desde los años 80, siendo frecuente en unidades de engorde. Responsable primario de la Pleuroneumonía porcina, así como agente involucrado directamente dentro del Complejo Respiratorio Porcino. Es una enfermedad de elevada diseminación, altamente contagiosa y en muchas ocasiones letal en porcinos desde el destete al sacrificio. Provoca en el 30-50% de los porcinos una pleuritis fibrinosa con adherencias costales bastante características y elevada mortalidad en cuadros agudos, con elevado retraso del crecimiento en las formas crónicas. Además se ha encontrado que el *Actinobacillus pleuropneumoniae* está involucrado en cuadros de otitis media, artritis y osteomielitis.

El tratamiento de las enfermedades causadas por *E. coli*, *Salmonella spp.* y *Clostridium perfringens* también es de interés para la salud de los animales.

Por otra parte, tenemos la coccidiosis que es una enfermedad infecciosa producida por parásitos de vida intracelular estricta de los géneros *Eimeria spp.* e

*Isospora* spp. Las coccidias son omnipresentes pues existen en la mayoría de las instalaciones pecuarias alrededor del mundo. Estos parásitos pueden infectar a una gran variedad de animales incluyendo humanos, aves,  
5 rumiantes, cerdos, perros, gatos y otros animales domésticos, sin embargo, en la mayoría de los casos las coccidias son especies específicas.

Adicionalmente otro problema de salud que enfrenta la industria pecuaria son las ocasionadas por  
10 tricotecenos, toxinas producidas por varios hongos *Fusarium*, particularmente *Fusarium graminearum* y *Fusarium sporotrichioides*. Se producen en cosechas y entran al alimento a través de ingredientes contaminados. Los Tricotecenos son irritantes tisulares comprobados y su  
15 ingesta se asocia principalmente con lesiones orales, dermatitis e irritación intestinal. La principal respuesta fisiológica a estas micotoxinas es la pérdida del apetito. Los tricotecenos son micotoxinas supresoras fuertes que afectan la respuesta celular inmune con un  
20 impacto directo sobre la médula, el bazo, los tejidos linfoides, el timo y la mucosa intestinal, en donde se lesionan las células que se dividen activamente.

Para el control preventivo de todas estas enfermedades, existen básicamente dos formas de  
25 protección. Se les puede exponer a antígenos derivados de un agente infeccioso para estimular una reacción inmunitaria protectora o bien se les puede administrar un anticuerpo preformado que se haya obtenido de algún sujeto inmune.

30 La primera forma de protección se logra por medio de vacunas que pueden ser de diferentes clases: microorganismos vivos, liofilizados, o muertos en emulsiones oleosas, y recientemente la creación de

vacunas clonadas y recombinantes. Cada una de ellas presenta ventajas y desventajas en cuanto a protección, respuesta inmune y duración de la protección. Sin embargo, se ha encontrado que en algunos casos se  
5 presentan lesiones indeseadas en el huésped a causa del virus vacunal (Tizard, I.R. 1998. *Vacunación y vacunas In: Inmunología Veterinaria. 5ª Ed. Mc. Graw-Hill. Pp.285-305*).

La segunda forma de protección también llamada  
10 inmunidad pasiva involucra la transmisión de anticuerpos específicos contra agentes infecciosos a un huésped.

Tradicionalmente, a nivel de investigación, los anticuerpos son elaborados principalmente en mamíferos y en menor frecuencia en aves. Los tipos de anticuerpos que  
15 regularmente se elaboran en mamíferos son monoclonales y policlonales, y policlonales en aves (Larsson, et al 1993. *Chicken antibodies: taking advantage of evolution. A review Poultry Sci.72: 1807-1812*).

En el caso de las aves, la especie *Gallus gallus domesticus* (gallos y gallinas) es la única especie de la  
20 cual se obtienen anticuerpos en forma más accesible y de manera altamente definida. El principal anticuerpo sérico presente en dicha especie es la IgG aunque la IgG es transportada al huevo de una manera similar a la  
25 transferencia de la IgG de mamíferos a través de la placenta.

En el huevo, la inmunoglobulina Y (IgY) se encuentra en mayor concentración en la yema, no obstante también se encuentran pequeñas cantidades de IgY en la clara.  
30 Incluso se ha encontrado que las cantidades de IgY son mayores en la yema que en el suero de la gallina (Larsson, et al 1993. *Chicken antibodies: taking*

*advantage of evolution. A review Poultry Sci.72: 1807-1812).*

Para tener una noción de la cantidad de anticuerpos que elaboran las gallinas, basta señalar que una ponedora produce aproximadamente de 5 a 6 huevos por semana con un volumen de yema de aproximadamente de 15 ml, por lo tanto, en una semana una gallina puede llegar a producir anticuerpos en yema equivalente a 90 a 100 ml de suero o 180 a 200 ml de sangre completa. Esto al compararse contra los 20 ml de sangre completa que otorga un conejo inmunizado por semana permite apreciar claramente la eficiente productividad de los anticuerpos en yema de huevo. Obviamente si se utilizan animales más grandes como caballos o vacas, la cantidad de suero y de anticuerpos sería mayor que en el huevo, pero además de que el procedimiento es costoso también es más doloroso para los animales.

Entre las ventajas de los anticuerpos de yema de huevo de gallina se encuentran:

1. No fijan el complemento.
2. No se unen a la Proteína A de *Staphilococcus aureus*.
3. No reaccionan con el Factor Reumatoide.
4. Debido a su diferencia filogenética con los anticuerpos de mamíferos, la IgY no muestra reacción cruzada con los anticuerpos de mamíferos.
5. Bajo costo de obtención.

En años recientes se han empleado los anticuerpos de yema de huevo (inmunoglobulinas) como herramientas de diagnóstico y terapia (Schmidt, et al. 1989). Es así que aprovechando su diferencia filogenética con las inmunoglobulinas de mamíferos, las Ig's han presentado varias ventajas cuando se han usado en inmunodiagnóstico.

Por ejemplo, las Ig's de yema se han empleado para detectar varios virus mediante las técnicas de ELISA, inmunodifusión, inmunofluorescencia y fijación de complemento. Dado su bajo punto isoeléctrico comparado con la Ig de humanos, se ha empleado en ensayos de electroforesis para la cuantificación de inmunoglobulinas en suero de varios animales (Altschuh, D. et al. 1984. *Determination of IgG and IgM levels in serum by Rocket Immuno-electrophoresis using yolk antibodies from immunized chickens*. *J. Immunolog. Methods*. 69:1-7; Larsson, A. et al. 1988. *Chicken antibodies: a tool to avoid false positive results by rheumatoid factor in latex fixation tests*. *J. Immunol. Methods*. 108:205-208; Larsson, A. et al. 1992. *Chicken antibodies: a tool to avoid interference by complement activation in ELISA*. *J. Immunol. Methods*. 156: 79-83.; Larsson, et al 1993. *Chicken antibodies: taking advantage of evolution. A review Poultry Sci.* 72: 1807-1812; Schade, R. et al 1996. *The production of avian (Egg yolk) antibodies: IgY*. *Atla*. 24:925-934).

En cuanto a su aplicación terapéutica, las IgY se han empleado como inmunoterapia en diferentes campos de la ciencia como por ejemplo la administración de inmunoglobulinas de yema de huevo por vía oral ha prevenido infecciones por rotavirus en ratones, bovinos, y porcinos entre otros (Ikemori, Y. et al. 1992. *Protection of neonatal calves against fatal enteric colibacillosis by administration of egg yolk powder from hens immunized with 1<99-pillated enterotoxigenic Escherichia coli*. *Am.J.Vet.Res.* 53:2005-2008; Kuroki, M. et al 1994. *Passive protection against bovine rotavirus in calves by specific immunoglobulins from chicken egg yolk*. *Arch. Virol.* 138: 143-148; Marquart, R. 1998.

*Antibody-loaded eggs for piglets: prevention of baby pigs from diarrhea. Proc. 2<sup>nd</sup> international Symposium on Egg Nutrition and Newly Emerging Ovo-Technologies. Alberta, Canada).*

5            Incluso las inmunoglobulinas IgY de yema de huevo se han empleado como antivenenos contra víboras y escorpiones los cuales se pueden inyectar para neutralizar las toxinas sin riesgo de las reacciones anafilácticas comunes encontradas con los antivenenos  
10           elaborados en caballo (Larsson, et al 1993. *Chicken antibodies: taking advantage of evolution. A review Poultry Sci.*72: 1807-1812). Una aplicación más ha sido para prevenir la caries en humanos provocada por *Streptococcus mutans* (Hatta, H. et al. 1997. *Passive*  
15           *immunization Against Dental Plaque Formation in Humans: Effect of a Mouth Rinse containing Egg Yolk Antibodies (IgY) Specific to Streptococcus mutans. Caries.Res.*31:268-274).

            En el caso de las enfermedades en animales antes  
20           mencionadas, a lo largo del tiempo se han desarrollado numerosas medidas de control y prevención debido a la extensión y repercusión económica de dichas enfermedades. Entre las estrategias para combatirlas se encuentran las vacunas inactivadas y las vacunas a virus vivo. Sin  
25           embargo, ninguna de estas estrategias ha sido 100% eficaz.

            En el caso específico de los virus de RNA como el virus del PRRS o el virus de PED la falta de control se debe en gran parte a su alto índice de mutación. Esta es  
30           una característica en común entre los virus de RNA a consecuencia de la falta de actividad de *proofreading* de la RNA polimerasa. Entonces, esta falla junto con la rápida cinética de replicación del virus incrementan el

riego de mutación y surgimiento de cuasiespecies  
 (Manreetpal Singh Brar, Mang Shi, Raymond Kin-Hi Hui and  
 Frederick Chi-Ching (2014) Leung mail Genomic Evolution  
 of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus  
 5 (PRRSV) Isolates Revealed by Deep Sequencing. PLOS one).  
 Se ha reportado que la variación genética del virus de  
 PRRS es entre 0.48 y 1.32 % (Murtaugh M., (2012) Use and  
 interpretation of sequencing inf PRRSV control programs.  
 Allen D. Leman Swaine Conference. Veterinary Continuing  
 10 Education). Estas características del virus de PRRS  
 explican la inadecuada protección que se ha obtenido por  
 vacunas.

Una de las estrategias que se ha utilizado para  
 prevenir las enfermedades ocasionadas por estos virus son  
 15 las autovacunas, lo cual implica desarrollar vacunas no  
 sólo por país, sino por regiones, de lo contrario la  
 prevención por estos medios resulta ser insuficiente.

También se ha observado que en el caso del virus  
 causante del PRRS se logra neutralizar utilizando  
 20 inmunoglobulinas provenientes del suero de mamífero (US  
 5,846,805). Estos resultados enseñan que las  
 inmunoglobulinas son una alternativa para el tratamiento  
 de virus de RNA. Sin embargo, el problema con esta  
 alternativa es que los anticuerpos obtenidos de esta  
 25 manera son inviables.

La aplicación de inmunoglobulinas obtenidas a partir  
 de la yema de huevo (IgY) ya ha sido utilizada en  
 diversas aplicaciones en salud y profilaxis animal e  
 incluso en humanos. Las investigaciones realizadas por  
 30 Akita y Nakai (Akita, E., Nakai, S. (2000). *Egg nutrition  
 and biotechnology*, CAB International, New York, p.301),  
 demuestran que la función protectora de IgY contra  
 agentes infecciosos es atribuida principalmente por su

capacidad para prevenir la colonización o neutralizar las toxinas.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN**

5

Con el fin de alcanzar el objetivo de la presente invención, se evaluó experimentalmente la capacidad de una formulación que comprende inmunoglobulinas IgY concentradas y específicas para neutralizar al virus de PRRS, obtenida a partir de yema de huevo proveniente de gallinas previamente hiperinmunizadas.

Con una formulación de vacuna emulsionada se inmuniza a las aves de postura para obtener, a través de la yema de huevo, inmunoglobulinas IgY neutralizantes contra agentes infecciosos o toxinas, las cuales tras un método de extracción, deslipidización y concentración, donde se utilizan cantidades mínimas, se obtiene finalmente una formulación concentrada de dichas inmunoglobulinas IgY capaces de lograr una protección inesperada de hasta aproximadamente el 100%, además de regularizar el nivel de S/P en granjas ya infectadas.

La invención presenta la ventaja adicional de estabilizar a la piara, parvada, rebaño o bancos, reduciendo la circulación de los agentes infecciosos. Así también, usando la formulación concentrada de origen aviar de la invención como programa, se reduce la generación de subpoblaciones a la maternidad y al destete se logra retrasar la seroconversión de los animales de engorda.

A la fecha las inmunoglobulinas evaluadas han provenido de suero de mamífero y solamente han sido probadas por ejemplo en un modelo experimental desafiando

con la misma cepa del virus con el que se vacunaron. Es decir, a diferencia de la presente invención, a las vacunas del estado de la técnica se les ha probado únicamente la protección homóloga (WO 02/067985).

5        Además, la formulación concentrada de origen aviar de la invención, que comprende inmunoglobulinas IgY concentradas puede utilizarse en cualquier etapa productiva de los animales sin generar efectos adversos o indeseables.

10        La formulación concentrada de origen aviar de la invención se encuentra altamente concentrada y protege contra desafíos más altos del agente infeccioso o toxinas. Se cuenta con evidencias de protección contra desafíos de 10 a la siete (10,000,000), lo cual resulta  
15        muy superior a lo ya conocido en el estado de la técnica (WO 2007/061281 A2).

