



1

Armenia,

Doctora

EDNA MARCELA RAMIREZ OROZCO

Directora de Nuevas Creaciones Superintendencia de Industria y Comercio
Bogotá D.C - Colombia

Asunto:	Respuesta a examen de fondo oficio N° 568
Solicitante:	Universidad del Quindío
Expediente número:	NC2021/0008459

Cordial saludo

De forma atenta y respetuosa, a continuación se presentan los argumentos y ajustes técnicos frente a los requerimientos realizados por el Examinador en oficio No. 568 del 14 de enero de 2022 respecto al capítulo reivindicatorio y descriptivo:

I. OBSERVACIÓN SOBRE EL TÍTULO DE LA INVENCIÓN

De conformidad con lo establecido por el Examinador, se adopta el ajuste sugerido con el objetivo de que la invención refleje el objeto y campo industrial con el cual se relaciona. Teniendo en cuenta lo anterior, el título inicial Método para la producción del péptido SATANIN1-CPD-H8 y SATANIN1-XA-XTEN-H8 se modifica por:

Método para la producción de las proteínas recombinantes SATANIN1-CPD-H8 y SATANIN1-XA-XTEN-H8

II. AJUSTES AL CAPÍTULO REIVINDICATORIO

Teniendo en cuenta la información y sugerencias del Examinador, a continuación procedemos a implementar los siguientes ajustes al capítulo reivindicatorio.

- **Reivindicación 1.** Se cambia la reivindicación 1 en términos de "Método para producir las proteínas antimicrobianas recombinantes" y se corrigen errores de redacción así: "Cultivar bacterias transfectadas" y de ortografía "solución de elusión" por "solución de elución".

Por otro lado, según lo indicado por la Superintendencia de Industria y Comercio frente a la falta de sustento de esta reivindicación y la sugerencia de limitar el objeto reclamado a una razonable generalización de las concentraciones de IPTG y L-arabinosa necesarias para la expresión de las proteínas recombinantes de la invención, se hace el ajuste en la



1

Armenia,

etapa b de la reivindicación 1 para el cumplimiento de lo estipulado en el requerimiento de la siguiente forma: "Inducir la expresión la proteína recombinante de SEC N°4 o SEC N°5 al añadir IPTG en una concentración entre 0,1 y 5 mM y L-arabinosa en una concentración entre 0,1-5 % p/v en el medio de cultivo".

Con base en lo anterior, la reivindicación 1 modificada sería la siguiente:

1. **Método para producir las proteínas antimicrobianas recombinantes Satanin1-CPD-H8 y Satanin1-Xa-Xten-H8 en una célula hospedadora que comprende las siguientes etapas:**
 - a. **Cultivar bacterias transfectadas** con un plásmido en un medio de cultivo selectivo de una célula hospedadora constituida;
 - b. **Inducir la expresión la proteína recombinante de SEC N°4 o SEC N°5 al añadir IPTG en una concentración entre 0,01 y 20 mM y L-arabinosa en una concentración entre 0,01-5 % p/v en el medio de cultivo;**
 - c. Lisar las células bacterianas con una solución alcalina;
 - d. Purificar por cromatografía líquida con metal inmovilizado bajo las condiciones de unión la proteína recombinante a la matriz de la columna;
 - e. Eluir de la matriz de la columna para obtener la proteína recombinante purificada usando una **solución de elución**. (Negrilla fuera de texto)
- **Reivindicación 2.** Se realiza el ajuste correspondiente frente al preámbulo de la reivindicación, modificándose de la siguiente forma:
 2. **El método de acuerdo con la reivindicación 1** caracterizado porque la bacteria para producir las proteínas antimicrobianas recombinantes Satanin1-CPD-H8 y Satanin1-Xa-Xten-H8 puede ser seleccionada de E. coli BL21 AI o E. coli BL21 DE3. (Negrilla fuera de texto)
- **Reivindicación 3.** Se realiza el ajuste correspondiente frente al preámbulo de la reivindicación así como la redacción de la expresión "(...) la secuencia clonada plásmido es seleccionada de SEQ ID No 6o SEQ ID No 7", modificándose de la siguiente forma:
 3. **El método de acuerdo con la reivindicación 1** caracterizado porque para producir las proteínas antimicrobianas recombinantes Satanin1-CPD-H8 y



