Señores

Superintendencia de industria y comercio

E S D

Respuesta al examen de fondo solicitud NC2018/0013844

Nosotros UNIVERSIDAD DE PAMPLONA, LUIS FERNANDO ARBELAEZ RAMIREZ, damos respuesta a las objeciones presentadas en el expediente NC2018/0013844 en el cual se señalan afectaciones al nivel inventivo. Exponemos los siguientes argumentos:

1. Sobre el error material en las reivindicaciones, el proceso usa las dos columnas como se menciona en el proceso de la descripción, primero se corre la columna de intercambio iónico y luego se corre la columna de exclusión. La de exclusión es cualquiera estándar del mercado, bajo el proceso bien conocido de hacer correr el eluente hasta que ya no se tenga señales de concentración de proteínas.

Texto donde se menciona:

En una columna de cromatografía con DEAE-Sepharose FF (propia para **intercambio anicónico**, también se pueden usar aminopersulfato o polietilenglicol), previamente desgasificado, se equilibra la columna con la solución tampon de acetato pH entre 5 a 6.9 a una velocidad de flujo de 1 a 10 ml / min.

El sobrenadante concentrado se hace correr en la columna con el flujo anterior. En este punto muchas proteínas junto con la albumina están capturadas en la columna, el eluente sigue siendo el buffer acetato entre 5 a 6.9.

La solucion de lavado es la misma solucion tampon acetato a 5 a 6.9. y la de elusion es acetato pH 3 a 4.9

Para comenzar la **exclusión elusion** de la albumina se corre una solucion tampon buffer de acetato a 3 a 4.9 que eluira exclusivamente la albumina, el saliente de esta elusión se etiquetara como albumina colectada.

El punto de inicio y el punto final de la elusión se determinan por conductividad eléctrica de las soluciones tampon los buffer, solo cuando la conductividad eléctrica sea igual al amortiguador de entrada como al amortiguador de salida, se entenderá que ya no hay proteína

Texto como se modifica:

En una columna de cromatografía con DEAE-Sepharose FF (propia para intercambio anicónico), previamente desgasificado, se equilibra la columna con la solución tampon de acetato pH entre 5 a 6.9 a una velocidad de flujo de 1 a 10 ml / min.

El sobrenadante concentrado se hace correr en la columna con el flujo anterior. En este punto proteínas ruido restantes junto con la albumina quedan capturadas en la masa DEAE de la columna, el eluente sigue siendo el la solucion tampon acetato entre 5 a 6.9. La solución de lavado es la misma solución tampón acetato a 5 a 6.9. y la de elusión es acetato pH 3 a 4.9

El punto de inicio y el punto final de la elusión se determinan por conductividad eléctrica de las soluciones tampón, solo cuando la conductividad eléctrica sea igual al amortiguador de entrada como al amortiguador de salida, se entenderá que ya no hay proteína.

Para comenzar la exclusión elusión, La albumina se eluye con una solucion tampon de acetato a 3 a 4.9, eluira primero la albumina y luego el restante de proteinas ruido, el saliente de esta elusión de la albumina se etiquetara como albumina colectada.

Finalmente otras trazas de proteínas son eludidas del gel exclusión con la solución tampón pH 4.0.

De esta manera lo que queremos señalar es que con el solo uso de una sola columna cromatográfica de intercambio ionico y una de exclusion bajo los pasos señalados se puede obtener una pureza tal como las albuminas del mercado.

La tecnología de Tanaka (D1) menciona dentro de sus materiales al menos 8 columnas cromatografías, como se ve a continuación

Material and Methods

Production equipment

Pharmacia liquid chromatography equipment was employed using a Bio Process controller (Uppsala, Sweden). The following columns were used: step 1, desalting, gel filtration on Sephadex G-25, 1 column, model BPSS 400/600 (60 cm in height by 40 cm in diameter). Step 2, anion-exchange DEAE-Sepharose FF, 1 column, model PS-370/15 (15 cm in height and 37 cm in diameter). Step 3, affinity gel Arginine Sepharose 4B (40%) + anion-exchange DEAE-Sepharose FF (60%), 1 column, model PS-370/15 (15 cm in height by 37 cm in diameter) and cation-exchange CM-Sepharose FF, 1 column, model Index 200/500 (15 cm in height and 20 cm in diameter). Step 4, cation-exchange CM-Sepharose FF, 1 column, model Index 200/500. Step 5, gel filtration on Sephacryl S-300, 1 column, model BPG 200/950 (95 cm in height and 20 cm in diameter).