          Adicionalmente a lo anterior, mediante los procesos de la presente invención se logra concentrar las inmunoglobulinas (IgY) neutralizantes contra los agentes  
20        infecciosos circulantes de campo o toxinas, de tal manera que se puede formular un concentrado donde se aplica únicamente 1 ml ó 3 ml por dosis, mientras que la aplicación de las vacunas y productos del estado de la técnica, es hasta de 5 ml y más aún hasta 10 ml, e  
25        incluso más de 10 ml (WO 2007/061281 A2).

          La reducción en el volumen de aplicación es beneficiosa en varios aspectos. Primero porque la aplicación se hace sencilla, y segundo porque se reduce costos de producción y tercero, porque el transporte a  
30        diferentes áreas ocupa menor espacio.

          Las dosis de 1 ml o hasta 3 ml que se pueden lograr gracias a la formulación concentrada de inmunoglobulinas (IgY) de la presente invención, según la gravedad,

obviamente, siguen un esquema de inmunización y, aún sin ser propiamente una vacuna, puede funcionar como tal y controlar los animales infectados. La formulación concentrada de origen aviar de la invención entra dentro  
5 de la plataforma de inmunidad pasiva, porque contiene inmunoglobulinas neutralizantes contra agentes infecciosos o toxinas.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

10

La Figura 1 muestra el incremento en el título de inmunoglobulinas después de aplicar el proceso de concentración. Se extrajeron inmunoglobulinas de yema, una parte se cuantificó por el método de MNT y el resto  
15 se sometió al proceso de concentración. El grupo A fue vacunado con 2 vacunas elaboradas con aceite minera cada una de ellas conteniendo 3 cepas del virus de PRRS y aplicadas de maneara alternativa mensualmente. El grupo B fue vacunado con 1 vacuna elaborada con aceite mineral y  
20 chitosan, la cual contiene 6 cepas diferentes del virus de PRRS y fue aplicada mensualmente. El grupo C fue vacunado con una vacuna elaborada con marcol y chitosan, la cual contiene 6 cepas diferentes del virus de PRRS y fue aplicada mensualmente.

25

La Figura 2 muestra la disminución paulatina de los niveles de anticuerpos en las hembras del hato reproductor tras recibir la formulación concentrada.

30

En la figura 3 se muestra el monitoreo de la mortalidad a partir de la semana 3 y hasta la 26. Los grupos que fueron tratados con la formulación de inmunoglobulinas IgY concentrada de origen aviar de la

invención se resaltan en un cuadro azul más intenso (grupos del 07 al 16).

La Figura 4 presenta una gráfica con los porcentajes de mortalidad de cada grupo evaluado, en donde se  
5 destacan aquéllos que fueron tratados con la formulación concentrada de origen aviar de la invención.

### DESCRIPCIÓN DETALLADA

10

#### Proceso de extracción, deslipidización y concentración de inmunoglobulinas IgY.

15 Se realizan los siguientes pasos para realizar la extracción y concentración de inmunoglobulinas IgY neutralizantes de agentes infecciosos o toxinas a partir de la yema de huevo, en aves previamente inmunizadas.

La yema de huevo se diluye 1:4 ó 1:8 (sin la clara)  
20 con azida de sodio al 0.01 % y se almacena en refrigeración por lo menos durante toda el día, preferentemente de 12 a 24 horas. Posteriormente, el sobrenadante se separa y se agrega 1 al 15% de hidroxipropilmetilcelulosaftalato (HPMCP) en proporción  
25 de 0.25 ml por cada 100 ml de yema. Se deja reposar por lo menos 24 horas. La capa de lípidos que se forma en la parte superior de la solución es separada y la parte acuosa se filtra, luego se le adiciona PEG, preferentemente 8000, en una proporción del 5-30% P/V, se  
30 mezcla y se deja reposar al menos durante 4 horas, pero de preferencia se deja toda la noche a 4°C. Después se centrifuga por 20 a 30 minutos y se retira el sobrenadante. La pastilla resultante se solubiliza con

PBS 1X o buffer TRIS, a un volumen equivalente al 10% del volumen original.

5                   Terapias con la formulación concentrada de  
                          inmunoglobulinas IgY de la invención.

La formulación resultante del proceso de extracción, deslipidización y concentración de las inmunoglobulinas  
10 IgY neutralizantes de agentes infecciosos o toxinas, obtenida a partir de la yema de huevo de gallinas previamente hiperinmunizadas, puede comprender: aproximadamente 0.8% a 5% de inmunoglobulinas IgY concentradas contra patógenos o toxinas de la invención,  
15 preferentemente 1% de inmunoglobulinas IgY concentradas, aproximadamente 80% a 90% de agua y aproximadamente 0.001% a 0.03% de conservadores. La dosis de tratamiento de la formulación concentrada de la invención puede ser de 1 ml y de 3 ml como máximo, la cual logra neutralizar  
20 las variedades de campo los agentes infecciosos o toxinas de la invención, ofreciendo inesperadamente una protección de hasta el 100% en animales, además de regularizar el nivel de S/P en granjas ya infectadas, tal como se muestra más adelante.

25

En una modalidad, la presente invención se refiere a un proceso para la extracción y concentración de inmunoglobulinas a partir de yema de huevo de gallinas previamente hiperinmunizadas, caracterizado por los  
30 siguientes pasos:

a) Se diluye la yema 1:4 ó 1:8 (sin la clara) con azida de sodio al 0.01 % y se almacena en refrigeración por lo menos durante 24 horas.

b) Se separa el sobrenadante y se agrega hidroxipropilmetilcelulosaftalato (HPMCP) al 1-15% en proporción de 0.25 ml por cada 100 ml de yema. Se deja reposar por lo menos 24 horas.

5 c) Se separa la capa de lípidos que se forma en la parte superior de la solución y se filtra la parte acuosa.

d) Se adiciona PEG, preferente PEG 8000 en una proporción del 5-30% P/V, se mezcla y se deja reposar al  
10 menos durante 4 a 12 horas a 4°C.

e) Se centrifuga por 20 a 30 minutos y se quita el sobrenadante.

f) La pastilla resultante se solubiliza con PBS 1X o buffer TRIS, a un volumen equivalente al 10% del volumen  
15 original, mantener el pH en 7.

En una modalidad adicional, la presente invención se dirige a una formulación concentrada de inmunoglobulinas IgY de origen aviar obtenida por el proceso para extracción, deslipidización y concentración de  
20 inmunoglobulinas a partir de yema de huevo proveniente de gallinas previamente hiperinmunizadas. Dichas formulaciones concentradas de origen aviar de la invención puede comprender además aproximadamente de 70% a 85% de agua y/o aproximadamente de 0.001% a 0.03% de  
25 conservadores. En particular, la formulación concentrada de inmunoglobulinas IgY está caracterizada porque comprende 0.8% a 5% de inmunoglobulinas IgY concentradas neutralizantes del virus que causa el PRRS.

Además, la presente invención también se refiere  
30 al uso de la formulación concentrada de inmunoglobulinas IgY de origen aviar de la invención en la elaboración de un medicamento para el tratamiento del Síndrome Respiratorio y Reproductivo (PRRS) en porcinos, la

Diarrea Epidémica Porcina (DEP) en porcinos, el síndrome de la mancha blanca en camarón, mastitis bovina, las infecciones producidas por *Actinobacillus pleuropneumoniae* en porcinos, la coccidiosis en aves y  
5 las intoxicaciones provocadas por tricotecenos, particularmente las provocadas por tricotecenos como 4-deoxinivalenol (DON), en donde el medicamento puede ser administrable por la vía de administración parenteral, preferentemente por la vía intramuscular o es  
10 administrable vía oral y con el alimento, según sea el caso.

Los siguientes ejemplos muestran los resultados de la aplicación de la formulación concentrada de la invención en porcinos. No obstante, dichos ejemplos son  
15 proporcionados con el fin de ilustración y no de limitación.

#### **EJEMPLO 1**

En este ejemplo se analizó el producto terminado de  
20 inmunoglobulinas. Se inmunizaron aves de postura, se cosecharon los huevos de las aves inmunizadas y las yemas de huevo se sometieron a un proceso de extracción y concentración de inmunoglobulinas, tal como antes fue descrito. Nuestros resultados indican que el proceso de  
25 concentración, descrito anteriormente, incrementa los títulos de anticuerpos respecto a lo obtenido sin dicho proceso. El incremento en la concentración va de 1.6 a 2.1 veces (figura 1). Como resultado de este experimento, se encontró que el rendimiento de inmunoglobulinas IgY  
30 neutralizantes de virus del PRRS es adecuado para llevar a cabo un tratamiento efectivo en porcinos que padecen del Síndrome Respiratorio y Reproductivo, utilizando un volumen menor para alcanzar la protección.

**EJEMPLO 2****Aplicación de inmunoglobulinas (tipo IgY) en las hembras del hato reproductor.**

5

Se realizó un seguimiento longitudinal de la presencia de anticuerpos contra el virus de PRRS mediante la evaluación de sueros de 30 cerdas seleccionadas aleatoriamente a partir de una granja de explotación de ciclo completo con 500 cerdas, situada en el occidente de la República Mexicana. Esta granja produce lechones negativos al virus de PRRS, que se contaminan a lo largo de la vida productiva.

El hato reproductor fue tratado con una aplicación de 1 ml de la formulación de inmunoglobulinas IgY concentrada de origen aviar de la invención, por vía intramuscular cada 4 meses y una repetición 15 días después. Posteriormente se realizaron aplicaciones semanales a los 70 y 85 días de gestación.

Las cerdas del pie de cría fueron monitoreadas de forma bimestral para determinar el movimiento viral. Se tomaron muestras de sangre de los mismos 30 animales seleccionados inicialmente. Para la evaluación, se utilizó la técnica de ELISA (IDEXX, PRRS X3), que es una manera indirecta para medir la efectividad del tratamiento con IgY concentradas. El kit mide los niveles de anticuerpos del tipo IgG que genera el cerdo en respuesta a una viremia. Por lo tanto, si el cerdo está infectado producirá anticuerpos del tipo IgG como respuesta y se obtendrán valores de S/P por arriba del punto de corte, pero si no hay viremia el kit arrojará valores S/P inferiores al punto de corte. El punto de corte de la ELISA fue de 0.4 S/P.

En la figura 2 se muestra que el tratamiento aplicado al hato reduce los niveles de anticuerpos de manera paulatina a medida que se realiza el monitoreo bimestral y por ende se demuestra que el virus de PRRS fue neutralizado por las inmunoglobulinas aplicadas (del tipo IgY), limitando de esta manera la infección. Es importante señalar que sorpresivamente nuestro producto neutralizó al virus de tal manera que al cabo de 6 meses ya no se registró una reinfección del virus de PRRS. Esto mismo se prueba porque se registró una diferencia sustancial en los parámetros productivos de granjas negativas y positivas.

### **EJEMPLO 3**

15

#### **Aplicación de inmunoglobulinas (IgY) concentradas en lechones**

En el presente ejemplo se muestran los resultados de evaluación de disminución de la viremia en lechones clínicamente afectados por el virus de PRRS. Los lechones no presentaron viremia durante la etapa de maternidad (primeras 3 semanas). Sin embargo, hubo evidencia clínica de viremia alrededor de las 6-8 semanas de edad. Esto se comprobó mediante la técnica de PCR en tiempo real, en donde se generaron 5 pools de sueros de animales virémicos; cada pool integrado por sueros de 5 porcinos diferentes (un total de 25 porcinos evaluados). Como se observa en la tabla, la carga viral alcanzó títulos entre 30  $6.16 \times 10^5$  y  $2.24 \times 10^7$ .

| Identificación | Carga Viral<br>Inicial | Carga viral después del<br>Tratamiento |
|----------------|------------------------|----------------------------------------|
| Destete 6      | $6.16 \times 10^5$     | NEGATIVO                               |
| Destete 6      | $4.98 \times 10^6$     | NEGATIVO                               |
| Destete 7-8    | $5.54 \times 10^4$     | NEGATIVO                               |
| Destete 7-8    | $2.24 \times 10^7$     | NEGATIVO                               |
| Destete 7-8    | $1.21 \times 10^7$     | NEGATIVO                               |

Una vez que se confirmó la viremia, se les aplicó un tratamiento con la formulación concentrada de origen aviar de la invención. Se aplicó una dosis de 3 mL por vía intramuscular. Para evaluar la eficacia del tratamiento, se observaron los datos clínicos y además se cuantificó la cantidad de virus circulante en los porcinos.

Los resultados del monitoreo a los 10 días posteriores a la aplicación de la formulación de inmunoglobulinas IgY concentrada de origen aviar de la invención evidenció que el 100% de las muestras fueron negativas a la presencia de material genético del virus PRRS en suero.

Con los resultados obtenidos, se demuestra que la aplicación de un programa con inmunoglobulinas en el pie de cría evita la circulación viral y puede neutralizar la viremia en lechones de destete con cargas de  $10^7$  partículas virales por mL.

20

#### EJEMPLO 4

**El uso de inmunoglobulinas IgY concentradas reduce la mortalidad de lechones**

25

La formulación de inmunoglobulinas IgY concentrada de origen aviar de la invención fue aplicada a porcinos destetados y destinados para engorda. Durante todo el tiempo de producción se registró la mortalidad bajo  
5 diferentes sistemas de tratamiento.

La granja en estudio se ubica en la región centro occidente de la república mexicana y con 1100 cerdas en su hato reproductor y una producción semanal de 500 lechones. La granja tiene antecedentes de infección  
10 endémica de PRRS, aun cuando se han implementado varias estrategias de control. Se tiene un sistema de autoreemplazo, en el cual se considera la introducción de cerdas cada 4 meses. En el pie de cría se incluye la aplicación de la vacuna a virus vivo modificado contra  
15 PRRS cada 3 meses.