1

Armenia,

Satanin1-Xa-Xten-H8 la secuencia de polinucleótidos clonada en el plásmido es seleccionada de la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID NO: 7. (Negrilla fuera de texto)

- **Reivindicación 4.** Se realiza el ajuste correspondiente frente al preámbulo de la reivindicación, modificándose de la siguiente forma:

4. **El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2** caracterizado porque para producir las proteínas antimicrobianas recombinantes Satanin1-CPD-H8 y Satanin1-Xa-Xten-H8 en una célula hospedadora la secuencia del plásmido produce las proteínas recombinantes de SEQ ID N° 4 y SEQ ID N° 5. (Negrilla fuera de texto)

- **Reivindicación 5.** Se realiza el ajuste correspondiente frente al preámbulo de la reivindicación así como la redacción de la palabra "imidazole" en español modificándose de la siguiente forma:

5. **El método de acuerdo con la reivindicación 1** caracterizada porque para producir las proteínas antimicrobianas recombinantes Satanin1-CPD-H8 y Satanin1-Xa-Xten-H8 la solución alcalina es de NaCl (0,02-0,5M), NaH₂PO₄ (2-100mM), **Imidazol** (5-150mM) y pH 6-8. (Negrilla fuera de texto)

- **Reivindicación 6.** Se realiza el ajuste correspondiente frente al preámbulo de la reivindicación así como la redacción de la palabra "imidazole" en español modificándose de la siguiente forma:

6. **El método de acuerdo con la reivindicación 5** caracterizado porque para producir las proteínas antimicrobianas recombinantes Satanin1-CPD-H8 y Satanin1-Xa-Xten-H8 en una célula hospedadora el **imidazol** tiene una concentración entre 2-50 mM. (Negrilla fuera de texto)

- **Reivindicación 7.** Se realiza el ajuste correspondiente frente al preámbulo de la reivindicación así como la redacción de la palabra "imidazole" en español modificándose de la siguiente forma:

7. **El método de acuerdo con la reivindicación 1** caracterizado porque para producir las proteínas antimicrobianas recombinantes Satanin1-CPD-H8 y Satanin1-Xa-Xten-H8 en una célula hospedadora la solución de elución es



1

Armenia,

compuesta de NaCl (0,1-0,5 M), NaH₂PO₄ (2-100 mM), **Imidazol** (0,1-0,5M) y pH (4-8). (Negrilla fuera de texto)

- **Reivindicación 8.** De acuerdo con la sugerencia del Examinador, se ajusta la reivindicación de producto enfocándose de la siguiente forma:

8. **Proteínas antimicrobianas recombinantes de Satanin1 que comprenden las secuencias SEQ ID N° 4 y SEQ ID N° 5** caracterizadas porque contienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; la etiqueta CDP caracterizada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; la etiqueta Xten caracterizada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; y la poli histidina H8.

- **Reivindicación 9.** De acuerdo con la sugerencia del Examinador, se ajusta la reivindicación de producto enfocándose de la siguiente forma:

9. **Composición farmacéutica que comprende las proteínas de la reivindicación 8** o mezclas de éstos y excipientes farmacéuticamente aceptables.