Other instruments used were a tangential flow ultrafiltration Pellicon cassette system and a filtration system with a stainless steel sanitary filter holder, 293 mm in diameter (Millipore, Bedford, MA, USA), and a continuous flow centrifuge model AG BKA-6 (Westphalia Separator, Oeld, Germany).

Details about the buffer solutions are given in Table 1.

Se hace esta claridad en la reivindicación 1, paso q.

2. Por otra parte debo aclarar que el procedimiento en la descripción habla de una doble congelación, esa doble congelación no se mencionó en las reivindicaciones, por lo que se agrega lo relativo al texto de la crio precipitación, se llama así porque justamente este proceso de congelar aumenta considerablemente la cantidad de precipitado a retirar y de esta manera.

Texto referencia en descripción:

Se toman 500 mL de plasma humano, el cual ya está certificado y viene congelado a temperaturas por debajo de 0°C (pueden alcanzar los -100°C), por lo que debe descongelarse entre 0 a 38°C (a temperatura regular humana) y luego se mantienen en hielo durante 10 a 40 min, **para alcanzar una temperatura entre 0** a 10°C, se centrifuga entre 5000 - 15.000 r.p.m. durante 8 a 15 minutos.

Se modifica en reivindicación 1, paso c, para dar claridad.

3. Finalmente se decide tomar el elemento de la reivindicación 7 a la reivindicación 1.

Esperamos que esto sea suficiente para sustentar las objeciones al criterio de nivel inventivo.

LUIS FERNANDO ARBELAEZ RAMIREZ

MÉTODO PARA LA PURIFICACIÓN DE ALBÚMINA HUMANA

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Sector tecnológico de la invención

El presente método de purificación de albumina aporta dentro del sector de la química y la medicina, la albumina humana es para uso en clinicas y hospitales de todo el pais, es de anotar que la Albumina bovina se puede purificar por el mismo metodo y esta es utilizada en todos los laboratorios de investigacion del mundo.

Antecedentes de la invención

La albúmina es la proteína más abundante en el plasma humano. Está constituida por 585 aminoácidos con 17 puentes disulfuro entrecruzados en su molécula y tiene un peso molecular de 67.000 Daltons. Dentro de las principales funciones de la albúmina se encuentra transportar y almacenar una amplia variedad de sustancias de bajo peso molecular como la bilirrubina, el cortisol, las hormonas sexuales, ácidos grasos libres y algunos medicamentos. En los neonatos hiperbilirrubinémicos, la bilirrubina se combina con la albúmina limitando así su ingreso a los tejidos hidrófobos del cerebro, atenuando con ello la toxicidad en los procesos hemolíticos graves que se presentan a esa edad. La mitad del calcio circulante está combinado con la albúmina por lo que la interpretación clínica de la disminución del calcio sérico depende de la concentración de la albúmina. Esto se debe a que la fracción biológicamente activa del calcio es la forma ionizada o libre.

En un accidente, la tasa de remplazo de albumina para 500 ml de sangre perdida a los 3 días, es apenas de 3,6 y 5,2 g/dl; (en condiciones normales la

concentración de proteínas totales oscila entre 6,2 y 7,9 g/dl), a estos niveles bajos de concentración habitualmente se presenta edema. La albúmina ejerce entre el 75% y 85% de la presión oncótica de la sangre que es de 20 mmHg. (equivalente a una concentración de albúmina de 5,2 g/dl).

Para estas condiciones y otras patologías es necesario administrar albumina, la albúmina humana se puede obtener de plasma o suero humano (así como de la placenta humana, en el ámbito industrial se prepara por fraccionamiento de mezclas de plasma obtenido de cientos de donantes sanos. Todas las unidades de plasma utilizadas en el proceso son sometidas individualmente a un despistaje serológico para el antígeno de superficie de la hepatitis B (AgsHB), y anticuerpos para el virus de la hepatitis C (HCV), el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 y 2 (HIV 1 y 2), el T. cruzi (enfermedad de Chagas) y el T. pallidum (Sífilis).