En el presente ejemplo se hizo un monitoreo semanal y se calculó el porcentaje de mortalidad tanto en el destete (semanas 3 a 9) como en el periodo de engorda (semana 10 a 26).

20 Se compararon dos tratamientos. Uno basado en vacuna viva y otro con la formulación de inmunoglobulinas IgY concentrada de origen aviar de la invención, además también se consideró un bloque control sin tratamiento. Cada tratamiento estuvo integrado por diferentes grupos  
25 que fueron evaluados de manera independiente: los grupos del 01 al 06 corresponden a lechones tratados de forma convencional (vacuna viva) y los grupos del 07 al 16 fueron los que recibieron dos dosis de la formulación de inmunoglobulinas IgY concentrada de origen aviar de la  
30 invención, en tanto los grupos 17, 18 y 19 no fueron tratados.

| <b>Tipo de tratamiento</b>                                                                      | <b>Descripción del tratamiento</b>                               | <b>Grupos que recibieron el tratamiento</b> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| <b>Vacuna a virus vivo modificado</b>                                                           | Aplicación de la vacuna a los 21 días de edad y 3 meses.         | 6, Del 01 al 06                             |
| <b>Inmunoglobulinas Altamente Concentradas de Origen Aviar específicas para PRRS (tipo IgY)</b> | Dos aplicaciones de 3 ml c/u, semana 1 y 10 después del destete. | 10, Del 07 al 16                            |
| <b>Control sin tratamiento</b>                                                                  | Sin tratamiento                                                  | 3, Del 17 al 19                             |

En la figura 3 se muestra el monitoreo de la mortalidad a partir de la semana 3 y hasta la 26. Los grupos que fueron tratados con la formulación de inmunoglobulinas IgY concentrada de origen aviar de la invención se resaltan en un cuadro azul más intenso (grupos del 07 al 16).

El porcentaje de mortalidad promedio de los grupos no tratados fue el más alto (25.06%), en seguida se ubica a los grupos que recibieron el tratamiento convencional (21.2% en promedio) y el mejor tratamiento fue el de la formulación de inmunoglobulinas IgY concentrada de origen aviar de nuestra invención, donde se obtuvo un porcentaje promedio de mortalidad del 10.27%. Es decir, que con el uso de las inmunoglobulinas IgY se alcanza una supervivencia de casi el 90% de los animales tratados que representa 10% más de lo alcanzado por el método de vacunación.

En la figura 4 se presenta una gráfica de los porcentajes de mortalidad acumulada de cada grupo

evaluado, en donde se destacan aquéllos que fueron tratados con la formulación concentrada de origen aviar de la invención.

Los resultados del uso de inmunoglobulinas del tipo IgY concentradas muestran una reducción significativa en los porcentajes de mortalidad asociados al virus de PRRS. Aún más, se observó que el estado de salud y productividad de estos animales también mejoró, a diferencia de los grupos que recibieron la vacuna. Es importante señalar que esta es la primera vez que se evidencia el uso de inmunoglobulinas aviares para el tratamiento en lechones.

Estos resultados son muy significativos, pues el programa con la formulación de inmunoglobulinas IgY concentrada de origen aviar de la invención en lechones no sólo disminuye el porcentaje de mortalidad, sino que además brinda la posibilidad de obtener otras mejoras en los parámetros productivos.

Por lo anterior, se apreciará que, aunque las modalidades específicas de la invención se han descrito en la presente para propósitos de ilustración, pueden hacerse varias modificaciones sin desviarse de la naturaleza y alcance de la invención. En consecuencia, la invención no está limitada excepto por las reivindicaciones anexas.

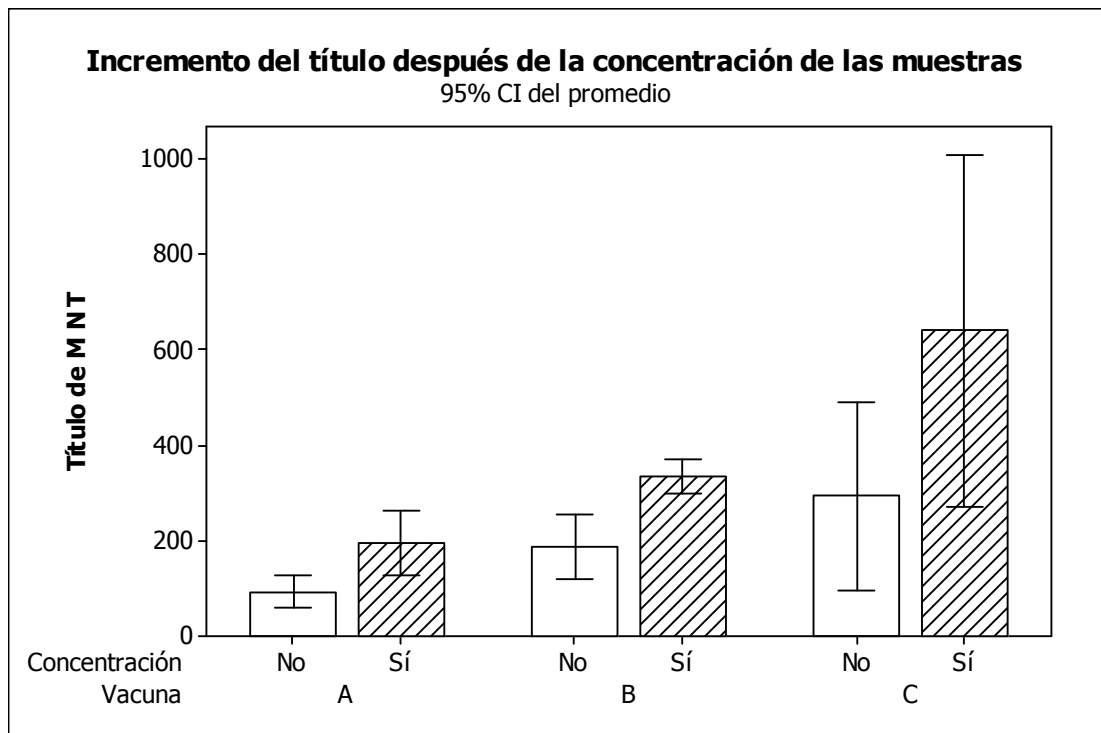


Figura 1

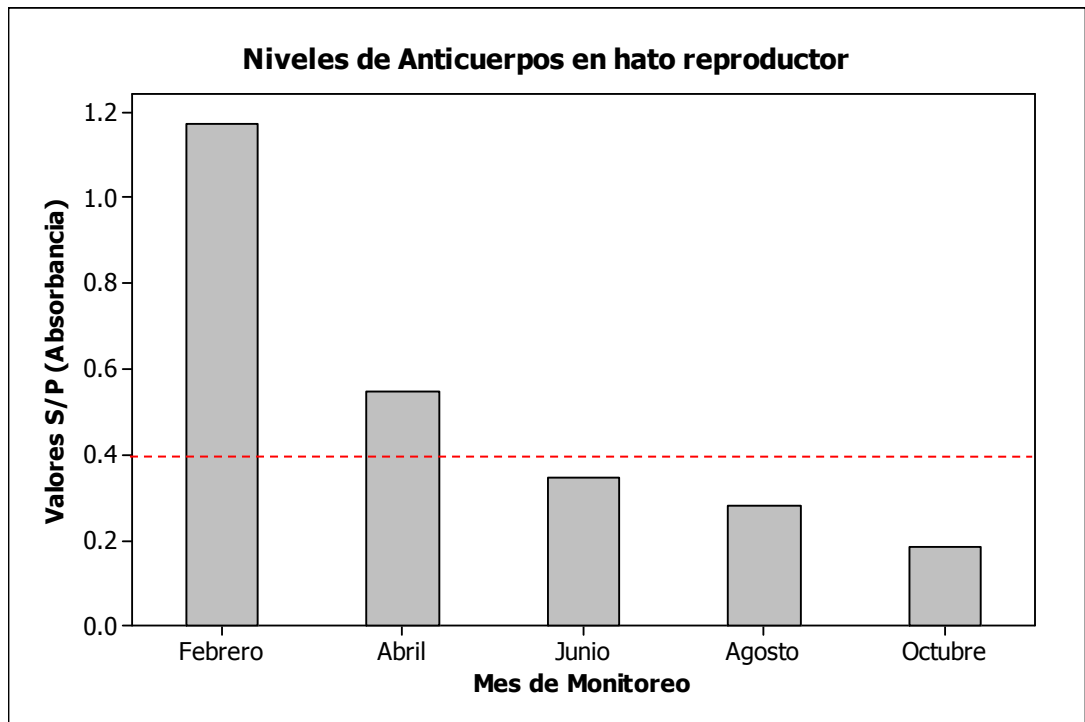


Figura 2

|            |        |  | MORTALIDAD POR GRUPO |   |    |    |    |    |    |    |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |      |     |       |      |
|------------|--------|--|----------------------|---|----|----|----|----|----|----|---------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|------|-----|-------|------|
|            |        |  | DESTETE              |   |    |    |    |    |    |    | ENGORDA |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |      |     | TOTAL |      |
| DESTETADOS | GRUPOS |  | 3                    | 4 | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 | 11      | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | DEST | ENG | TOTAL | %    |
| 456        | GPO 01 |  | 2                    | 3 | 2  | 5  | 14 | 9  | 5  | 8  | 7       | 5  | 3  | 3  | 1  | 2  | 0  | 1  | 1  | 0  | 0  | 0  | 1  | 0  | 1  | 0  | 40   | 9%  | 73    | 16.0 |
| 443        | GPO 02 |  | 1                    | 2 | 3  | 2  | 4  | 6  | 7  | 1  | 6       | 2  | 0  | 1  | 1  | 4  | 1  | 4  | 5  | 2  | 1  | 2  | 5  | 4  | 10 | 4  | 25   | 6%  | 78    | 17.6 |
| 413        | GPO 03 |  | 1                    | 2 | 2  | 6  | 11 | 14 | 5  | 3  | 9       | 2  | 0  | 1  | 0  | 0  | 0  | 0  | 3  | 0  | 2  | 0  | 3  | 0  | 0  | 2  | 41   | 10% | 66    | 16.0 |
| 442        | GPO 04 |  | 0                    | 0 | 1  | 21 | 14 | 34 | 11 | 1  | 4       | 2  | 3  | 0  | 1  | 1  | 0  | 0  | 0  | 0  | 1  | 0  | 1  | 0  | 0  | 0  | 81   | 18% | 96    | 21.7 |
| 390        | GPO 05 |  | 0                    | 1 | 2  | 22 | 23 | 15 | 16 | 9  | 12      | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 1  | 0  | 1  | 1  | 0  | 4  | 1  | 0  | 2  | 4  | 79   | 20% | 124   | 31.8 |
| 373        | GPO 06 |  | 0                    | 1 | 4  | 14 | 10 | 15 | 13 | 8  | 3       | 3  | 4  | 4  | 0  | 0  | 0  | 2  | 3  | 0  | 0  | 1  | 0  | 0  | 0  | 0  | 57   | 15% | 90    | 24.1 |
| 422        | GPO 07 |  | 1                    | 1 | 6  | 9  | 12 | 9  | 3  | 3  | 4       | 2  | 3  | 3  | 2  | 2  | 0  | 4  | 0  | 0  | 1  | 1  | 0  | 0  | 3  | 0  | 41   | 10% | 69    | 16.4 |
| 423        | GPO 08 |  | 1                    | 2 | 2  | 1  | 10 | 4  | 2  | 3  | 2       | 3  | 4  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 1  | 0  | 1  | 0  | 0  | 2  | 1  | 0  | 22   | 5%  | 39    | 9.2  |
| 458        | GPO 09 |  | 0                    | 2 | 1  | 3  | 2  | 1  | 1  | 10 | 11      | 5  | 7  | 1  | 1  | 3  | 1  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 2  | 1  | 0  | 2  | 10   | 2%  | 54    | 11.8 |
| 405        | GPO 10 |  | 1                    | 0 | 0  | 2  | 3  | 5  | 7  | 1  | 4       | 13 | 4  | 3  | 2  | 2  | 1  | 0  | 2  | 0  | 0  | 0  | 1  | 0  | 2  | 0  | 18   | 4%  | 53    | 13.1 |
| 427        | GPO 11 |  | 0                    | 2 | 0  | 2  | 4  | 1  | 1  | 0  | 6       | 4  | 3  | 1  | 1  | 1  | 0  | 0  | 1  | 1  | 0  | 0  | 0  | 2  | 0  | 0  | 10   | 2%  | 30    | 7.0  |
| 453        | GPO 12 |  | 1                    | 1 | 0  | 2  | 1  | 1  | 2  | 7  | 7       | 6  | 0  | 1  | 1  | 5  | 4  | 0  | 1  | 1  | 0  | 2  | 2  | 1  | 0  | 0  | 8    | 2%  | 46    | 10.2 |
| 490        | GPO 13 |  | 1                    | 0 | 2  | 4  | 3  | 0  | 6  | 5  | 3       | 0  | 0  | 3  | 3  | 6  | 1  | 1  | 0  | 0  | 1  | 0  | 0  | 0  | 1  | 0  | 16   | 3%  | 40    | 8.2  |
| 472        | GPO 14 |  | 2                    | 1 | 0  | 7  | 1  | 9  | 5  | 2  | 3       | 1  | 3  | 4  | 2  | 2  | 0  | 1  | 1  | 1  | 1  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 25   | 5%  | 46    | 9.7  |
| 699        | GPO 15 |  | 0                    | 5 | 2  | 9  | 7  | 8  | 9  | 4  | 1       | 3  | 2  | 2  | 0  | 0  | 1  | 0  | 2  | 2  | 0  | 0  | 0  | 0  | 2  | 1  | 40   | 6%  | 60    | 8.6  |
| 495        | GPO 16 |  | 2                    | 4 | 3  | 0  | 0  | 7  | 6  | 5  | 5       | 5  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 3  | 0  | 1  | 1  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 22   | 4%  | 42    | 8.5  |
| 465        | GPO 17 |  | 0                    | 9 | 13 | 20 | 8  | 12 | 13 | 8  | 9       | 1  | 2  | 0  | 4  | 0  | 1  | 0  | 2  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 75   | 16% | 102   | 21.9 |
| 419        | GPO 18 |  | 1                    | 0 | 3  | 19 | 19 | 30 | 12 | 5  | 3       | 12 | 4  | 3  | 4  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 84   | 20% | 115   | 27.4 |
| 432        | GPO 19 |  | 9                    | 5 | 10 | 15 | 9  | 18 | 10 | 16 | 6       | 9  | 5  | 5  | 4  | 3  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 1  | 76   | 18% | 125   | 28.9 |

