

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.

Carlos R. Olarte
Juan G. Moure

Alexander Agudelo
Carlos A. Parra
Juan Felipe Acosta
Andrés Rincón
Mónica Guevara
Andrés Alvarado
Ella Ponce
Liliana Galindo
María Clara Calderón
Mauricio Ávila
José Jairo Dangond
Gina Cáceres
Isabella Herrera
Zaava Ravid
Miguel Porras
Catalina Amaya
Laura Escobar

Medellín
María Clara Múnera
Eddie Manotas
Adrián Santamaría

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-024590- -00016-0000

Fecha: 2013-10-01 16:30:06 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act. 523 RESPUESTA Folios: 19 **20**

Re: Expediente No. 10-024.590

Solicitud de Patente de Invención titulada: “MÉTODO Y COMPOSICIÓN
INMUNOQUÍMICA PARA LA DETECCIÓN DE ALÉRGENOS DE ÁCAROS
USANDO ANTICUERPOS POLICLONALES IgY”

Solicitante: FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DEL NORTE y PONTIFICIA
UNIVERSIDAD JAVERIANA

Nuestra Ref.: P2010/000027

RESPUESTA AL OFICIO No. 9188 NOTIFICADO POR FIJACIÓN EN LISTA No. 021,
DE FECHA 21 DE MAYO DE 2013
(SEGUNDO EXAMEN DE FONDO)

CARLOS R. OLARTE, mayor de edad y vecino de Bogotá, identificado tal como aparece al pie de mi firma, en mi carácter de apoderado de la sociedad solicitante, me permito manifestar lo siguiente ante el auto emanado por ese Despacho, dentro del plazo legal de prórroga previsto en el artículo 45 de la Decisión 486, en los siguientes términos:

1. a- En primer lugar, con el ánimo de brindar mayor claridad a la materia reivindicada, me permito presentar un **Capítulo Reivindicatorio Modificado**, que reemplaza en su totalidad al Capítulo Reivindicatorio presentado junto con mi respuesta al primer examen de fondo el 29 de abril de 2013.

Así entonces, el Capítulo Reivindicatorio Modificado contiene los siguientes cambios:

- en el preámbulo de la Reivindicación 1 se elimina la palabra “composición”, por lo que ahora se reclama un método para la producción de anticuerpos policlonales IgY;

- la etapa b) de la Reivindicación 1 ahora especifica que la hiperinmunización del ave se realiza con más de una inmunización de la composición obtenida en la etapa a), de acuerdo con la antigua Reivindicación 2;
- se incluye una nueva Reivindicación 2 que especifica que en dicha hiperinmunización de la etapa b) de la Reivindicación 1 se realizan 3 o más inmunizaciones;
- en la Reivindicación 14 se elimina la expresión “Una composición de” del preámbulo;
- en la Reivindicación 15 se elimina la dependencia a la Reivindicación 14, y se especifica que el kit analítico comprende anticuerpos policlonales IgY obtenidos por el método de la Reivindicación 1;
- se elimina la frase “una composición de” de la etapa iii) de la Reivindicación 16;
- se elimina la frase “la composición de” de las Reivindicaciones 18 a 20;
- en el preámbulo de la Reivindicación 22 se elimina la palabra “composición”.

b- Adicionalmente, me permito presentar la Hoja Sustituta 36, en la que se modifica la numeración y el orden de las secuencias en el Anexo 1 del Capítulo Descriptivo, de acuerdo con la solicitud de patente CO09-027.540, así:

- La secuencia Seq. 1 (**DYWIVRNSWDTNWGDNGYGY**) se renombró a la SEQ ID No. 3;
- La secuencia Seq. 2 (**AHFRNLRKGILRGAGYNDAQ**) se renombró a la SEQ ID No. 6;
- La secuencia Seq. 3 (**FRHYDGRTHIQRDNGYQPNY**) se renombró a la SEQ ID No. 4;
- La secuencia Seq. 4 (**TNACSINGNAPAEIDLRQMR**) se renombró a la SEQ ID No. 1;
- La secuencia Seq. 5 (**PANFDWRQKTHVNPIRNQG**) se renombró a la SEQ ID No. 5;
- La secuencia Seq. 6 (**PIRMQGGCGSCWAFSGV**) se renombró a la SEQ ID No. 2;

c- Valga anotar que las modificaciones efectuadas al Capítulo Reivindicatorio cumplen a cabalidad con lo estipulado en el Artículo 34 de la Decisión 486, ya que éstas de ninguna manera implican una ampliación de la protección correspondiente a la divulgación

contenida en la solicitud inicial, y por el contrario, corresponden a una limitación de la materia reivindicada.