El método de Cohn fue desarrollado en 1940 durante la II Guerra Mundial y consiste en someter el plasma humano, a un proceso de fraccionamiento con etanol frío a diferentes concentraciones y variaciones de temperatura, fuerza iónica y pH para obtener diferentes fracciones o pastas, del suero o plasma humano así:

I. Crioprecipitado, que por purificación posterior permite obtener concentrados de FVIII y Factor von Willebrand (FvW).
II. Fracción I, que por purificación permite obtener concentrados de fibrinógeno.
III. Fracción II + III, que por purificación da lugar a las inmunoglobulinas intramusculares (IgIM) o intravenosas (IgIV). - Fracción IV, que por purificación permite obtener concentrados de antitrombina III y α1-antitripsina.
IV. Fracción V, que por purificación da lugar a las soluciones de albúmina humana.

La albúmina así preparada tiene una pureza del 95%. En los últimos años este procedimiento ha sido mejorado y ha alcanzado una pureza de 99.3% para los monómeros de albúmina, luego de este procedimiento el producto se somete a pasteurización, calentándolo a 60ºC por 10 horas, ya que el fraccionamiento con etanol es de probada actividad viricida y bactericida, y la pasteurización garantiza aún más la seguridad transfusional del producto.

Este procedimiento actualmente es el mas eficiente, pero dispendioso y costoso porque exige de al menos 21 columnas de cromatografía, nuestro método de purificación simplifica el proceso y su cantidad de pasos y solo necesita de dos columna de cromatografía mediante el métodos de intercambio ionico y exclusión.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

El objetivo del presente método es optimizar la precipitación de proteínas ruido antes de la purificación mediante cromatografía, ampliando la capacidad de la columna para secuestrar la albumina en las masas cromatograficas. A continuación se muestran los reactivos usuales y el proceso necesario para tal fin.

Reactivos

I. Ácido Acético
II. Etanol al 95%
III. Acetato pH 4.0, (acetato de sodio , ácido acético).
IV. Solución tampón de acetato pH 5.2.
V. Solución tampón de acetato pH 4.5.
VI. Solución de NaCl.
VII. Solución de NaCl pH 6.0
VIII. Caprilato de sodio solido 0.026592 gramos / gramo de albumina

El nuevo proceso de purificación de albumina se compone de las siguientes operaciones.

CRIO-PRECIPITADO

Se toman 500 mL de plasma humano, el cual ya está certificado y viene congelado a temperaturas por debajo de 0°C (pueden alcanzar los -100°C), por lo que debe descongelarse entre 0 a 38°C (a temperatura regular humana) y luego se mantienen en hielo durante 10 a 40 min, para alcanzar una temperatura entre 0 a 10°C, se centrifuga entre 5000 - 15.000 r.p.m. durante 8 a 15 minutos.

El precipitado lo descartamos y etiquetamos el sobrenadante como crio-sobrenadante.

PRECIPITACION CON ETANOL

El CRIO-SOBRENADANTE debe ajustarse hasta alcanzar un pH de 7 a 9, este ajuste se puede hacer con soluciones tampón, ácidos o bases, según sea el caso de las condiciones iniciales del sobrenadante y se baja la temperatura gradualmente hasta - 5°C.

Se adiciona al plasma etanol al 95% frio (-30°C a 0) hasta completar una relación entre 15 a 25% respecto al sobrenadante, a una velocidad, aproximada de 1 a 10 ml / min, mezclando el plasma continuamente.

La solución plasma / etanol se deja en reposo durante mínimo 6 horas (12, 18 o 24 horas o según necesidades de producción) a temperatura no mayor a -0°C. (-100 - 0°C)

Después de este reposo se precipitan varias proteínas, las cuales se centrifuga de 5.000 - 15.000 r.p.m durante 8 a 15 minutos, a una temperatura no superior a -0°C.

Este paso es el que diferencia a este proceso del estado de la técnica, debido a que con la adición de etanol frio y el suficiente tiempo para permitir la precipitación se pueden retirar gran parte de las proteínas ruido, que normalmente ocupan espacio en la cromatografía especialmente en la de intercambio ionico, de tal modo que el precipitado se descarta, el sobrenadante será etiquetado como sobrenadante básico.