Figura 3

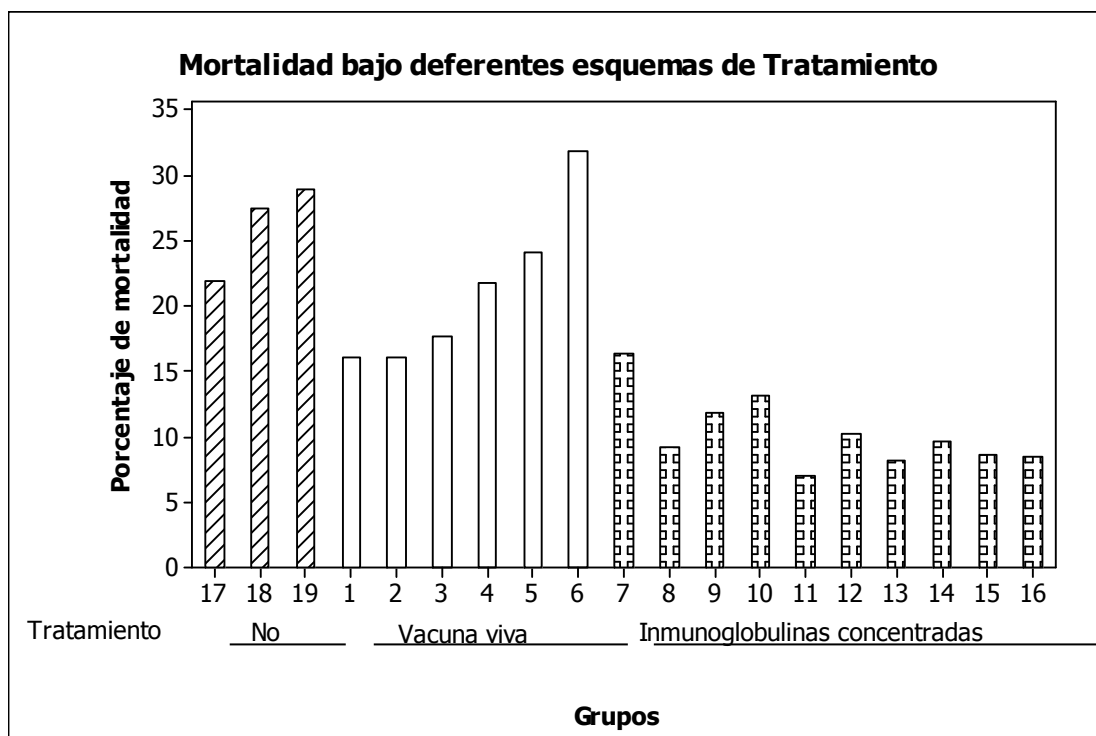


Figura 4

Señores  
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. \_\_\_\_\_ S. \_\_\_\_\_ D. \_\_\_\_\_

**Re: Expediente N°. NC2019/0001645**  
**Solicitud de Patente divisional de la solicitud de patente NC2017/0002614**  
**Título: PROCESOS PARA LA EXTRACCIÓN, DESLIPIDIZACIÓN Y CONCENTRACIÓN**  
**DE INMUNOGLOBULINAS IgY Y FORMULACIONES CONCENTRADAS DE LAS**  
**MISMAS**  
**Solicitante: INVESTIGACIÓN APLICADA S.A. DE C.V.**  
**Nuestra Re: P2019/000023**

**RESPUESTA AL OFICIO No.3749 NOTIFICADO POR CORREO CERTIFICADO DE FECHA 4 DE**  
**JUNIO DE 2019**  
**(Artículo 17 del Código de Procedimiento Administrativo y Contencioso Administrativo))**

J. IAN RAISBECK, mayor de edad y vecino de Bogotá, D.C., identificado tal como aparece al pie de mi firma, y como apoderado de la sociedad solicitante en la radicación de la presente solicitud de patente, me permito manifestar lo siguiente en respuesta al oficio No. 3749, dentro del plazo establecido para este efecto en el artículo 17 del Código de Procedimiento Administrativo y Contencioso Administrativo:

1. a. Ese Despacho requiere ajustar la descripción de la presente solicitud divisional con el fin de retirar los apartados que se relacionan con las formulaciones y permanezcan los ejemplos y modalidades que se refieren al proceso para la extracción, deslipidización y concentración de inmunoglobulinas, reclamado dentro de la solicitud divisional.

b. En atención a esta observación, presento con este memorial un nuevo texto descriptivo ajustado según los requerimientos de ese Despacho a la materia objeto de la solicitud divisional. Asimismo, presento nuevo set de figuras del cual se retiran las figuras relativas a los efectos de la vacuna emulsionada que ahora es objeto de la solicitud madre;

así entonces, las nuevas figuras 1 a 4 de la presente solicitud divisional corresponden a las figuras 3 a 6 inicialmente presentadas.

Cabe aclarar que la presente solicitud divisional contiene 6 reivindicaciones que reclaman i) un proceso para la extracción, deslipidización y concentración de inmunoglobulinas a partir de yema de huevo proveniente de gallinas hiperinmunizadas con una formulación de vacuna emulsionada, y ii) una formulación concentrada de inmunoglobulinas IgY de origen aviar. Esta materia corresponde a las Reivindicaciones anteriores 18 a 34, clasificadas por el Examinador como segundo grupo inventivo (Grupo II) en el Oficio No. 13877, emitido dentro de la solicitud madre No. NC2017/0002614. Sobre esta base, la Descripción que presento en esta oportunidad, limita la divulgación a los ejemplos y modalidades correspondientes a las modalidades reclamadas en la solicitud divisional.

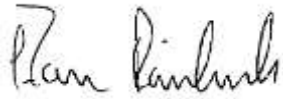
2. a. Ese Despacho menciona que el capítulo reivindicatorio de la solicitud divisional no cumple con lo requerido durante el examen de patentabilidad, por cuanto la Reivindicación 1 reclama la formulación de vacuna emulsionada del grupo inventivo I.

b. Informo a ese Despacho que, por un error involuntario, en la Reivindicación 1 de la solicitud divisional no se retiró la referencia a la vacuna emulsionada que aparecía en el preámbulo de la Reivindicación 18 de la solicitud inicialmente presentada. Con al ánimo de corregir este error de forma, presento nuevamente el pliego Reivindicatorio retirando la mencionada referencia del preámbulo de la Reivindicación 1. Cabe mencionar que esta corrección es meramente formal y no incorpora materia que no fuese sometida a consideración de ese Despacho junto con la solicitud divisional.

Presento junto con este memorial comprobante de pago de la tasa de modificación voluntaria, el cual se presentó el 4 de julio de 2019 a través de la plataforma SIPI. En el evento que con la respuesta al Auto No. 3749, emitido con fundamento en el Artículo 17 de CPACA, no aplique el pago de la tasa de modificación voluntaria, respetuosamente solicito se me informe para adelantar el desglose correspondiente.

Habiendo dado respuesta completa al requerimiento de manera que se cumplen las exigencias de ese Despacho, respetuosamente solicito se proceda a realizar el estudio de patentabilidad a la materia de la presente solicitud divisional, cuya tasa fue aportada por el solicitante al momento de dividir la solicitud.

Atentamente,



J. IAN RAISBECK

C.C. 79'376.996 de Bogotá D.C.

T.P. 135.799 del C. S. de la J.

**Anexos:**

- Descripción ajustada al Grupo inventivo II
- Reivindicaciones con corrección de error de forma
- Figuras de solicitud divisional
- Comprobante de pago por modificación voluntaria



# SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT: 800.176.089-2

## COMPROBANTE DE RECAUDO SISTEMA SIPI

**Radicado: NC2019/0001645**

**Recibo: 19-54918**

**Fecha: 04/07/2019**

**J. IAN RAISBECK**

**CC: 79.376.996**

**Pago PSE No: 302912**

**CUS: 465907201**

NC Divisional de Patente/Modelo

Solicitado en Patente PCT NC2017/0002614

### Detalle del pago

| Id.   | Rentístico  | Concepto y Servicio                                               | Cant. | Val. Unit. | Subtotal   |
|-------|-------------|-------------------------------------------------------------------|-------|------------|------------|
| 1     | 50005-01-03 | N.CREACION CORRECCION SOLICITUD EN TRAMITE / MODIFICACION (LINEA) | 1     | \$ 161,500 | \$ 161,500 |
| TOTAL |             |                                                                   |       |            | \$ 161,500 |

## **REIVINDICACIONES SOLICITUD DIVISIONAL**

1. Un proceso para la extracción, deslipidización y concentración de inmunoglobulinas a partir de yema de huevo proveniente de gallinas hiperinmunizadas con una formulación de vacuna emulsionada, caracterizado porque comprende los siguientes pasos:

a) Se diluye la yema 1:4 ó 1:8 (sin la clara) con azida de sodio al 0.01 % y se almacena en refrigeración de 12 a 24 horas.

b) Se separa el sobrenadante y se agrega hidroxipropilmetilcelulosaftalato (HPMCP) del 1 al 15% en proporción de 0.25 ml por cada 100 ml de yema. Se deja reposar 24 horas.

c) Se separa la capa de lípidos que se forma en la parte superior de la solución y se filtra la parte acuosa.

d) Se adiciona PEG en una proporción del 5 al 30% P/V, se mezcla y se deja reposar durante 4 a 12 horas a 4°C.

e) Se centrifuga por 20 a 30 minutos y se quita el sobrenadante.

f) La pastilla resultante se solubiliza con PBS o buffer TRIS, a un volumen equivalente al 10% del volumen original.

2. El proceso para la extracción, deslipidización y concentración de inmunoglobulinas de conformidad con la reivindicación 1, en donde la yema 1:4 ó 1:8 (sin la clara) diluida con azida de sodio al 0.01% en el paso (a), se almacena en refrigeración de 12 a 24 horas.

3. El proceso para la extracción, deslipidización y concentración de inmunoglobulinas de conformidad con la reivindicación 1, en donde en el paso (d) se adiciona PEG8000 en una proporción del 5 al 30% P/V.

4. Una formulación concentrada de inmunoglobulinas IgY de origen aviar, caracterizada porque comprende de 0.8% a 5% de inmunoglobulinas IgY neutralizantes del virus que causa el PRRS.

5. La formulación concentrada de inmunoglobulinas IgY de origen aviar de conformidad con la reivindicación 4, caracterizada porque es una solución acuosa.

6. La formulación concentrada de inmunoglobulinas IgY de origen aviar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5, caracterizada porque además comprende de 0.001% a 0.03% de conservadores.

**PROCESOS PARA LA EXTRACCIÓN, DESLIPIDIZACIÓN Y  
CONCENTRACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS IgY Y FORMULACIONES  
CONCENTRADAS DE LAS MISMAS**

5

**CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION**

La presente invención se relaciona con el campo de la medicina veterinaria, en particular con el tratamiento de enfermedades en animales, y más específicamente con la  
10 prevención o tratamiento del Síndrome Respiratorio y Reproductivo o PRRS (por las siglas del Inglés, Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome) en los porcinos, la Diarrea Epidémica Porcina (DEP), el síndrome de la mancha blanca en camarón, mastitis bovina, las  
15 infecciones producidas por *Actinobacillus pleuropneumoniae* en porcinos, las coccidiosis en aves y las intoxicaciones producidas por toxinas de los hongos, mediante la administración de una formulación de inmunoglobulinas concentrada de origen aviar, obtenida de  
20 yema de huevo proveniente de gallinas previamente hiperinmunizadas con una formulación de vacuna emulsionada.

**ANTECEDENTES**

25

La sanidad de los animales es la clave principal para obtener alimentos sanos y de calidad. Es por ello que el control de las enfermedades y el empleo de todas las herramientas disponibles para ello resulta ser de  
30 suma importancia. La vacunación es una herramienta más de las muchas que se emplean diariamente en las granjas, existiendo otras como medidas de bioseguridad para evitar la entrada de patógenos provenientes de otras

explotaciones, la aplicación de pautas de higiene y el manejo de los animales para reducir la diseminación de enfermedades entre los animales de la misma explotación, control estricto de la alimentación, o la creación de un  
5 ambiente confortable para los animales de la granja.

No obstante a la fecha existen enfermedades que no ha sido posible controlar de manera adecuada. Dentro de estas enfermedades se encuentran las producidas por los virus, tal como la ocasionada por el virus del Síndrome  
10 Respiratorio y Reproductivo del Cerdo, que es una enfermedad severa en los porcinos, la cual fue reportada en los Estados Unidos en 1987 y posteriormente se identificó en muchos otros países europeos. En 1991, en Holanda se reportó el aislamiento del agente etiológico  
15 llamándole virus Lelystad y debido a la sintomatología que presentaban los cerdos se le conocía como Síndrome Respiratorio y/o Aborto Epidémico del Cerdo.