2. a- La Examinadora considera que las reivindicaciones no son claras por las siguientes razones:

- el preámbulo de la Reivindicación 1 establece que el objeto de la invención es un método para obtener una composición de anticuerpos, pero la serie de etapas incluidos en la parte caracterizante se refieren a la generación de anticuerpos policlonales, más no una composición que los contiene;
- de la etapa b) de la Reivindicación 1 se entiende que las aves pueden ser inmunizadas una o varias veces, pero en el Capítulo Descriptivo se enseñan procesos donde se realiza más de una inmunización;
- en la misma etapa b) se indica que la inmunización se realiza en aves pero el Capítulo Descriptivo solo enseña un proceso de inmunización realizada en gallinas, por lo que las reivindicaciones deben ajustarse a la información divulgada y ensayada;
- las etapas c) y d) de las Reivindicaciones 1 y 16 no permiten precisar la aplicación de estas etapas del método y se refieren a resultados a alcanzar;
- las Reivindicaciones 14 y 15 presentan una falsa dependencia, pues se refieren a una composición producida mediante el método de la Reivindicación 1, pero dicho método no está dirigido a la obtención de una composición sino de anticuerpos policlonales. Además, la caracterización de producto por el método de obtención sólo es válida cuando no existe otra manera de caracterizar la invención, lo cual no es posible en el presente caso, puesto que una composición se debe caracterizar por los elementos particulares que la conforman y las proporciones de los mismos. Asimismo, el anticuerpo al que se refiera la composición debe ser caracterizado a partir de su estructura y no de su función o uso.

b- i) En primer lugar, llamo respetuosamente la atención de la Examinadora sobre las modificaciones realizadas en el Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto como se explican en el punto 1 del presente memorial.

En particular, y siguiendo las recomendaciones presentadas por la Examinadora, en el preámbulo de la Reivindicación 1 se eliminó la palabra “composición”, por lo que ahora se reclama un método para la producción de anticuerpos policlonales IgY antiácidos; en la etapa b) de la

Reivindicación 1 se especificó que la hiperinmunización del ave se realiza con más de una inmunización de la composición obtenida en la etapa a), de acuerdo con la antigua Reivindicación 2; se incluyó una nueva Reivindicación 2 que especifica que en dicha hiperinmunización de la etapa b) de la Reivindicación 1 se realizan 3 o más inmunizaciones; en la Reivindicación 14 se eliminó la expresión “Una composición de” del preámbulo; y en la Reivindicación 15 se eliminó la dependencia a la Reivindicación 14, especificando ahora que el kit analítico comprende anticuerpos policlonales IgY antiácaros obtenidos por el método de la Reivindicación 1;

ii) Ahora bien, en cuanto a la objeción relacionada con la amplitud y falta de soporte de la palabra “ave” en la etapa b) de la Reivindicación 1, me permito insistir en que el hecho que el inventor está en su derecho de reclamar protección para la totalidad del concepto inventivo desarrollado, sin importar la amplitud de éste, siempre y cuando se conserve el principio de unidad de invención y no haya arte previo que afecte su patentabilidad, como ocurre en la presente invención.

Adicionalmente, no existe ningún requerimiento que obligue al inventor a limitar la materia reclamada a las realizaciones ilustradas en los ejemplos, pues los ejemplos son simplemente una descripción de la mejor manera conocida por el inventor para ejecutar o llevar a la práctica la invención, sin que éstos determinen el alcance del concepto inventivo desarrollado o de protección.

El concepto inventivo que se pretende proteger en la presente invención involucra un método para la producción de anticuerpos policlonales que involucra la hiperinmunización de cualquier ave. Cualquier persona medianamente versada en la materia sabría que el método de la invención se puede aplicar en cualquier ave, con la expectativa de obtener resultados comparables a la hiperinmunización en gallinas, es decir, la producción de anticuerpos policlonales IgY.

Es decir, la producción de anticuerpos policlonales IgY usando aves en general hace parte del conocimiento de cualquier persona medianamente versada en la materia y por lo tanto, la utilización específica de una gallina no puede limitar el concepto inventivo desarrollado. Así, al ilustrar la producción de anticuerpos policlonales IgY con gallinas en el Capítulo Descriptivo, se habilita a cualquier persona medianamente versada en la materia a utilizar cualquier ave.

De hecho, existen diferentes empresas y artículos relacionados con la hiperinmunización de otras aves, como los patos, pavos y gansos, como se muestra a continuación:

- Chiou, V., *et al.* "The development of IgY(Δ Fc) antibody based neuro toxin antivenoms and the study on their neutralization efficacies." Vo. 46, No. 6. Páginas 539-544. 2008.
- Tsen, Yun-Chien, *et al.* "Evaluation and Validation of a Duck IgY Antibody-based Immunoassay for Measuring High Sensitivity C-Reactive Protein: Avian Antibody Application in Clinical Diagnostics" Clinical Chemistry. Vol. 49, No. 5. Páginas 810-813. 2003.
- Chiou, V., *et al.* "Duck Antibodies for IVD Applications ~a naturally existing analogue to mammalian antibodies offers an alternative with broad applications" IVD Technology. 2002.
- Lobbedey, L. *et al.* "Development and application of an ELISA for the detection of duck antibodies against *Riemerella anatipestifer* antigens in egg yolk of vaccinees and in serum of their offspring" Journal of Veterinary Medicine, Series B. Vol. 50, No. 2, páginas 81-85. 2003.
- Hädige, D., *et al.* "Comparative studies on the structure of biliary immunoglobulins of some avian species I. Physico-chemical properties of biliary immunoglobulins of chicken, turkey, duck and goose" Development & Comparative Immunology. Vol. 12, No. 1., páginas 121-129. 1988.
- Tong, Hong-Fei, *et al.* "A new purification process for goose immunoglobulin IgY(Δ Fc) with hydrophobic charge induction chromatography" Biochemical Engineering Journal. Vol. 56, No. 3. Páginas 205-211. 2011.