Al SOBRENANDANTE BÁSICO**,** se le ajusta el pH ahora mediante tampón de 4 a 6.9, este ajuste se debe llevar a una temperatura no mayor a -0°C, vuelve y se adiciona etanol al 95 % como en el paso anterior, llevando el volumen de adición entre un 12 a 24%, nuevamente se deja en reposo mínimo 6 horas (12, 18 o 24 horas o según necesidades de producción), se vuelve a centrifugar igual que en el paso anterior, se descarta el precipitado y el sobrenadante se etiqueta como sobrenadante ácido.

Se determina la concentración proteica del **SOBRENADANTE ÁCIDO** mediante espectrofotometría, Absorbancia a 280 nm, utilizando el coeficiente de absorción 0.66 para la albumina. Diluyendo la solución proteica 1:100 y 1:50 se determina además el volumen de la solución y su concentración, así mismo como la masa.

Utilizando la fórmula $C_1 * V_1 = C_2 * V_2$, se busca un volumen 2 donde la concentración sea entre 5 a 15% (w/v), el método para concentrar este sobrenadante ácido, es filtrar por una membrana de 2 micras y se desalcoholiza vía diálisis (o diafiltracion).

Con la solución tampón de acetato, se le mide la conductividad a la solución proteica y a la solución tampón, después de la diálisis la solución proteica debe tener la conductividad de la solución tampón y se etiqueta como sobrenadante concentrado.

CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO Y EXCLUSIÓN

En una columna de cromatografía con DEAE-Sepharose FF (propia para intercambio anicónico), previamente desgasificado, se equilibra la columna con la solución tampon de acetato pH entre 5 a 6.9 a una velocidad de flujo de 1 a 10 ml / min.

El sobrenadante concentrado se hace correr en la columna con el flujo anterior. En este punto proteínas ruido restantes junto con la albumina quedan capturadas en la masa DEAE de la columna, el eluente sigue siendo el la solucion tampon acetato entre 5 a 6.9. La solución de lavado es la misma solución tampón acetato a 5 a 6.9. y la de elusión es acetato pH 3 a 4.9

El punto de inicio y el punto final de la elusión se determinan por conductividad eléctrica de las soluciones tampón, solo cuando la conductividad eléctrica sea igual al amortiguador de entrada como al amortiguador de salida, se entenderá que ya no hay proteína.

Para comenzar la exclusión elusión, La albumina se eluye con una solucion tampon de acetato a 3 a 4.9, eluira primero la albumina y luego el restante de proteinas ruido, el saliente de esta elusión de la albumina se etiquetara como albumina colectada.

Finalmente otras trazas de proteínas son eludidas del gel exclusión con la solución tampón pH 4.0.

COLECCIÓN DE LA MUESTRA.

Se determina nuevamente mediante A_{280} nm la concentración de la solución de ALBUMINA COLECTADA. Nuevamente mediante diálisis en membrana se concentrata a solución hasta llevarla a un 5 a 15%. Se etiqueta como sobrenadante proteico.

Y mediante electroforesis SDS-PAGE se determina la pureza y la presencia o no de otras proteínas

PROCESO DE CENTRIFUGACION, AJUSTE DE pH Y CONDUCTIVIDAD

Se determina el pH del SOBRENANDANTE PROTEICO, se ajusta el pH a 5.2 y la conductividad a 5.0 mS/cm, (si el valor está por debajo se ajusta con NaCl o diálisis si el valor está por encima)

TRATAMIENTO TERMICO

El SOBRENADANTE PROTEICO ajustado se somete a 30 a 60°C por 1 a 4 horas para la precipitación de los ácidos grasos.

El SOBRENADANTE PROTEICO ajustado es inmediatamente llevado a una temperatura de 0 a 10°C, luego se centrifuga igual que en los anteriores métodos y se descarta el precipitado de ACIDOS GRASOS, mientras el SOBRENADANTE PROTEICO ajustado y centrifugado se filtra por una membrana de 2 micras hasta que se observe una solución clara característica de una concentración de 20% a 50%, se determina de nuevola A280.