Otra enfermedad viral que no ha sido posible controlar es la Diarrea Epidémica Porcina (PED), la cual  
20 es una enfermedad viral exclusiva de los porcinos, muy contagiosa y en la mayoría de las veces ocasiona la muerte. Esta enfermedad afecta el sistema digestivo y los lechones mueren en un periodo de 3-5 días a causa de la diarrea y deshidratación.

Otra enfermedad más es la ocasionada por el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV), principal  
25 patógeno del camarón y responsable de grandes pérdidas de producción y ganancias en esta industria a nivel mundial. Hasta ahora no existe ningún tratamiento efectivo para  
30 controlar la infección.

El tratamiento de las enfermedades causadas por coronavirus y rotavirus bovino también resulta de interés.

Por otra parte encontramos las enfermedades ocasionadas por bacterias, tal como la mastitis bovina que produce una inflamación de la glándula mamaria y sus tejidos secretores, reduciendo la producción del volumen de leche y alterando su composición, e incluso su sabor, además de elevar su carga bacteriana normal. De acuerdo con su duración, se puede clasificar en aguda o crónica. En relación a sus manifestaciones clínicas, puede ser clínica o subclínica. Esta enfermedad provoca graves pérdidas económicas a la industria lechera.

También encontramos las enfermedades provocadas por el *Actinobacillus pleuropneumoniae*, bacteria responsable de problemas respiratorios en porcinos con distribución mundial, conociéndose desde hace 50 años, y teniendo una elevada incidencia desde los años 80, siendo frecuente en unidades de engorde. Responsable primario de la Pleuroneumonía porcina, así como agente involucrado directamente dentro del Complejo Respiratorio Porcino. Es una enfermedad de elevada diseminación, altamente contagiosa y en muchas ocasiones letal en porcinos desde el destete al sacrificio. Provoca en el 30-50% de los porcinos una pleuritis fibrinosa con adherencias costales bastante características y elevada mortalidad en cuadros agudos, con elevado retraso del crecimiento en las formas crónicas. Además se ha encontrado que el *Actinobacillus pleuropneumoniae* está involucrado en cuadros de otitis media, artritis y osteomielitis.

El tratamiento de las enfermedades causadas por *E. coli*, *Salmonella spp.* y *Clostridium perfringens* también es de interés para la salud de los animales.

Por otra parte, tenemos la coccidiosis que es una enfermedad infecciosa producida por parásitos de vida intracelular estricta de los géneros *Eimeria spp.* e

*Isospora* spp. Las coccidias son omnipresentes pues existen en la mayoría de las instalaciones pecuarias alrededor del mundo. Estos parásitos pueden infectar a una gran variedad de animales incluyendo humanos, aves,  
5 rumiantes, cerdos, perros, gatos y otros animales domésticos, sin embargo, en la mayoría de los casos las coccidias son especies específicas.

Adicionalmente otro problema de salud que enfrenta la industria pecuaria son las ocasionadas por  
10 tricotecenos, toxinas producidas por varios hongos *Fusarium*, particularmente *Fusarium graminearum* y *Fusarium sporotrichioides*. Se producen en cosechas y entran al alimento a través de ingredientes contaminados. Los Tricotecenos son irritantes tisulares comprobados y su  
15 ingesta se asocia principalmente con lesiones orales, dermatitis e irritación intestinal. La principal respuesta fisiológica a estas micotoxinas es la pérdida del apetito. Los tricotecenos son micotoxinas supresoras fuertes que afectan la respuesta celular inmune con un  
20 impacto directo sobre la médula, el bazo, los tejidos linfoides, el timo y la mucosa intestinal, en donde se lesionan las células que se dividen activamente.

Para el control preventivo de todas estas enfermedades, existen básicamente dos formas de  
25 protección. Se les puede exponer a antígenos derivados de un agente infeccioso para estimular una reacción inmunitaria protectora o bien se les puede administrar un anticuerpo preformado que se haya obtenido de algún sujeto inmune.

30 La primera forma de protección se logra por medio de vacunas que pueden ser de diferentes clases: microorganismos vivos, liofilizados, o muertos en emulsiones oleosas, y recientemente la creación de

vacunas clonadas y recombinantes. Cada una de ellas presenta ventajas y desventajas en cuanto a protección, respuesta inmune y duración de la protección. Sin embargo, se ha encontrado que en algunos casos se  
5 presentan lesiones indeseadas en el huésped a causa del virus vacunal (Tizard, I.R. 1998. *Vacunación y vacunas In: Inmunología Veterinaria. 5ª Ed. Mc. Graw-Hill. Pp.285-305*).

La segunda forma de protección también llamada  
10 inmunidad pasiva involucra la transmisión de anticuerpos específicos contra agentes infecciosos a un huésped.

Tradicionalmente, a nivel de investigación, los anticuerpos son elaborados principalmente en mamíferos y en menor frecuencia en aves. Los tipos de anticuerpos que  
15 regularmente se elaboran en mamíferos son monoclonales y policlonales, y policlonales en aves (Larsson, et al 1993. *Chicken antibodies: taking advantage of evolution. A review Poultry Sci.72: 1807-1812*).

En el caso de las aves, la especie *Gallus gallus domesticus* (gallos y gallinas) es la única especie de la  
20 cual se obtienen anticuerpos en forma más accesible y de manera altamente definida. El principal anticuerpo sérico presente en dicha especie es la IgG aunque la IgG es transportada al huevo de una manera similar a la  
25 transferencia de la IgG de mamíferos a través de la placenta.

En el huevo, la inmunoglobulina Y (IgY) se encuentra en mayor concentración en la yema, no obstante también se encuentran pequeñas cantidades de IgY en la clara.  
30 Incluso se ha encontrado que las cantidades de IgY son mayores en la yema que en el suero de la gallina (Larsson, et al 1993. *Chicken antibodies: taking*

*advantage of evolution. A review Poultry Sci.72: 1807-1812).*

Para tener una noción de la cantidad de anticuerpos que elaboran las gallinas, basta señalar que una ponedora produce aproximadamente de 5 a 6 huevos por semana con un volumen de yema de aproximadamente de 15 ml, por lo tanto, en una semana una gallina puede llegar a producir anticuerpos en yema equivalente a 90 a 100 ml de suero o 180 a 200 ml de sangre completa. Esto al compararse contra los 20 ml de sangre completa que otorga un conejo inmunizado por semana permite apreciar claramente la eficiente productividad de los anticuerpos en yema de huevo. Obviamente si se utilizan animales más grandes como caballos o vacas, la cantidad de suero y de anticuerpos sería mayor que en el huevo, pero además de que el procedimiento es costoso también es más doloroso para los animales.

Entre las ventajas de los anticuerpos de yema de huevo de gallina se encuentran:

1. No fijan el complemento.
2. No se unen a la Proteína A de *Staphilococcus aureus*.
3. No reaccionan con el Factor Reumatoide.
4. Debido a su diferencia filogenética con los anticuerpos de mamíferos, la IgY no muestra reacción cruzada con los anticuerpos de mamíferos.
5. Bajo costo de obtención.

En años recientes se han empleado los anticuerpos de yema de huevo (inmunoglobulinas) como herramientas de diagnóstico y terapia (Schmidt, et al. 1989). Es así que aprovechando su diferencia filogenética con las inmunoglobulinas de mamíferos, las Ig's han presentado varias ventajas cuando se han usado en inmunodiagnóstico.

Por ejemplo, las Ig's de yema se han empleado para detectar varios virus mediante las técnicas de ELISA, inmunodifusión, inmunofluorescencia y fijación de complemento. Dado su bajo punto isoeléctrico comparado con la Ig de humanos, se ha empleado en ensayos de electroforesis para la cuantificación de inmunoglobulinas en suero de varios animales (Altschuh, D. et al. 1984. *Determination of IgG and IgM levels in serum by Rocket Immuno-electrophoresis using yolk antibodies from immunized chickens. J. Immunolog. Methods. 69:1-7; Larsson, A. et al. 1988. Chicken antibodies: a tool to avoid false positive results by rheumatoid factor in latex fixation tests. J. Immunol. Methods. 108:205-208; Larsson, A. et al. 1992. Chicken antibodies: a tool to avoid interference by complement activation in ELISA. J. Immunol. Methods. 156: 79-83.; Larsson, et al 1993. Chicken antibodies: taking advantage of evolution. A review Poultry Sci.72: 1807-1812; Schade, R. et al 1996. The production of avian (Egg yolk) antibodies: IgY. Atla.24:925-934).*

En cuanto a su aplicación terapéutica, las IgY se han empleado como inmunoterapia en diferentes campos de la ciencia como por ejemplo la administración de inmunoglobulinas de yema de huevo por vía oral ha prevenido infecciones por rotavirus en ratones, bovinos, y porcinos entre otros (Ikemori, Y. et al. 1992. *Protection of neonatal calves against fatal enteric colibacillosis by administration of egg yolk powder from hens immunized with 1<99-pillated enterotoxigenic Escherichia coli. Am.J.Vet.Res.53:2005-2008; Kuroki, M. et al 1994. Passive protection against bovine rotavirus in calves by specific immunoglobulins from chicken egg yolk. Arch. Virol. 138: 143-148; Marquart, R. 1998.*

*Antibody-loaded eggs for piglets: prevention of baby pigs from diarrhea. Proc. 2<sup>nd</sup> international Symposium on Egg Nutrition and Newly Emerging Ovo-Technologies. Alberta, Canada).*

5            Incluso las inmunoglobulinas IgY de yema de huevo se han empleado como antivenenos contra víboras y escorpiones los cuales se pueden inyectar para neutralizar las toxinas sin riesgo de las reacciones anafilácticas comunes encontradas con los antivenenos  
10            elaborados en caballo (Larsson, et al 1993. *Chicken antibodies: taking advantage of evolution. A review Poultry Sci.*72: 1807-1812). Una aplicación más ha sido para prevenir la caries en humanos provocada por *Streptococcus mutans* (Hatta, H. et al. 1997. *Passive*  
15            *immunization Against Dental Plaque Formation in Humans: Effect of a Mouth Rinse containing Egg Yolk Antibodies (IgY) Specific to Streptococcus mutans. Caries.Res.*31:268-274).

            En el caso de las enfermedades en animales antes  
20            mencionadas, a lo largo del tiempo se han desarrollado numerosas medidas de control y prevención debido a la extensión y repercusión económica de dichas enfermedades. Entre las estrategias para combatirlas se encuentran las vacunas inactivadas y las vacunas a virus vivo. Sin  
25            embargo, ninguna de estas estrategias ha sido 100% eficaz.

            En el caso específico de los virus de RNA como el virus del PRRS o el virus de PED la falta de control se debe en gran parte a su alto índice de mutación. Esta es  
30            una característica en común entre los virus de RNA a consecuencia de la falta de actividad de *proofreading* de la RNA polimerasa. Entonces, esta falla junto con la rápida cinética de replicación del virus incrementan el

riego de mutación y surgimiento de cuasiespecies  
 (Manreetpal Singh Brar, Mang Shi, Raymond Kin-Hi Hui and  
 Frederick Chi-Ching (2014) Leung mail Genomic Evolution  
 of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus  
 5 (PRRSV) Isolates Revealed by Deep Sequencing. PLOS one).  
 Se ha reportado que la variación genética del virus de  
 PRRS es entre 0.48 y 1.32 % (Murtaugh M., (2012) Use and  
 interpretation of sequencing inf PRRSV control programs.  
 Allen D. Leman Swaine Conference. Veterinary Continuing  
 10 Education). Estas características del virus de PRRS  
 explican la inadecuada protección que se ha obtenido por  
 vacunas.

Una de las estrategias que se ha utilizado para  
 prevenir las enfermedades ocasionadas por estos virus son  
 15 las autovacunas, lo cual implica desarrollar vacunas no  
 sólo por país, sino por regiones, de lo contrario la  
 prevención por estos medios resulta ser insuficiente.

También se ha observado que en el caso del virus  
 causante del PRRS se logra neutralizar utilizando  
 20 inmunoglobulinas provenientes del suero de mamífero (US  
 5,846,805). Estos resultados enseñan que las  
 inmunoglobulinas son una alternativa para el tratamiento  
 de virus de RNA. Sin embargo, el problema con esta  
 alternativa es que los anticuerpos obtenidos de esta  
 25 manera son inviables.

La aplicación de inmunoglobulinas obtenidas a partir  
 de la yema de huevo (IgY) ya ha sido utilizada en  
 diversas aplicaciones en salud y profilaxis animal e  
 incluso en humanos. Las investigaciones realizadas por  
 30 Akita y Nakai (Akita, E., Nakai, S. (2000). *Egg nutrition  
 and biotechnology*, CAB International, New York, p.301),  
 demuestran que la función protectora de IgY contra  
 agentes infecciosos es atribuida principalmente por su

capacidad para prevenir la colonización o neutralizar las toxinas.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

5

Con el fin de alcanzar el objetivo de la presente invención, se evaluó experimentalmente la capacidad de una formulación que comprende inmunoglobulinas IgY concentradas y específicas para neutralizar al virus de PRRS, obtenida a partir de yema de huevo proveniente de gallinas previamente hiperinmunizadas.