De hecho, existe una empresa que ofrece el servicio de producción de anticuerpos policlonales IgYs en patos, llamada Good Biotech Corp¹.

Así, como es sabido, son las aves (e incluso los reptiles) los animales que producen específicamente anticuerpos policlonales IgY en respuesta a un antígeno (como los polipéptidos de las SEQ ID No. 1, 2, 3, 4, 5 o 6), por lo que así los ejemplos se refieran únicamente a gallinas (pues era el ave al que se tenía acceso), cualquier persona medianamente versada en la materia que tenga acceso a la solicitud de patente entendería que el concepto inventivo también

¹ http://www.good-biotech.com/products/index.php?type_id=13

comprende la hiperinmunización de otras aves diferentes a gallinas, sin que tenga que incurrir en experimentación indebida.

Teniendo en cuenta lo anterior, me permito insistir en la palabra “ave”, pues restringir la etapa b) del método a gallinas restringiría injustamente el derecho del inventor de reclamar la totalidad del concepto inventivo desarrollado.

iii) Finalmente, y en cuanto a las etapas c) y d) del método de la Reivindicación 1, me permito llamar nuevamente la atención de la Examinadora sobre el hecho que las reivindicaciones no requieren incluir elementos **no esenciales** del método reclamado, sino por el contrario, aquellas características que lo distinguen del arte previo. Lo anterior encuentra fundamento en que al proporcionar tales características específicas no esenciales sólo se limita la protección de la patente y se restringe injustamente el alcance de la protección a la cual el inventor tiene derecho. De hecho, la información que la Examinadora requiere se incluya en las etapas c) y d) de la Reivindicación 1 se encuentra en el Capítulo Descriptivo, el cual tiene como objetivo precisamente detallar los pormenores de los procesos reclamados.

En las etapas c) y d) de la Reivindicación 1 se definen claramente dos etapas de un proceso, una que consiste en una extracción de los anticuerpos y otra que consiste en su purificación. Dado que el objeto de la solicitud es producir anticuerpos policlonales IgY, es evidente que el resultado a alcanzar mediante dicho proceso es la obtención de dichos anticuerpos policlonales y no una etapa aislada de extracción o purificación. De hecho, las páginas 16 y 17 del Capítulo Descriptivo detallan claramente en las condiciones de cada una de estas etapas.

De nuevo, el inventor está en su derecho de reclamar protección para la **totalidad** del concepto inventivo desarrollado, sin importar la amplitud de éste, siempre y cuando se conserve el principio de unidad de invención y no haya arte previo que afecte su patentabilidad, como ocurre en la presente invención, considero que la inclusión de los métodos específicos que solicita la Examinadora solamente constituyen elementos no esenciales que restringen inadecuadamente el derecho de los inventores de reclamar la totalidad del concepto inventivo por ellos desarrollado.

Lo anterior no significa que los pasos de extracción y purificación no sean esenciales, pues se encuentran incluidos en la Reivindicación 1, de hecho lo esencial es la operación de extraer y purificar los anticuerpos más no la técnica específica mediante la cual se realiza la extracción y purificación. Tales técnicas son de conocimiento de cualquier persona medianamente versada en

la materia, dentro de las cuales se encuentran técnicas específicas de las Reivindicaciones 7 y 8, u otras tales como:

Extracción:

- método de dilución en agua, dentro del cual se encuentra con ajuste y sin ajuste de pH, y con y sin ciclos de congelación/descongelación;
- precipitación con polietilenglicol (PEG);
- precipitación con polisacáridos aniónicos;
- extracción o purificación con solventes orgánicos;
- interacción con químicos específicos: ácido caprílico, hidroximetilcelulosa, ácido fosfotungstico/cloruro de magnesio;

Purificación:

- Reacciones de precipitación: sulfato de amonio, sulfato de sodio, polietilenglicol (PEG), etanol;
- Métodos cromatográficos: cromatografía de interacción tiofílica, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio aniónico y/o catiónico, cromatografía de intercambio hidrofóbico, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de interacción con cobre;
- Métodos de filtración: filtración por canal, diafiltración, filtración por columna, ultrafiltración.

iv) Teniendo en cuenta lo anterior, considero respetuosamente que la Reivindicación 1 cumple con lo establecido en el Instructivo para el Examen de Solicitudes de Patentes de Invención y Modelos de Utilidad, el cual señala que “Las reivindicaciones de procedimiento son las que se refieren a actividades ordenadas por una serie de pasos de manera determinada”², pues la presente invención se refiere precisamente a un método para la producción de anticuerpos policlonales IgY, definido por los pasos necesarios y esenciales (más no las técnicas específicas) para obtener el producto, incluyendo pasos finales generales que consisten en extraer los anticuerpos policlonales IgY de la yema de huevo puesto por el ave hiperinmunizada y purificar los anticuerpos policlonales IgY extraídos.

Así, considero superadas las anteriores objeciones en tanto que el Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto fue limitado conforme a las observaciones y sugerencias realizadas por la

² Instructivo Examen de Solicitudes de Patentes de Invención y Modelo de utilidad. Superintendencia de Industria y Comercio. 2012. Sección 2.4.3. Páginas 33 y 34. (disponible electrónicamente en http://www.sic.gov.co/recursos_user/documentos/propiedad_industrial/Formatos/PI02-106.pdf)

Examinadora, cumpliendo con los requisitos de claridad establecidos en la Decisión 486, y a la luz del Manual Andino de Patentes (MAP) y el Instructivo de la SIC, permitiéndole a la persona medianamente versada en la materia determinar inequívocamente el alcance de la materia reclamada.