PROCESO DE PASTEURIZACION

El SOBRENADANTE PROTEICO ajustado y centrifugado que fue concentrado hasta obtener un minino de 20% (w/v) mediante diálisis, se le agregan 0.026592 g

de CAPRILATO DE SODIO por gramo proteina, para una concentración final de 0.16 mmol por gramo proteína.

Ahora se somete a inactivación de virus, por el proceso de pasteurización de 50 a

90°C durante 0.5 a 10 horas, se vuelve a filtrar para lograr la esterilización y se empaca en solución salina de acuerdo a necesidades del cliente. Etiquetando esta solución como solución proteica.

EVIDENCIA DE PUREZA

ANALISIS ELECTROFORECTICO

Finalmente se analiza la solución proteica en SDS-PAGE.

Se analiza la solución en electroforesis de plata

Figura 1: Cromatografía de Exclusión. Pico a: Elusión de proteínas ruido del plasma (control). Pico b: elusión de la Albúmina humana.

Figura 2: Electroforésis SDS-PAGE 10%, teñido con azul de coomasee. Carril 1: Marcador de Peso Molecular (G.I.B.). Carril 2: Albúmina humana eluída de la Cromatografía de exclusión.

Figura 3: Electroforésis SDS-PAGE 10%, teñido con Nitrato de Plata. Carril 1: Marcador Peso Molecular (G.I.B.). Carril 2: Fibrinógeno Humano Carril 3: Albúmina humana.

Figura 4: Análisis densitométrico de la Albúmina humana, teñida con azul de coomasee.

La pureza de la Albumina tambien fue determinada por secuenciamiento, encontrandose en la banda de electroforesis solo una banda, clara indicacion de la alta pureza, toda vez que el metodo de secuenciamiento puede determinar una secuencia de un nanogramo de proteina, no encontradose ninguna secuencia cruzada en la banda de 5 microgramos de albumina.

1 nanogramo / 5.000 nanogramos x 100 = 0.02% o sea que las impurezas son menores al 0.02% y la pureza seria mayor o igual 100-0.02= 99.98%

FIGURAS

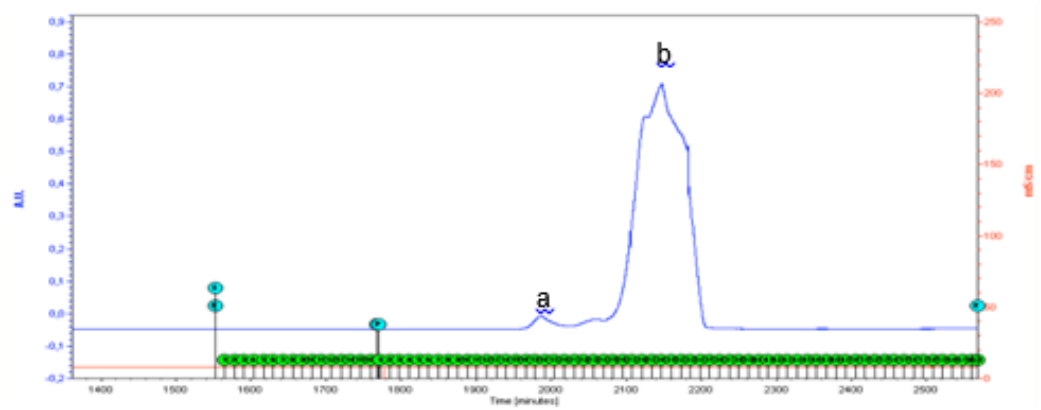

Figura 1.

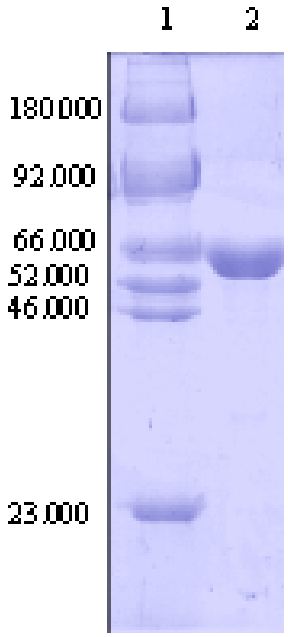

Figura 2.