Con una formulación de vacuna emulsionada se inmuniza a las aves de postura para obtener, a través de la yema de huevo, inmunoglobulinas IgY neutralizantes contra agentes infecciosos o toxinas, las cuales tras un método de extracción, deslipidización y concentración, donde se utilizan cantidades mínimas, se obtiene finalmente una formulación concentrada de dichas inmunoglobulinas IgY capaces de lograr una protección inesperada de hasta aproximadamente el 100%, además de regularizar el nivel de S/P en granjas ya infectadas.

La invención presenta la ventaja adicional de estabilizar a la piara, parvada, rebaño o bancos, reduciendo la circulación de los agentes infecciosos. Así también, usando la formulación concentrada de origen aviar de la invención como programa, se reduce la generación de subpoblaciones a la maternidad y al destete se logra retrasar la seroconversión de los animales de engorda.

A la fecha las inmunoglobulinas evaluadas han provenido de suero de mamífero y solamente han sido probadas por ejemplo en un modelo experimental desafiando

con la misma cepa del virus con el que se vacunaron. Es decir, a diferencia de la presente invención, a las vacunas del estado de la técnica se les ha probado únicamente la protección homóloga (WO 02/067985).

5        Además, la formulación concentrada de origen aviar de la invención, que comprende inmunoglobulinas IgY concentradas puede utilizarse en cualquier etapa productiva de los animales sin generar efectos adversos o indeseables.

10        La formulación concentrada de origen aviar de la invención se encuentra altamente concentrada y protege contra desafíos más altos del agente infeccioso o toxinas. Se cuenta con evidencias de protección contra desafíos de 10 a la siete (10,000,000), lo cual resulta  
15        muy superior a lo ya conocido en el estado de la técnica (WO 2007/061281 A2).

          Adicionalmente a lo anterior, mediante los procesos de la presente invención se logra concentrar las inmunoglobulinas (IgY) neutralizantes contra los agentes  
20        infecciosos circulantes de campo o toxinas, de tal manera que se puede formular un concentrado donde se aplica únicamente 1 ml ó 3 ml por dosis, mientras que la aplicación de las vacunas y productos del estado de la técnica, es hasta de 5 ml y más aún hasta 10 ml, e  
25        incluso más de 10 ml (WO 2007/061281 A2).

          La reducción en el volumen de aplicación es beneficiosa en varios aspectos. Primero porque la aplicación se hace sencilla, y segundo porque se reduce costos de producción y tercero, porque el transporte a  
30        diferentes áreas ocupa menor espacio.

          Las dosis de 1 ml o hasta 3 ml que se pueden lograr gracias a la formulación concentrada de inmunoglobulinas (IgY) de la presente invención, según la gravedad,

obviamente, siguen un esquema de inmunización y, aún sin ser propiamente una vacuna, puede funcionar como tal y controlar los animales infectados. La formulación concentrada de origen aviar de la invención entra dentro  
5 de la plataforma de inmunidad pasiva, porque contiene inmunoglobulinas neutralizantes contra agentes infecciosos o toxinas.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

10

La Figura 1 muestra el incremento en el título de inmunoglobulinas después de aplicar el proceso de concentración. Se extrajeron inmunoglobulinas de yema, una parte se cuantificó por el método de MNT y el resto  
15 se sometió al proceso de concentración. El grupo A fue vacunado con 2 vacunas elaboradas con aceite minera cada una de ellas conteniendo 3 cepas del virus de PRRS y aplicadas de maneara alternativa mensualmente. El grupo B fue vacunado con 1 vacuna elaborada con aceite mineral y  
20 chitosan, la cual contiene 6 cepas diferentes del virus de PRRS y fue aplicada mensualmente. El grupo C fue vacunado con una vacuna elaborada con marcol y chitosan, la cual contiene 6 cepas diferentes del virus de PRRS y fue aplicada mensualmente.

25

La Figura 2 muestra la disminución paulatina de los niveles de anticuerpos en las hembras del hato reproductor tras recibir la formulación concentrada.

30

En la figura 3 se muestra el monitoreo de la mortalidad a partir de la semana 3 y hasta la 26. Los grupos que fueron tratados con la formulación de inmunoglobulinas IgY concentrada de origen aviar de la

invención se resaltan en un cuadro azul más intenso (grupos del 07 al 16).

La Figura 4 presenta una gráfica con los porcentajes de mortalidad de cada grupo evaluado, en donde se  
5 destacan aquéllos que fueron tratados con la formulación concentrada de origen aviar de la invención.

### DESCRIPCIÓN DETALLADA

10

#### Proceso de extracción, deslipidización y concentración de inmunoglobulinas IgY.

15 Se realizan los siguientes pasos para realizar la extracción y concentración de inmunoglobulinas IgY neutralizantes de agentes infecciosos o toxinas a partir de la yema de huevo, en aves previamente inmunizadas.

La yema de huevo se diluye 1:4 ó 1:8 (sin la clara)  
20 con azida de sodio al 0.01 % y se almacena en refrigeración por lo menos durante toda el día, preferentemente de 12 a 24 horas. Posteriormente, el sobrenadante se separa y se agrega 1 al 15% de hidroxipropilmetilcelulosaftalato (HPMCP) en proporción  
25 de 0.25 ml por cada 100 ml de yema. Se deja reposar por lo menos 24 horas. La capa de lípidos que se forma en la parte superior de la solución es separada y la parte acuosa se filtra, luego se le adiciona PEG, preferentemente 8000, en una proporción del 5-30% P/V, se  
30 mezcla y se deja reposar al menos durante 4 horas, pero de preferencia se deja toda la noche a 4°C. Después se centrifuga por 20 a 30 minutos y se retira el sobrenadante. La pastilla resultante se solubiliza con

PBS 1X o buffer TRIS, a un volumen equivalente al 10% del volumen original.

5                   Terapias con la formulación concentrada de  
                          inmunoglobulinas IgY de la invención.

La formulación resultante del proceso de extracción, deslipidización y concentración de las inmunoglobulinas  
10 IgY neutralizantes de agentes infecciosos o toxinas, obtenida a partir de la yema de huevo de gallinas previamente hiperinmunizadas, puede comprender: aproximadamente 0.8% a 5% de inmunoglobulinas IgY concentradas contra patógenos o toxinas de la invención,  
15 preferentemente 1% de inmunoglobulinas IgY concentradas, aproximadamente 80% a 90% de agua y aproximadamente 0.001% a 0.03% de conservadores. La dosis de tratamiento de la formulación concentrada de la invención puede ser de 1 ml y de 3 ml como máximo, la cual logra neutralizar  
20 las variedades de campo los agentes infecciosos o toxinas de la invención, ofreciendo inesperadamente una protección de hasta el 100% en animales, además de regularizar el nivel de S/P en granjas ya infectadas, tal como se muestra más adelante.

25

En una modalidad, la presente invención se refiere a un proceso para la extracción y concentración de inmunoglobulinas a partir de yema de huevo de gallinas previamente hiperinmunizadas, caracterizado por los  
30 siguientes pasos:

a) Se diluye la yema 1:4 ó 1:8 (sin la clara) con azida de sodio al 0.01 % y se almacena en refrigeración por lo menos durante 24 horas.

b) Se separa el sobrenadante y se agrega hidroxipropilmetilcelulosaftalato (HPMCP) al 1-15% en proporción de 0.25 ml por cada 100 ml de yema. Se deja reposar por lo menos 24 horas.

5 c) Se separa la capa de lípidos que se forma en la parte superior de la solución y se filtra la parte acuosa.

d) Se adiciona PEG, preferente PEG 8000 en una proporción del 5-30% P/V, se mezcla y se deja reposar al  
10 menos durante 4 a 12 horas a 4°C.

e) Se centrifuga por 20 a 30 minutos y se quita el sobrenadante.

f) La pastilla resultante se solubiliza con PBS 1X o buffer TRIS, a un volumen equivalente al 10% del volumen  
15 original, mantener el pH en 7.

En una modalidad adicional, la presente invención se dirige a una formulación concentrada de inmunoglobulinas IgY de origen aviar obtenida por el proceso para extracción, deslipidización y concentración de  
20 inmunoglobulinas a partir de yema de huevo proveniente de gallinas previamente hiperinmunizadas. Dichas formulaciones concentradas de origen aviar de la invención puede comprender además aproximadamente de 70% a 85% de agua y/o aproximadamente de 0.001% a 0.03% de  
25 conservadores. En particular, la formulación concentrada de inmunoglobulinas IgY está caracterizada porque comprende 0.8% a 5% de inmunoglobulinas IgY concentradas neutralizantes del virus que causa el PRRS.

Además, la presente invención también se refiere  
30 al uso de la formulación concentrada de inmunoglobulinas IgY de origen aviar de la invención en la elaboración de un medicamento para el tratamiento del Síndrome Respiratorio y Reproductivo (PRRS) en porcinos, la

Diarrea Epidémica Porcina (DEP) en porcinos, el síndrome de la mancha blanca en camarón, mastitis bovina, las infecciones producidas por *Actinobacillus pleuropneumoniae* en porcinos, la coccidiosis en aves y  
5 las intoxicaciones provocadas por tricotecenos, particularmente las provocadas por tricotecenos como 4-deoxinivalenol (DON), en donde el medicamento puede ser administrable por la vía de administración parenteral, preferentemente por la vía intramuscular o es  
10 administrable vía oral y con el alimento, según sea el caso.

Los siguientes ejemplos muestran los resultados de la aplicación de la formulación concentrada de la invención en porcinos. No obstante, dichos ejemplos son  
15 proporcionados con el fin de ilustración y no de limitación.

### **EJEMPLO 1**

En este ejemplo se analizó el producto terminado de  
20 inmunoglobulinas. Se inmunizaron aves de postura, se cosecharon los huevos de las aves inmunizadas y las yemas de huevo se sometieron a un proceso de extracción y concentración de inmunoglobulinas, tal como antes fue descrito. Nuestros resultados indican que el proceso de  
25 concentración, descrito anteriormente, incrementa los títulos de anticuerpos respecto a lo obtenido sin dicho proceso. El incremento en la concentración va de 1.6 a 2.1 veces (figura 1). Como resultado de este experimento, se encontró que el rendimiento de inmunoglobulinas IgY  
30 neutralizantes de virus del PRRS es adecuado para llevar a cabo un tratamiento efectivo en porcinos que padecen del Síndrome Respiratorio y Reproductivo, utilizando un volumen menor para alcanzar la protección.

**EJEMPLO 2****Aplicación de inmunoglobulinas (tipo IgY) en las hembras del hato reproductor.**

5

Se realizó un seguimiento longitudinal de la presencia de anticuerpos contra el virus de PRRS mediante la evaluación de sueros de 30 cerdas seleccionadas aleatoriamente a partir de una granja de explotación de ciclo completo con 500 cerdas, situada en el occidente de la República Mexicana. Esta granja produce lechones negativos al virus de PRRS, que se contaminan a lo largo de la vida productiva.

El hato reproductor fue tratado con una aplicación de 1 ml de la formulación de inmunoglobulinas IgY concentrada de origen aviar de la invención, por vía intramuscular cada 4 meses y una repetición 15 días después. Posteriormente se realizaron aplicaciones semanales a los 70 y 85 días de gestación.

Las cerdas del pie de cría fueron monitoreadas de forma bimestral para determinar el movimiento viral. Se tomaron muestras de sangre de los mismos 30 animales seleccionados inicialmente. Para la evaluación, se utilizó la técnica de ELISA (IDEXX, PRRS X3), que es una manera indirecta para medir la efectividad del tratamiento con IgY concentradas. El kit mide los niveles de anticuerpos del tipo IgG que genera el cerdo en respuesta a una viremia. Por lo tanto, si el cerdo está infectado producirá anticuerpos del tipo IgG como respuesta y se obtendrán valores de S/P por arriba del punto de corte, pero si no hay viremia el kit arrojará valores S/P inferiores al punto de corte. El punto de corte de la ELISA fue de 0.4 S/P.

En la figura 2 se muestra que el tratamiento aplicado al hato reduce los niveles de anticuerpos de manera paulatina a medida que se realiza el monitoreo bimestral y por ende se demuestra que el virus de PRRS fue neutralizado por las inmunoglobulinas aplicadas (del tipo IgY), limitando de esta manera la infección. Es importante señalar que sorpresivamente nuestro producto neutralizó al virus de tal manera que al cabo de 6 meses ya no se registró una reinfección del virus de PRRS. Esto mismo se prueba porque se registró una diferencia sustancial en los parámetros productivos de granjas negativas y positivas.

### **EJEMPLO 3**

15

#### **Aplicación de inmunoglobulinas (IgY) concentradas en lechones**

En el presente ejemplo se muestran los resultados de evaluación de disminución de la viremia en lechones clínicamente afectados por el virus de PRRS. Los lechones no presentaron viremia durante la etapa de maternidad (primeras 3 semanas). Sin embargo, hubo evidencia clínica de viremia alrededor de las 6-8 semanas de edad. Esto se comprobó mediante la técnica de PCR en tiempo real, en donde se generaron 5 pools de sueros de animales virémicos; cada pool integrado por sueros de 5 porcinos diferentes (un total de 25 porcinos evaluados). Como se observa en la tabla, la carga viral alcanzó títulos entre

30  $6.16 \times 10^5$  y  $2.24 \times 10^7$ .

| Identificación | Carga Viral<br>Inicial | Carga viral después del<br>Tratamiento |
|----------------|------------------------|----------------------------------------|
| Destete 6      | $6.16 \times 10^5$     | NEGATIVO                               |
| Destete 6      | $4.98 \times 10^6$     | NEGATIVO                               |
| Destete 7-8    | $5.54 \times 10^4$     | NEGATIVO                               |
| Destete 7-8    | $2.24 \times 10^7$     | NEGATIVO                               |
| Destete 7-8    | $1.21 \times 10^7$     | NEGATIVO                               |

Una vez que se confirmó la viremia, se les aplicó un tratamiento con la formulación concentrada de origen aviar de la invención. Se aplicó una dosis de 3 mL por vía intramuscular. Para evaluar la eficacia del tratamiento, se observaron los datos clínicos y además se cuantificó la cantidad de virus circulante en los porcinos.