3. a- La Examinadora solicita el certificado de depósito para el hibridoma producido, pues la solicitud se refiere a material biológico.

b- En primer lugar, me permito resaltar respetuosamente que un hibridoma es una línea celular híbrida obtenida mediante la fusión de un linfocito B o célula plasmática especializada y diferenciada, productor de un anticuerpo específico para el antígeno y/o inmunógeno de interés con una línea celular de laboratorio inmortalizada proveniente de un mieloma múltiple (linfocito B canceroso) que tiene la particularidad de producir una sola clase de inmunoglobulina generalmente de los subtipos de Inmunoglobulinas IgG.

productor del anticuerpo de interés, con una línea celular de mieloma (linfocito B canceroso) que no produce una inmunoglobulina propia. Siendo así, es necesario presentar un certificado de depósito cuando una invención consiste en la creación de un nuevo hibridoma, es decir una nueva línea celular, o cuando se desea proteger un anticuerpo monoclonal caracterizado por el hibridoma que lo produce.

Contrario a lo anterior, la presente invención se refiere a un método para la producción de anticuerpos específicos policlonales de la clase IgY, donde los anticuerpos son una mezcla de inmunoglobulinas generadas contra un antígeno específico, en este caso contra oligopéptidos sintéticos provenientes de las proteínas Df, D pt, y Bt, producidos por la inmunización reiterada de dicho antígeno en un animal, en este caso un ave, con el fin de generar una respuesta inmune específica. Del animal inmunizado se extrae la sangre o en el caso de las aves se recogen los huevos y a partir de ellos se extraen y purifican los anticuerpos.

Teniendo en cuenta lo anterior, la presente solicitud no implica la producción de un hibridoma y por ende, no es pertinente realizar un depósito de dicha línea celular y el mismo no se presenta en respuesta al presente examen de fondo.

OLARTEMoure

OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.

4. a- La Examinadora señala que la patente US5820862 (D1) y el artículo de García, D.A, et al,³ (D2), afectan el nivel inventivo de la presente invención.

La Examinadora argumenta que D1 divulga péptidos aislados de los alérgenos de la proteína mayor del género *Dermatophagoides*, los cuales comprenden al menos un epítipo de la célula T, o preferiblemente al menos dos epítopes de la célula T de una proteína alergénica seleccionada de los alérgenos Der pI, Der pII, Der f I, o Der f II.

De otra parte, D2 divulga el desarrollo de anticuerpos policlonales IgY anti-*Giardia duodenalis* y diferentes métodos para su purificación a partir de yema de huevo. En particular, la producción de anticuerpos policlonales a partir de la hiperinmunización de gallinas (resumen), donde el antígeno inmunomodulador es el trofozoito de *Giardia duodenalis*, el cual es inyectado usando adyuvante completo e incompleto de Freund y en varias inmunizaciones posteriores (pág. 453 col izq.). La extracción de los anticuerpos de D2 se realiza a partir de la yema de huevo del ave hiperinmunizada y la purificación se lleva a cabo por cinco técnicas diferentes (pág. 453 y 454).

La Examinadora argumenta que los métodos para la producción de anticuerpos policlonales basados en la inmunización de animales, específicamente la hiperinmunización de aves, para la producción de anticuerpos policlonales IgY son ampliamente conocidos para la persona medianamente versada en la materia. Siendo ésta última preferida, ya que los anticuerpos producidos presentan una mayor efectividad que la reportada para anticuerpos producidos en mamíferos, tienen una alta especificidad, y la producción del anticuerpo a gran escala es más fácil.

La Examinadora agrega que el método de D2 ha sido empleado para obtener anticuerpos contra otros parásitos, indicando que la técnica no es específica para el antígeno de *Giardia* y que por el contrario, ha sido empleada con otros antígenos de manera exitosa (Pág. 461 col. Izq).

A la luz de lo anterior, la Examinadora concluye que la diferencia entre la presente solicitud y D2 es que en la presente invención se producen anticuerpos policlonales contra los péptidos de SEQ ID N°: 1 a 6, que corresponden a segmentos de proteasas de ácaros intradomiciliarios, y el efecto derivado de dicha diferencia es la producción de anticuerpos que detecten ácaros

³ Garcia, D. A. et al. "Obtención, purificación y caracterización de anticuerpos policlonales IgY desarrollados en gallina, dirigidos contra aislamientos colombianos de *Giardia duodenalis*" Biomédica. Revista del Instituto Nacional de Salud. Vol. 25, No. 4 (2005). (disponible electrónicamente en <http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/1372>)

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.

intradomiciliarios. Así, la Examinadora afirma que el problema técnico a resolver consiste en cómo aplicar la técnica de producción de anticuerpos divulgada en D2, para producir anticuerpos contra los péptidos inmunomoduladores de alérgenos de ácaros.