III. AJUSTES AL CAPÍTULO DESCRIPTIVO DE LA SOLICITUD

De conformidad con lo establecido en el Oficio de requerimiento frente a la divulgación clara y completa de la invención, nos permitimos establecer que:

- La expresión de las proteínas recombinantes SEQ ID NO: 4 y 5 se observa en el ejemplo de la figura 5 (página 24) en el pozo.
- En el ejemplo de la figura 5 (Pág 24) se muestra claramente la expresión de las proteínas recombinantes de SEQ ID NO: 4 y 5 con la secuencia correspondiente al peso molecular esperado de 25 KDa (kilodaltons) al añadir IPTG a 0,1 y 10 mM y L-arabinosa en una concentración entre 0,1-10 % p/v. En la figura 4 B y C se muestra la expresión de las proteínas recombinantes (Satanin1-CPD-H8 y Satanin1-Xa-Xten-H8) a concentraciones de 0,5 y 1 mM que se evidencia por un aumento en la densidad óptica a 405 nm después de 5 minutos.
- Se complementa la información para sustentar un rango de concentraciones de inductores con la siguiente evidencia:

Diseño del método

1

Armenia,

Se indujo la expresión de los constructos en las bacterias transformadas E. coli BL21 DE3, y BL21 AI transfectadas con los plásmidos con la secuencia SEQ ID NO: 8 o la SEQ ID NO: 9 (Plasmido_Constructo_Satanin1_Xa_Xten_H8_pD454MR, Plasmido constructo_Satanin1_CPD_H8_pD454MR) a concentraciones de IPTG desde 0,01 mM hasta 20mM, y 60 minutos de tiempo post inducción para evaluar la expresión de las proteínas por medio de un ELISA indirecto (ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas) específico para detectar la cola de polihistidinas (H8) de los constructos recombinantes.

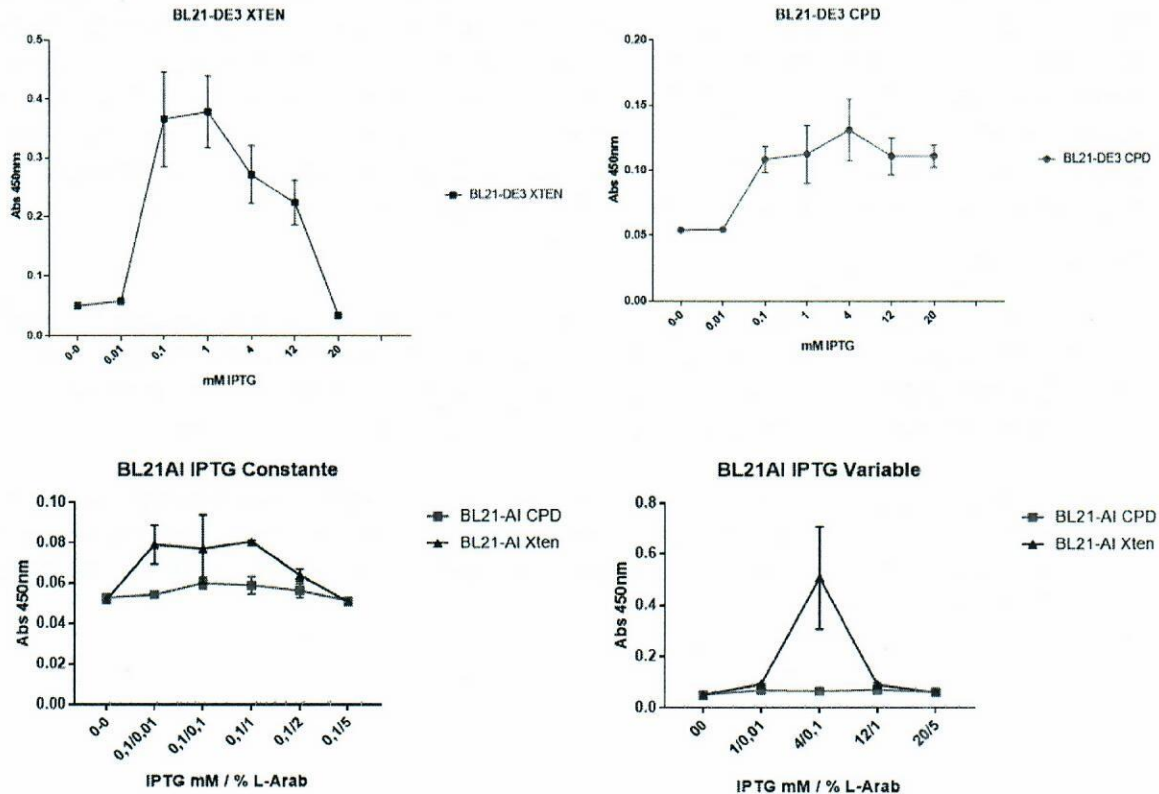
Se encontró que:

- Para E. coli BL21-DE3 se evidencia la expresión de ambos constructos siendo más eficiente la expresión para la proteína recombinante Satanin1-Xa-Xten-H8 a 0,1 mM de IPTG y evidenciando expresión hasta 12 mM. Para Satanin1-CPD-H8 se evidenció la expresión de la proteína desde 0,1 mM hasta 20mM.
- Para E. coli BL21-AI se evidencia la expresión de ambos constructos siendo más eficiente la expresión para la proteína recombinante Satanin1-Xa-Xten-H8 a 0,1 mM y 0,01 % de L-Arabinosa y un mayor pico a la relación de 4 mM de IPTG y 0,1% de L-Arabinosa

11

1

Armenia,



Ante esta evidencia se ajusta la Reivindicación para abarcar los rangos evidenciados dentro del ensayo de la siguiente forma:

"Método para producir las proteínas antimicrobianas recombinantes Satanin1-CPD-H8 y Satanin1-Xa-Xten-H8 en una célula hospedadora que comprende las siguientes etapas:

- Cultivar bacterias transfectadas con un plásmido en un medio de cultivo selectivo de una célula hospedadora constituida;
- Inducir la expresión la proteína recombinante de SEC N°4 o SEC N°5 al añadir IPTG en una concentración entre 0,01 y 20 mM y L-arabinosa en una concentración entre 0,01-5 % p/v en el medio de cultivo;
- Lisar las células bacterianas con una solución alcalina;
- Purificar por cromatografía líquida con metal inmovilizado bajo las condiciones de unión la proteína recombinante a la matriz de la columna;
- Eluir de la matriz de la columna para obtener la proteína recombinante purificada usando una solución de elución."



1

Armenia,

Teniendo en cuenta lo precedentes, se adjunta los documentos de los capítulos descriptivo y de reivindicaciones con los ajustes correspondientes, el listado de figuras, las figuras y secuencias presentadas en la solicitud no presentan modificaciones.

Atentamente,

JOSÉ FERNANDO ECHEVERRY MURILLO

C.C. 7.526.520

Representante legal

Universidad del Quindío

Anexos: DOS (capítulo descriptivo – 14 folios, capítulo reivindicatorio – 2 folios)

NOMBRES Y APELLIDOS		FIRMA
PROYECTÓ Y ELABORÓ	Jhon Carlos Castaño Osorio – Docente inventor Facultad de Medicina	
	Germán Alberto Téllez Ramírez - Docente inventor Facultad de Medicina	
	Lily Johanna Toro Segovia - Docente inventor Facultad de Medicina	
REVISÓ	Alejandra Grajales López – Profesional Unidad de Emprendimiento, Desarrollo Empresarial y de Negocios	
	Andrea Gómez Escudero - Directora Unidad de Emprendimiento, Desarrollo Empresarial y de Negocios	
APROBÓ	Luis Fernando Polania Obando – Vicerrector de Extensión y Desarrollo Social	
Los arriba firmantes declaramos que hemos revisado el presente documento y soportes (de ser el caso) y lo encontramos ajustado en términos técnicos y administrativos; así como a las normas y disposiciones legales vigentes y por lo tanto, bajo nuestra responsabilidad, lo presentamos para la correspondiente firma.		