Los resultados del monitoreo a los 10 días posteriores a la aplicación de la formulación de inmunoglobulinas IgY concentrada de origen aviar de la invención evidenció que el 100% de las muestras fueron negativas a la presencia de material genético del virus PRRS en suero.

Con los resultados obtenidos, se demuestra que la aplicación de un programa con inmunoglobulinas en el pie de cría evita la circulación viral y puede neutralizar la viremia en lechones de destete con cargas de  $10^7$  partículas virales por mL.

20

#### EJEMPLO 4

**El uso de inmunoglobulinas IgY concentradas reduce la mortalidad de lechones**

25

La formulación de inmunoglobulinas IgY concentrada de origen aviar de la invención fue aplicada a porcinos destetados y destinados para engorda. Durante todo el tiempo de producción se registró la mortalidad bajo  
5 diferentes sistemas de tratamiento.

La granja en estudio se ubica en la región centro occidente de la república mexicana y con 1100 cerdas en su hato reproductor y una producción semanal de 500 lechones. La granja tiene antecedentes de infección  
10 endémica de PRRS, aun cuando se han implementado varias estrategias de control. Se tiene un sistema de autoreemplazo, en el cual se considera la introducción de cerdas cada 4 meses. En el pie de cría se incluye la aplicación de la vacuna a virus vivo modificado contra  
15 PRRS cada 3 meses.

En el presente ejemplo se hizo un monitoreo semanal y se calculó el porcentaje de mortalidad tanto en el destete (semanas 3 a 9) como en el periodo de engorda (semana 10 a 26).

20 Se compararon dos tratamientos. Uno basado en vacuna viva y otro con la formulación de inmunoglobulinas IgY concentrada de origen aviar de la invención, además también se consideró un bloque control sin tratamiento. Cada tratamiento estuvo integrado por diferentes grupos  
25 que fueron evaluados de manera independiente: los grupos del 01 al 06 corresponden a lechones tratados de forma convencional (vacuna viva) y los grupos del 07 al 16 fueron los que recibieron dos dosis de la formulación de inmunoglobulinas IgY concentrada de origen aviar de la  
30 invención, en tanto los grupos 17, 18 y 19 no fueron tratados.

| <b>Tipo de tratamiento</b>                                                                      | <b>Descripción del tratamiento</b>                               | <b>Grupos que recibieron el tratamiento</b> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| <b>Vacuna a virus vivo modificado</b>                                                           | Aplicación de la vacuna a los 21 días de edad y 3 meses.         | 6, Del 01 al 06                             |
| <b>Inmunoglobulinas Altamente Concentradas de Origen Aviar específicas para PRRS (tipo IgY)</b> | Dos aplicaciones de 3 ml c/u, semana 1 y 10 después del destete. | 10, Del 07 al 16                            |
| <b>Control sin tratamiento</b>                                                                  | Sin tratamiento                                                  | 3, Del 17 al 19                             |

En la figura 3 se muestra el monitoreo de la mortalidad a partir de la semana 3 y hasta la 26. Los grupos que fueron tratados con la formulación de inmunoglobulinas IgY concentrada de origen aviar de la invención se resaltan en un cuadro azul más intenso (grupos del 07 al 16).

El porcentaje de mortalidad promedio de los grupos no tratados fue el más alto (25.06%), en seguida se ubica a los grupos que recibieron el tratamiento convencional (21.2% en promedio) y el mejor tratamiento fue el de la formulación de inmunoglobulinas IgY concentrada de origen aviar de nuestra invención, donde se obtuvo un porcentaje promedio de mortalidad del 10.27%. Es decir, que con el uso de las inmunoglobulinas IgY se alcanza una supervivencia de casi el 90% de los animales tratados que representa 10% más de lo alcanzado por el método de vacunación.

En la figura 4 se presenta una gráfica de los porcentajes de mortalidad acumulada de cada grupo

evaluado, en donde se destacan aquéllos que fueron tratados con la formulación concentrada de origen aviar de la invención.

Los resultados del uso de inmunoglobulinas del tipo IgY concentradas muestran una reducción significativa en los porcentajes de mortalidad asociados al virus de PRRS. Aún más, se observó que el estado de salud y productividad de estos animales también mejoró, a diferencia de los grupos que recibieron la vacuna. Es importante señalar que esta es la primera vez que se evidencia el uso de inmunoglobulinas aviares para el tratamiento en lechones.

Estos resultados son muy significativos, pues el programa con la formulación de inmunoglobulinas IgY concentrada de origen aviar de la invención en lechones no sólo disminuye el porcentaje de mortalidad, sino que además brinda la posibilidad de obtener otras mejoras en los parámetros productivos.

Por lo anterior, se apreciará que, aunque las modalidades específicas de la invención se han descrito en la presente para propósitos de ilustración, pueden hacerse varias modificaciones sin desviarse de la naturaleza y alcance de la invención. En consecuencia, la invención no está limitada excepto por las reivindicaciones anexas.

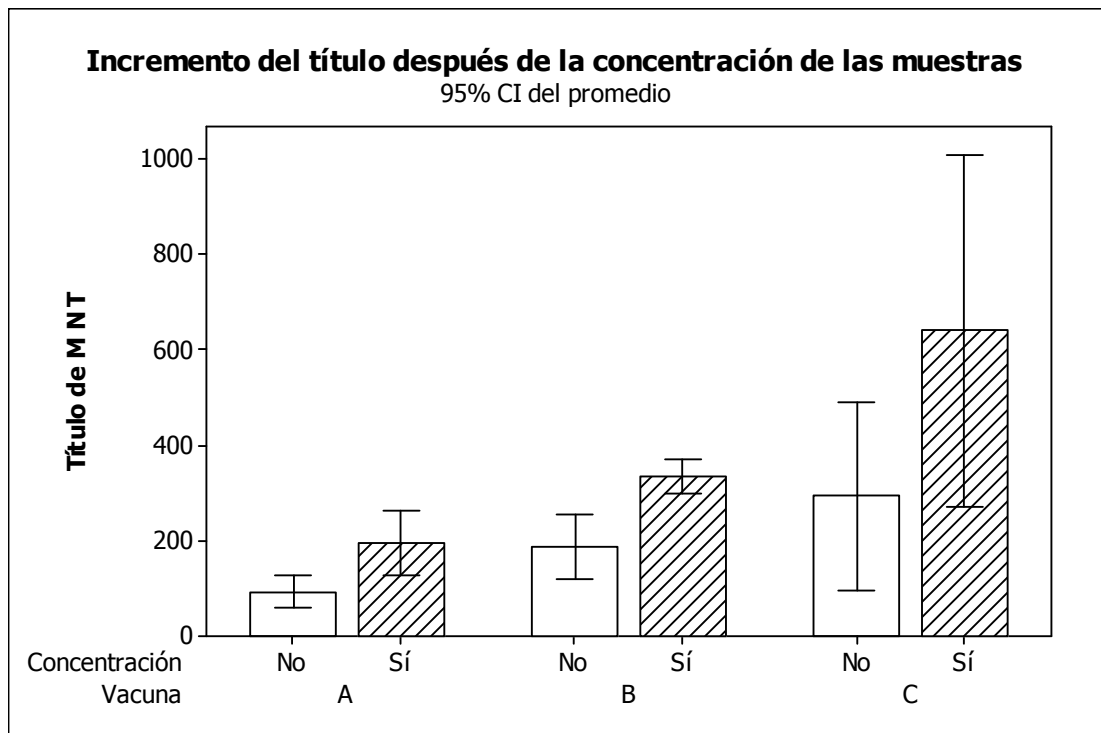


Figura 1

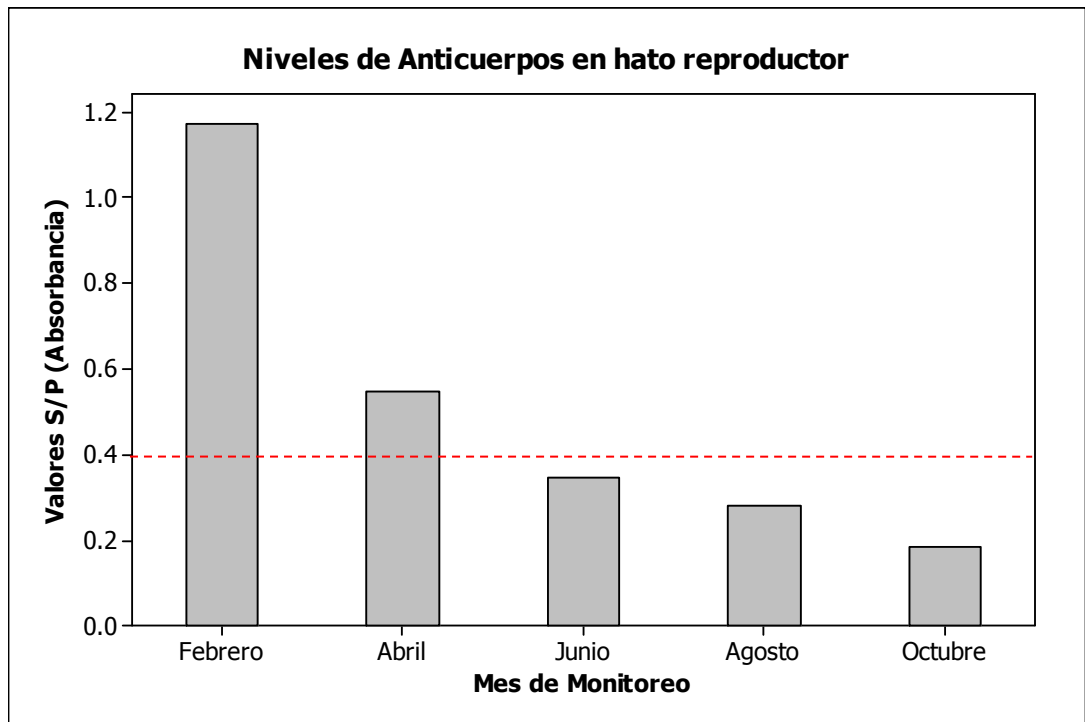


Figura 2

| MORTALIDAD POR GRUPO |        |         |   |    |    |    |    |    |    |         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |       |     |       |     |     |      |
|----------------------|--------|---------|---|----|----|----|----|----|----|---------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-------|-----|-------|-----|-----|------|
|                      |        | DESTETE |   |    |    |    |    |    |    | ENGORDA |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | TOTAL |     |       |     |     |      |
| DESTETADOS           | GRUPOS | 3       | 4 | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 | 11      | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | DEST  | ENG | TOTAL | %   |     |      |
| 456                  | GPO 01 | 2       | 3 | 2  | 5  | 14 | 9  | 5  | 8  | 7       | 5  | 3  | 3  | 1  | 2  | 0  | 1  | 1  | 0  | 0  | 0  | 1  | 0  | 1  | 0  | 40    | 9%  | 33    | 7%  | 73  | 16.0 |
| 443                  | GPO 02 | 1       | 2 | 3  | 2  | 4  | 6  | 7  | 1  | 6       | 2  | 0  | 1  | 1  | 4  | 1  | 4  | 5  | 2  | 1  | 2  | 5  | 4  | 10 | 4  | 25    | 6%  | 53    | 12% | 78  | 17.6 |
| 413                  | GPO 03 | 1       | 2 | 2  | 6  | 11 | 14 | 5  | 3  | 9       | 2  | 0  | 1  | 0  | 0  | 0  | 0  | 3  | 0  | 2  | 0  | 3  | 0  | 0  | 2  | 41    | 10% | 25    | 6%  | 66  | 16.0 |
| 442                  | GPO 04 | 0       | 0 | 1  | 21 | 14 | 34 | 11 | 1  | 4       | 2  | 3  | 0  | 1  | 1  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 1  | 0  | 1  | 0  | 0  | 81    | 18% | 15    | 3%  | 96  | 21.7 |
| 390                  | GPO 05 | 0       | 1 | 2  | 22 | 23 | 15 | 16 | 9  | 12      | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 1  | 0  | 1  | 1  | 0  | 4  | 1  | 0  | 2  | 4  | 79    | 20% | 35    | 9%  | 124 | 31.8 |
| 373                  | GPO 06 | 0       | 1 | 4  | 14 | 10 | 15 | 13 | 8  | 3       | 3  | 4  | 4  | 0  | 0  | 0  | 2  | 3  | 0  | 0  | 1  | 0  | 0  | 0  | 0  | 57    | 15% | 28    | 8%  | 90  | 24.1 |
| 422                  | GPO 07 | 1       | 1 | 6  | 9  | 12 | 9  | 3  | 3  | 4       | 2  | 3  | 3  | 2  | 2  | 0  | 4  | 0  | 0  | 1  | 1  | 0  | 0  | 3  | 0  | 41    | 10% | 28    | 7%  | 69  | 16.4 |
| 423                  | GPO 08 | 1       | 2 | 2  | 1  | 10 | 4  | 2  | 3  | 2       | 3  | 4  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 1  | 0  | 1  | 0  | 0  | 2  | 1  | 0  | 22    | 5%  | 17    | 4%  | 39  | 9.2  |
| 458                  | GPO 09 | 0       | 2 | 1  | 3  | 2  | 1  | 1  | 10 | 11      | 5  | 7  | 1  | 1  | 3  | 1  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 2  | 1  | 0  | 2  | 10    | 2%  | 44    | 10% | 54  | 11.8 |
| 405                  | GPO 10 | 1       | 0 | 0  | 2  | 3  | 5  | 7  | 1  | 4       | 13 | 4  | 3  | 2  | 2  | 1  | 0  | 2  | 0  | 0  | 0  | 1  | 0  | 2  | 0  | 18    | 4%  | 35    | 9%  | 53  | 13.1 |
| 427                  | GPO 11 | 0       | 2 | 0  | 2  | 4  | 1  | 1  | 0  | 6       | 4  | 3  | 1  | 1  | 1  | 0  | 0  | 1  | 1  | 0  | 0  | 0  | 2  | 0  | 0  | 10    | 2%  | 20    | 5%  | 30  | 7.0  |
| 453                  | GPO 12 | 1       | 1 | 0  | 2  | 1  | 1  | 2  | 7  | 7       | 6  | 0  | 1  | 1  | 5  | 4  | 0  | 1  | 1  | 0  | 2  | 2  | 1  | 0  | 0  | 8     | 2%  | 38    | 8%  | 46  | 10.2 |
| 490                  | GPO 13 | 1       | 0 | 2  | 4  | 3  | 0  | 6  | 5  | 3       | 0  | 0  | 3  | 3  | 6  | 1  | 1  | 0  | 0  | 1  | 0  | 0  | 0  | 1  | 0  | 16    | 3%  | 24    | 5%  | 40  | 8.2  |
| 472                  | GPO 14 | 2       | 1 | 0  | 7  | 1  | 9  | 5  | 2  | 3       | 1  | 3  | 4  | 2  | 2  | 0  | 1  | 1  | 1  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 25    | 5%  | 21    | 4%  | 46  | 9.7  |
| 699                  | GPO 15 | 0       | 5 | 2  | 9  | 7  | 8  | 9  | 4  | 1       | 3  | 2  | 2  | 0  | 0  | 1  | 0  | 2  | 2  | 0  | 0  | 0  | 0  | 2  | 1  | 40    | 6%  | 20    | 3%  | 60  | 8.6  |
| 495                  | GPO 16 | 2       | 4 | 3  | 0  | 0  | 7  | 6  | 5  | 5       | 5  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 3  | 0  | 1  | 1  | 0  | 0  | 0  | 0  | 22    | 4%  | 20    | 4%  | 42  | 8.5  |
| 465                  | GPO 17 | 0       | 9 | 13 | 20 | 8  | 12 | 13 | 8  | 9       | 1  | 2  | 0  | 4  | 0  | 1  | 0  | 2  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 75    | 16% | 27    | 6%  | 102 | 21.9 |
| 419                  | GPO 18 | 1       | 0 | 3  | 19 | 19 | 30 | 12 | 5  | 3       | 12 | 4  | 3  | 4  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 84    | 20% | 31    | 7%  | 115 | 27.4 |
| 432                  | GPO 19 | 9       | 5 | 10 | 15 | 9  | 18 | 10 | 16 | 6       | 9  | 5  | 5  | 4  | 3  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 1  | 76    | 18% | 49    | 11% | 125 | 28.9 |