Complementando la información anterior, la Examinadora afirma que los péptidos empleados como antígenos en la presente solicitud ya eran conocidos, puesto que D1 había divulgado péptidos de los alérgenos Der p I, Der p II, Der f I, Der f II de *Dermatophagoides pteronyssinus* y *D. farinae*, entre ellos, los péptidos de las secuencias SEQ ID N° 9, 25 y 11 que son idénticos a los péptidos de las Seq. 4, 1 y 6 de la presente invención. Además, la Examinadora resalta que de acuerdo con D1, estos péptidos son usados para el diagnóstico de alergias a estos ácaros y para el tratamiento de las mismas. Adicionalmente, en D1 se ensayan anticuerpos específicos contra estos péptidos (resumen), por ejemplo el anticuerpo 4C1 que se une al epítopo compartido entre el Der p I y el Der f t (Col. 52 líneas 11 a 17).

Basándose en lo expuesto, la Examinadora concluye que a la luz de la información de D1 y D2, una persona versada en la materia estaría motivada a producir anticuerpos policlonales IgY mediante el método de producción de anticuerpos divulgado en D2, usando como antígeno los péptidos inmunomodulares de ácaros intradomiciliarios reportados en D1, por lo que considera que la presente invención es obvia.

b- i) En primer lugar, D1 se refiere a péptidos aislados de proteínas de alérgenos del género *Dermatophagoides*, los cuales comprenden por lo menos una al menos un epítopo de la célula T, o preferiblemente al menos dos epítopos de la célula T de una proteína alergénica seleccionada de los alérgenos Der pI, Der pII, Der f I, o Der f II, como lo señala la Examinadora.

Dentro de lo anterior, D1 muestra las secuencias de **207 secuencias de péptidos** obtenidos de proteínas de alérgenos del género *Dermatophagoides*, dentro de las cuales la SEQ ID No. 9 corresponde a la secuencia SEQ ID No. 1 de la presente invención, y las SEQ ID No. 11 y 25 comprenden las secuencias SEQ ID No. 2 y 3 de la presente invención.

Sin embargo, y a pesar de lo anterior, D1 divulga ensayos de **unión directa** de IgE a los antígenos purificados o recombinantes de *Dermatophagoides*, donde la presencia de dichos antígenos busca **bloquear el desencadenamiento de reacciones inmunitarias** tales como la desgranulación de los mastocitos, eosinófilos y basófilos, que liberan sustancias vasoactivas como la histamina e inician el proceso alérgico. Es decir, el objetivo de los **207 péptidos** de D1

es la producción de anticuerpos policlonales IgE (anticuerpos producidos en mamíferos) más no de otro tipo de anticuerpos. En la presente solicitud se reclama la producción de anticuerpos policlonales IgY, que **solamente** los producen las aves y los reptiles.

Como cualquier persona medianamente versada en la materia sabe, los anticuerpos IgE difieren de forma clara y específica, tanto en su estructura como en su función de los anticuerpos IgY en:

- IgE tiene cuatro dominios en su región Fc diferentes a los de las IgY;
- IgE tiene una región en el dominio carboxilo terminal de la región Fc que le confiere una propiedad homocitotrópica, mientras los IgY no tienen esa propiedad;
- IgE es una proteína que unida a la membrana de células cebadas (mastocitos) produce una degranulación de aminas preformadas entre ellas Histamina. Los IgY no poseen esta característica;
- la función biológica primordial de los IgE es: presentar una respuesta específica protectora, altamente especializada, contra geohelminths y protozoos en mamíferos. Los anticuerpos IgY no presentan dicha propiedad biológica;
- IgE es una proteína que inicia eventos fisiopatológicos en la cascada inflamatoria de las enfermedades alérgicas en los mamíferos, mientras los IgY no participan ni tienen este papel.

Así, partiendo de las enseñanzas de D1, una persona versada en la materia no se vería motivada a emplear una mutación de dichos antígenos, para inocular aves, con el fin de que ellas procesen los antígenos y generen anticuerpos policlonales IgY y menos, podría tener certeza que tales anticuerpos permitirían reconocer la presencia de antígenos de *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, o *Blomia tropicalis*, como en la presente invención.

En adición a lo anterior, nada en D1 motivaría a la persona medianamente versada en la materia a utilizar específicamente el oligopéptido de SEQ ID No. 9, a partir de 209 oligopéptidos diferentes, en la producción de anticuerpos IgY. En el mejor de los casos, dicha persona podría utilizar dicho oligopéptido en la producción de anticuerpos IgE.

De manera similar, si bien es cierto que las secuencias SEQ ID No. 2 y 3 (antiguas Seq. 6 y 1) utilizadas en la presente invención comparten varios aminoácidos con las secuencias SEQ ID No. 11 y 25, no existe sugerencia o enseñanza alguna en D1 para que una persona versada en la

materia se viera motivada a modificar las secuencias allí divulgadas, reduciendo el número de aminoácidos al inicio o al final de la secuencia reportada, con el fin de obtener unos anticuerpos policlonales IgY que logran unirse a epítopes moleculares característicos de diferentes cistein proteasas de ácaros intradomiciliarios, particularmente a las cistein proteasas de los ácaros *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, y *Blomia tropicalis*, principales agentes desencadenantes de enfermedad alérgica respiratoria en el trópico, como se afirma en la página 15 de la presente solicitud.