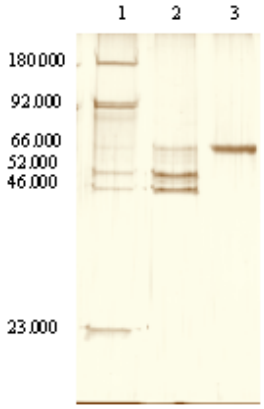

Figura 3.

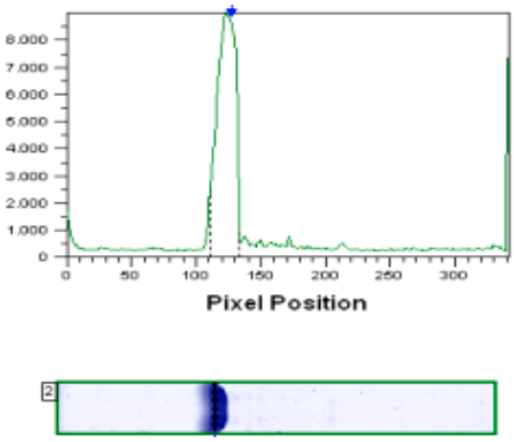

Figura 4.

MÉTODO PARA LA PURIFICACIÓN DE ALBÚMINA

REIVINDICACIONES

1. Método para la purificación de albúmina caracterizada porque comprende las siguientes etapas:
   a) Congelar entre 0°C y -100°C plasma humano o bovino
   b) Descongelar plasma hasta alcanzar una temperatura entre 0 a 38°C
   c) Congelar por segunda vez el plasma
   d) Centrifugar plasma a 5000 – 15000 r.p.m durante 8 a 15 minutos
   e) Descartar precipitado y seleccionar sobrenadante
   f) Ajustar pH de sobrenadante de 7 a 9
   g) Adicionar etanol al sobrenadante hasta alcanzar una relación entre 15 a 25% en el sobrenadante
   h) Reposar solución etanol / sobrenadante al menos por 6 horas a temperatura no mayor a 0°C
   i) Centrifugar solución reposada a 5000 – 15000 r.p.m durante 8 a 15 minutos
   j) Descartar precipitado y seleccionar sobrenadante
   k) Ajustar pH a sobrenadante de 4 a 6.9
   l) Adicionar nuevamente etanol hasta alcanzar una proporción entre 12 a 24% de etanol en el sobrenadante

m) Reposar solución etanol / sobrenadante al menos por 6 horas a temperatura no mayor a 0°C

n) Centrifugar solución reposada a 5000 – 15000 r.p.m durante 8 a 15 minutos

o) Descartar precipitado y seleccionar sobrenadante

p) Acondicionar conductividad a 5.0 mS/cm mediante NaCl.

q) Purificar por cromatografía de intercambio ionico el sobrenadante del paso o.

r) Purificar por cromatografía de exclusión el sobrenadante del paso anterior

s) Calentar el sobrenadante de albumina purificado del paso anterior entre 30 a 60°C por 1 a 4 horas

t) Enfriar sobrenadante de albumina del paso anterior entre 0 a 10°C

u) Centrifugar solución reposada a 5000 – 15000 r.p.m durante 8 a 15 minutos

v) Descartar precipitado y seleccionar sobrenadante.

2. Método para la purificación de albúmina según reivindicación 1 caracterizado porque en las etapas g) y l) la adición de etanol debe ser con etanol frio entre 0°C y -70°C.
3. Método para la purificación de albúmina según reivindicación 1 caracterizado porque en la etapa q) de cromatografía es de intercambio aniónico equilibrada con tampón de pH 5 a 6.9 y se tiene los siguientes pasos :
    a) Capturar albumina en columna cromatografía haciendo correr sobrenadante con tampón pH 5 a 6.9
    b) Liberar albumina haciendo correr tampón de pH 3 a 4.9

4. Método para la purificación de albúmina según reivindicación 1 caracterizado porque después del paso n) y o) hay que concentrar el sobrenadante hasta un 5 -15% de albumina

5. Método para la purificación de albúmina según reivindicación 1 caracterizado porque después del paso s) hay que concentrar el sobrenadante hasta un 20% a 50% de albumina

6. Método para la purificación de albúmina según reivindicación 1 caracterizado porque después del paso s) se pasteuriza el sobrenadante entre 30 a 70°C 0.5 a 10 horas