Figura 3

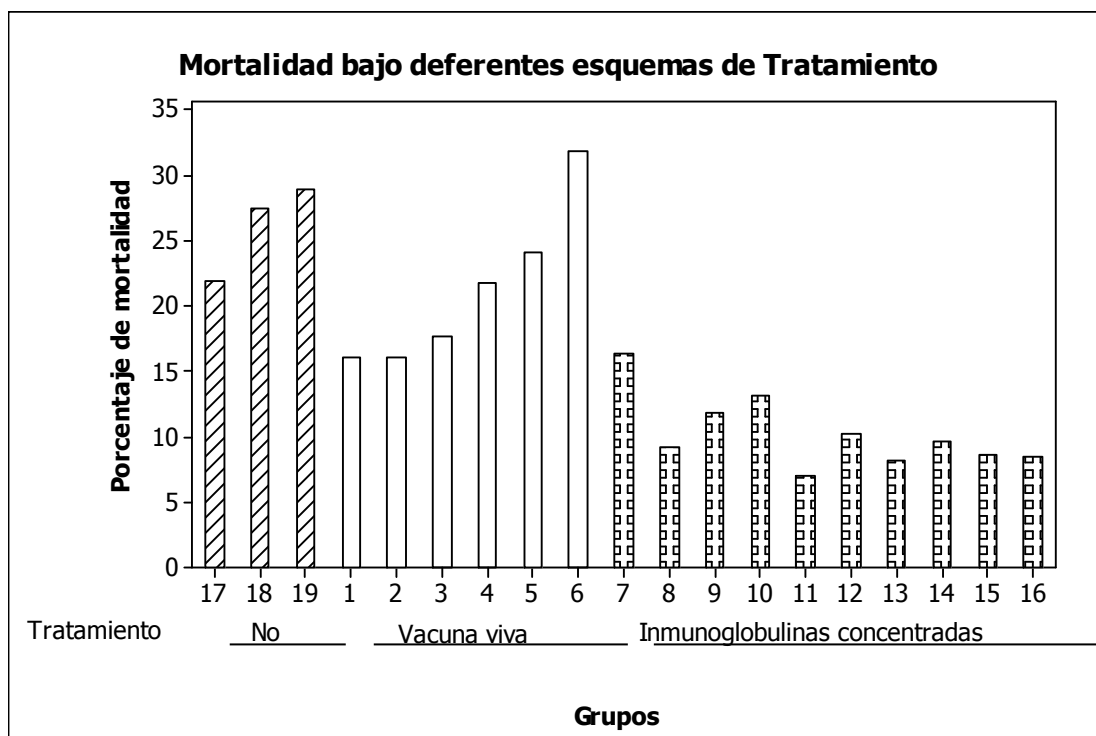


Figura 4

Señores  
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. \_\_\_\_\_ S. \_\_\_\_\_ D. \_\_\_\_\_

**Re: Expediente N°. NC2019/0001645**  
**Solicitud de Patente divisional de la solicitud de patente NC2017/0002614**  
**Título: PROCESOS PARA LA EXTRACCIÓN, DESLIPIDIZACIÓN Y CONCENTRACIÓN**  
**DE INMUNOGLOBULINAS IgY Y FORMULACIONES CONCENTRADAS DE LAS**  
**MISMAS**  
**Solicitante: INVESTIGACIÓN APLICADA S.A. DE C.V.**  
**Nuestra Re: P2019/000023**

**RESPUESTA AL OFICIO No.3749 NOTIFICADO POR CORREO CERTIFICADO DE FECHA 4 DE**  
**JUNIO DE 2019**  
**(Artículo 17 del Código de Procedimiento Administrativo y Contencioso Administrativo))**

J. IAN RAISBECK, mayor de edad y vecino de Bogotá, D.C., identificado tal como aparece al pie de mi firma, y como apoderado de la sociedad solicitante en la radicación de la presente solicitud de patente, me permito manifestar lo siguiente en respuesta al oficio No. 3749, dentro del plazo establecido para este efecto en el artículo 17 del Código de Procedimiento Administrativo y Contencioso Administrativo:

1. a. Ese Despacho requiere ajustar la descripción de la presente solicitud divisional con el fin de retirar los apartados que se relacionan con las formulaciones y permanezcan los ejemplos y modalidades que se refieren al proceso para la extracción, deslipidización y concentración de inmunoglobulinas, reclamado dentro de la solicitud divisional.

b. En atención a esta observación, presento con este memorial un nuevo texto descriptivo ajustado según los requerimientos de ese Despacho a la materia objeto de la solicitud divisional. Asimismo, presento nuevo set de figuras del cual se retiran las figuras relativas a los efectos de la vacuna emulsionada que ahora es objeto de la solicitud madre;

así entonces, las nuevas figuras 1 a 4 de la presente solicitud divisional corresponden a las figuras 3 a 6 inicialmente presentadas.

Cabe aclarar que la presente solicitud divisional contiene 6 reivindicaciones que reclaman i) un proceso para la extracción, deslipidización y concentración de inmunoglobulinas a partir de yema de huevo proveniente de gallinas hiperinmunizadas con una formulación de vacuna emulsionada, y ii) una formulación concentrada de inmunoglobulinas IgY de origen aviar. Esta materia corresponde a las Reivindicaciones anteriores 18 a 34, clasificadas por el Examinador como segundo grupo inventivo (Grupo II) en el Oficio No. 13877, emitido dentro de la solicitud madre No. NC2017/0002614. Sobre esta base, la Descripción que presento en esta oportunidad, limita la divulgación a los ejemplos y modalidades correspondientes a las modalidades reclamadas en la solicitud divisional.

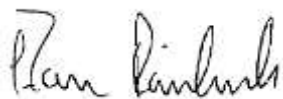
2. a. Ese Despacho menciona que el capítulo reivindicatorio de la solicitud divisional no cumple con lo requerido durante el examen de patentabilidad, por cuanto la Reivindicación 1 reclama la formulación de vacuna emulsionada del grupo inventivo I.

b. Informo a ese Despacho que, por un error involuntario, en la Reivindicación 1 de la solicitud divisional no se retiró la referencia a la vacuna emulsionada que aparecía en el preámbulo de la Reivindicación 18 de la solicitud inicialmente presentada. Con al ánimo de corregir este error de forma, presento nuevamente el pliego Reivindicatorio retirando la mencionada referencia del preámbulo de la Reivindicación 1. Cabe mencionar que esta corrección es meramente formal y no incorpora materia que no fuese sometida a consideración de ese Despacho junto con la solicitud divisional.

Presento junto con este memorial comprobante de pago de la tasa de modificación voluntaria, el cual se presentó el 4 de julio de 2019 a través de la plataforma SIPI. En el evento que con la respuesta al Auto No. 3749, emitido con fundamento en el Artículo 17 de CPACA, no aplique el pago de la tasa de modificación voluntaria, respetuosamente solicito se me informe para adelantar el desglose correspondiente.

Habiendo dado respuesta completa al requerimiento de manera que se cumplen las exigencias de ese Despacho, respetuosamente solicito se proceda a realizar el estudio de patentabilidad a la materia de la presente solicitud divisional, cuya tasa fue aportada por el solicitante al momento de dividir la solicitud.

Atentamente,



J. IAN RAISBECK

C.C. 79'376.996 de Bogotá D.C.

T.P. 135.799 del C. S. de la J.

**Anexos:**

- Descripción ajustada al Grupo inventivo II
- Reivindicaciones con corrección de error de forma
- Figuras de solicitud divisional
- Comprobante de pago por modificación voluntaria



# SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT: 800.176.089-2

## COMPROBANTE DE RECAUDO SISTEMA SIPI

**Radicado: NC2019/0001645**  
**Recibo: 19-54918**  
**Fecha: 04/07/2019**

**J. IAN RAISBECK**  
**CC: 79.376.996**  
**Pago PSE No: 302912**  
**CUS: 465907201**

NC Divisional de Patente/Modelo  
Solicitado en Patente PCT NC2017/0002614

### Detalle del pago

| Id.   | Rentístico  | Concepto y Servicio                                               | Cant. | Val. Unit. | Subtotal   |
|-------|-------------|-------------------------------------------------------------------|-------|------------|------------|
| 1     | 50005-01-03 | N.CREACION CORRECCION SOLICITUD EN TRAMITE / MODIFICACION (LINEA) | 1     | \$ 161,500 | \$ 161,500 |
| TOTAL |             |                                                                   |       |            | \$ 161,500 |

## **REIVINDICACIONES SOLICITUD DIVISIONAL**

1. Un proceso para la extracción, deslipidización y concentración de inmunoglobulinas a partir de yema de huevo proveniente de gallinas hiperinmunizadas con una formulación de vacuna emulsionada, caracterizado porque comprende los siguientes pasos:

a) Se diluye la yema 1:4 ó 1:8 (sin la clara) con azida de sodio al 0.01 % y se almacena en refrigeración de 12 a 24 horas.

b) Se separa el sobrenadante y se agrega hidroxipropilmetilcelulosaftalato (HPMCP) del 1 al 15% en proporción de 0.25 ml por cada 100 ml de yema. Se deja reposar 24 horas.

c) Se separa la capa de lípidos que se forma en la parte superior de la solución y se filtra la parte acuosa.

d) Se adiciona PEG en una proporción del 5 al 30% P/V, se mezcla y se deja reposar durante 4 a 12 horas a 4°C.

e) Se centrifuga por 20 a 30 minutos y se quita el sobrenadante.

f) La pastilla resultante se solubiliza con PBS o buffer TRIS, a un volumen equivalente al 10% del volumen original.

2. El proceso para la extracción, deslipidización y concentración de inmunoglobulinas de conformidad con la reivindicación 1, en donde la yema 1:4 ó 1:8 (sin la clara) diluida con azida de sodio al 0.01% en el paso (a), se almacena en refrigeración de 12 a 24 horas.

3. El proceso para la extracción, deslipidización y concentración de inmunoglobulinas de conformidad con la reivindicación 1, en donde en el paso (d) se adiciona PEG8000 en una proporción del 5 al 30% P/V.

4. Una formulación concentrada de inmunoglobulinas IgY de origen aviar, caracterizada porque comprende de 0.8% a 5% de inmunoglobulinas IgY neutralizantes del virus que causa el PRRS.

5. La formulación concentrada de inmunoglobulinas IgY de origen aviar de conformidad con la reivindicación 4, caracterizada porque es una solución acuosa.

6. La formulación concentrada de inmunoglobulinas IgY de origen aviar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5, caracterizada porque además comprende de 0.001% a 0.03% de conservadores.