De hecho, D1 sólo se refiere a péptidos que inducen repuesta con ácaros del género *Dermatophagoides*, por lo que una persona versada en la materia no habría considerado la posibilidad de emplear la información de D1 para generar péptidos diferentes para inmunizar gallinas y esperar que los anticuerpos policlonales resultantes también se unirían a antígenos de *Blomia tropicalis*.

Así, las enseñanzas de D1 **no conducirían** a la persona medianamente versada en la materia a:

- Escoger específicamente la SEQ ID No. 9 de D1, y parcialmente las SEQ ID NO. 25 y 11, para extraer ciertos aminoácidos de las mismas y obtener las secuencias SEQ ID No. 1 a 3 (antiguas Seq. 4, 1 y 6) utilizadas en la presente invención a partir de la información de 209 oligopéptidos diferentes allí divulgados;
- Preparar otros oligopéptidos como los de las SEQ ID No. 4 a 6 (antiguas Seq. 3, 5 y 2);
- Utilizar dichos oligopéptidos en la producción de anticuerpos policlonales IgY;
- Esperar con alguna expectativa de éxito que los anticuerpos IgY generados logran unirse a epítopes moleculares característicos de diferentes cistein proteasas de ácaros intradomiciliarios, particularmente a las cistein proteasas de los ácaros *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, y *Blomia tropicalis*.

Contrario a la presente invención, las enseñanzas de D1 conducen a:

- **209 oligopéptidos** diferentes obtenidos de proteínas de alérgenos del género *Dermatophagoides*.

- Utilización de dichos oligopéptidos en la producción de anticuerpos policlonales IgE, donde la presencia de dichos antígenos busca **bloquear el desencadenamiento de reacciones inmunitarias.**

Es decir, para llegar a la presente invención, la persona medianamente versada en la materia tendría que haber incurrido no solo en experimentación adicional, sino que realizar actividades (como la producción de anticuerpos IgY) no motivadas y diferentes a las de D1, en contravía de lo allí enseñado.

ii) Ahora bien, el análisis en detalle de D2 deja ver que dicho artículo solo sugiere el uso del método para producir anticuerpos policlonales a partir de antígenos de **parásitos protozoarios**, utilizando una **mezcla de trofozoitos** de 24 aislamientos colombianos de *G. duodenalis*. Lo anterior determina, que dichas IgY producidas en D2 son una mezcla inespecífica y no caracterizada, desde el punto de vista inmunológico (inmunogenicidad específica), de anticuerpos aviares contra múltiples epítopes desconocidos, dado que lo que se utilizó fue una gran combinación de macromoléculas provenientes de extractos proteicos crudos de 24 diferentes aislamientos del parásito.

Como es sabido, los trofozoitos corresponden a la forma vegetativa activada que se alimenta y se reproduce en el ciclo de vida de los parásitos protozoarios y no a **oligopéptidos sintéticos y específicos** obtenidos a partir de unas secciones específicas de cistein proteasas de ácaros intradomiciliarios, particularmente de los ácaros *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, y *Blomia tropicalis*.

De hecho, en D2 se menciona que “*Hasta donde se ha tenido acceso a la literatura científica existen muchos trabajos de producción de anticuerpos en gallina, pero de IgY anti-Giardia, y específicamente contra aislamientos colombianos del parásito, no se habían desarrollado con anterioridad. Sólo se habían producido anticuerpos policlonales IgY contra las siguientes especies de parásitos: Echinococcus granulosus, Naegleria fowleri, Plasmodium falciparum, Sarcocystis gigantea, Toxoplasma gondii y Trypanosoma brucei brucei (9-13).*”. Considerando esta información, no existe razón alguna para que una persona versada en la materia estuviera motivada a aplicar este método para la producción de anticuerpos policlonales IgY contra oligopéptidos sintéticos y específicos de no protozoarios, como es el caso de los antígenos de ácaros, que son crustáceos ancestrales, específicamente arácnidos, cuyos polipéptidos son completamente diferentes a los que se pueden encontrar en los parásitos mencionados en D2.

1478

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.

Es más, ninguna persona versada en la materia consideraría tomar un artículo que divulga un método basado en la inoculación de una **mezcla de proteínas** de un estadio del ciclo de vida de *Giardia duodenalis* (protozooario), para aplicarlo en un método para el diagnóstico que evidencie la presencia de ácaros, organismos absolutamente diferentes, pertenecientes al Reino Animalae, filo *Arthropoda*. Como su lejanía taxonómica indica, no hay razones para suponer que una técnica exitosa en *Giardia* podría ser modificada para inocular gallinas con unos polipéptidos novedosos, y que permitiría desarrollar unos anticuerpos policlonales útiles para el diagnósticos de ácaros domésticos, que no son endoparásitos humanos como la *Giardia*, sino un ectoparásito que vive en el exterior o superficie de su huésped.

Así, son más las diferencias y la lejanía del método divulgado en D2 respecto al método de la presente invención, que sus similitudes. De hecho, la única similitud es la producción de anticuerpos IgY, pues en el mejor de los casos la persona medianamente versada en la materia (acercándose a lo divulgado en D2) habría utilizado una **mezcla de proteínas** de ácaros recolectados para la producción de anticuerpos policlonales IgY. Sin embargo, los anticuerpos allí producidos no presentarían las ventajas en especificidad, reproducibilidad, etc., que presentan los anticuerpos policlonales IgY producidos a partir de los oligopéptidos sintéticos, no glicosilados de secuencias SEQ ID No. 1, 2, 3, 4, 5 y 6 utilizados en el método de la Reivindicación 1.

En gracia de discusión y si se considerara la secuencia de análisis planteada por la Examinadora, y una persona medianamente versada en la materia hubiese pensado en emplear la información de D2 como base para desarrollar un método para producir anticuerpos policlonales IgY contra antígenos de ácaros, lo obvio habría sido utilizar los péptidos ya reportados en D1 como antígenos para inmunizar las aves y no efectuarle modificaciones al azar y sin motivación alguna para ver si dichos péptidos funcionaban mejor y al ser inoculados en gallinas, las inmunizaba permitiendo que ellas produjesen un anticuerpo policlonal que lograba unirse con antígenos de diferentes clase de ácaros. Es decir, dicha persona medianamente versada en la materia a la luz de D1 no habría diseñado los oligopéptidos de las SEQ ID No. 1-6 que se utilizan en el método de la invención, y los cuales son producto de análisis bioinformático y de química computacional, y que no responden a ninguna enseñanza obtenida de D1.

iii) Teniendo en cuenta lo anterior, pareciera que el análisis de nivel inventivo realizado partió de un análisis en retrospectiva, en donde se está tomando la solución al problema técnico que aporta la presente invención para tratar de unir información dispersa en el arte previo que podría haber permitido desarrollar el método reclamado. Sin embargo, no se ha logrado

15
14

establecer una secuencia lógica de enseñanzas en el arte previo que hubieran conducido o motivado inequívocamente a la persona versada en la materia a desarrollar un método para producir anticuerpos policlonales basado en la inmunización de aves, con unos antígenos que no existían en el estado de la técnica y que fueron diseñados por los inventores, como son los antígenos cuya secuencia de aminoácidos corresponde a las reportadas en SEQ ID N° 1, 2, 3, 4, 5 y 6 de la presente solicitud.

De hecho, y respetuosamente, pareciera que en el examen se han tomado elementos en el arte previo, marginalmente relacionados, y se han combinado, sin considerar el arte previo y la presente invención como un todo.

Considero que no es aceptable a quien examina una patente simplemente desglosar sus elementos separadamente y luego buscar referencias en el estado del arte que los incluyan. Contrario al análisis de la Examinadora y como es evidente del análisis del arte previo realizado anteriormente, la única forma en que una persona medianamente versada en la materia podría llegar al método de la presente invención, siguiendo los argumentos que menciona la Examinadora en su examen de fondo, sería al realizar un análisis en retrospectiva una vez conoce la invención aquí reclamada.

Si se analizan las enseñanzas reales de D1 y D2, como se realizó anteriormente, se concluiría fácilmente que una persona del oficio medianamente versada en la materia produciría a la luz de D1 ni consideraría D2, y en el mejor de los casos podría:

- Desarrollar un método de producción de anticuerpos policlonales IgE con las 209 secuencias de oligopéptidos divulgadas en D1;
- Preparar una mezcla de proteínas de ácaros *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, y *Blomia tropicalis* recolectados y someterla a un método para la producción de anticuerpos policlonales IgY.

Sin embargo, ninguna de las enseñanzas de D1 y D2 conducen inequívocamente y sin necesidad de investigación adicional al método aquí reivindicado, por lo que en conclusión, la presente invención reviste nivel inventivo respecto al arte previo.

5. Por todo lo anterior, considero que las objeciones presentadas por la Examinadora en su primer examen de fondo han sido resueltas y por consiguiente solicito respetuosamente que el

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.

Despacho tenga por cumplidos los requisitos de patentabilidad y proceda con la concesión de la patente.

Atentamente,



CARLOS R. OLARTE
C.C. No. 79.782.747 de Bogotá
T.P. 74.295

Anexo:

- Capítulo Reivindicatorio Modificado;
- Hoja Sustituta 36

17/15

CAPÍTULO REIVINDICATORIO MODIFICADO

(Segundo Examen de Fondo)

1. Un método para la producción de anticuerpos policlonales IgY, caracterizado porque comprende las etapas de:
 - a) preparar una composición que comprende al menos un péptido que presenta una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID Nos. 1, 2, 3, 4, 5 y 6;
 - b) hiperinmunizar un ave con más de una inmunización de la composición de la etapa a);
 - c) extraer los anticuerpos policlonales IgY de la yema de huevo puesto por el ave hiperinmunizada de la etapa b); y
 - d) purificar los anticuerpos policlonales IgY extraídos en la etapa c).
2. El método de acuerdo con la Reivindicación 1, en el que la hiperinmunización de la etapa b) se realiza con 3 o más inmunizaciones.
3. El método de acuerdo con la Reivindicación 1, en el que en la etapa a) la preparación de la composición se efectúa por emulsificación del péptido con adyuvante de Freund completo para una primera inmunización en la etapa de hiperinmunización b).
4. El método de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde en la etapa a) la preparación de la composición inmunogénica se efectúa por emulsificación del péptido con adyuvante de Freund incompleto para posteriores inmunizaciones en la etapa de hiperinmunización b).
5. El método de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde en la etapa b) la hiperinmunización se efectúa a gallinas de la línea comercial Hy Line Brown.
6. El método de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde en la etapa b) la hiperinmunización se efectúa a intervalos de 15 días, en los músculos pectorales de las gallinas.
7. El método de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde la extracción de la etapa c) se lleva a cabo empleando cloroformo y buffer fosfato salino para la separación de los anticuerpos de la yema de huevo.
8. El método de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde la purificación de la etapa

18

d) se efectúa empleando una columna de sefarosa CL4B activada con divinilsulfona acoplada con β -Mercapto etanol, en donde el soporte activo se equilibra en tampón de fosfatos adicionado con Na_2SO_4 , y posteriormente se adiciona una dilución de la muestra en tampón de equilibrio, y la elusión de los anticuerpos policlonales IgY se obtiene mediante la adición de un tampón de fosfatos.

9. El método de acuerdo con la Reivindicación 1, que comprende adicionalmente la etapa de marcar los anticuerpos policlonales IgY.

10. El método de acuerdo con la Reivindicación 1, que comprende adicionalmente la etapa de generar inmunoconjugados de los anticuerpos policlonales IgY.

11. El método de acuerdo con la Reivindicación 9, en donde la marcación se efectúa empleando fluorocromos, enzimas, metales preciosos, o ligandos radiomarcados.

12. El método de acuerdo con la Reivindicación 10, en donde los inmunoconjugados se seleccionan del grupo que consiste de inmunoconjugados IgY-nanopartículas de oro e inmunoconjugados IgY-biotina.

13. El método de acuerdo con la Reivindicación 1, que comprende adicionalmente una etapa de validación de los anticuerpos con extractos alérgicos crudos y alérgenos purificados a través de ensayos inmunoquímicos.

14. Anticuerpos policlonales IgY obtenidos por el método de la Reivindicación 1, donde los anticuerpos policlonales IgY son específicos para ácaros.

15. Un kit analítico para detección de ácaros que comprende anticuerpos policlonales IgY obtenidos por el método de la Reivindicación 1, e instrucciones para su uso.

16. Un método para la detección de alérgenos de ácaros en muestras de polvo provenientes de espacios intramuros usando anticuerpos policlonales IgY específicos para las proteínas alérgicas de ácaros intradomiciliarios que comprende los siguientes pasos:

- i) toma de muestras de polvo de ambientes en los cuales este presente o se sospeche están presentes los ácaros intradomiciliarios;
- ii) preparación de extracto de proteínas de las muestras de polvo;
- iii) desarrollo de pruebas inmunoquímicas con anticuerpos policlonales IgY evaluando la presencia de los alérgenos en las muestras colectadas previamente.

17. El método de acuerdo con la Reivindicación 16, en donde en el paso (ii) las muestras se preparan empleando un buffer de extracción (PBS - Tween), agitación, centrifugación y filtración con un filtro de 0,22 μm . usando el sobrenadante y descartando los sólidos retenidos en el filtro.

18. El método de acuerdo con la Reivindicación 16, en donde en el paso (iii) se lleva a cabo el contacto del extracto proteico con anticuerpos policlonales IgY y la detección de los alérgenos de ácaros se efectúa por la correlación del cambio de color o fluorescencia a la presencia de los alérgenos de ácaros.

19. El método de acuerdo con la Reivindicación 16, en donde el paso (iii) comprende el contacto del extracto proteico con anticuerpos policlonales IgY y la detección del alérgeno de manera directa o indirecta.

20. El método de acuerdo con la Reivindicación 16, en donde la etapa (iii) comprende el contacto del extracto proteico con anticuerpos policlonales IgY y la detección del alérgeno se efectúa mediante anticuerpos anti-IgY conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) diluidos 1/1000, y la prueba se revela con sustrato TMB 3,3',5,5'tetrametilenzidina.

21. El método de acuerdo con la Reivindicación 16, en donde la detección del alérgeno de ácaro se efectúa mediante una prueba inmunocromatográfica (lateral Flow Immunoassays) con immunoconjugados seleccionados entre immunoconjugado IgY-nanopartículas de oro coloidal, e immunoconjugado IgY-biotina.

22. Un método para la producción de anticuerpos policlonales IgY, en el que:

a) se prepara una composición que comprende al menos un péptido que presenta una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID Nos. 1, 2, 3, 4, 5 y 6, mediante la emulsificación de al menos uno de dichos péptidos en adyuvante completo de Freund para la primera inmunización y en adyuvante incompleto para las inmunizaciones subsiguientes;

b) hiperinmunizar gallinas ponedoras con la composición inmunogénica de la etapa a), en cuatro inmunizaciones intramuscularmente;

c) extraer los anticuerpos policlonales IgY de la yema de huevo puesto por la gallina mediante emulsificación de la yema con PBS, incubación y centrifugación;

d) purificar los anticuerpos policlonales IgY obtenidos mediante cromatografía de columna tiofílica.

19
20

Anexo No 1.

Secuencias de aminoácidos para los polipeptidos sintéticos.

SEQ ID No. 1: TNACSINGNAPAEIDLRQMR

SEQ ID No. 2 PIRMQGGCGSCWAFSGV

SEQ ID No. 3 DYWIVRNSWDTNWGDNGYGY

SEQ ID No. 4 FRHYDGRTHIQRDNGYQPNY

SEQ ID No. 5 PANFDWRQKTHVNPIRNQG

SEQ ID No. 6 AHFRNLRKGILRGAGYND AQ