

REPÚBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Resolución N° 73945

Ref. Expediente N° NC2019/0012373

Por la cual se deniega una Patente de Invención

EL SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO (E)

en ejercicio de sus facultades legales, en especial de las conferidas en el numeral 24 del artículo 3° del Decreto 4886 de 2011, y

CONSIDERANDO:

Que mediante escrito radicado en esta Superintendencia el 5 de noviembre de 2019, con el N° NC2019/0012373, por VICTORIA MAROUN CORTEZ, entró a fase nacional la solicitud de patente de invención titulada "KIT PARA PRUEBA DE ELISA INDIRECTO A BASE DE HAPTENO NATIVO CRUDO Y CONTROLES LIOFILIZADOS PARA DIAGNÓSTICO CONFIRMATORIO DE BRUCELOSIS BOVINA EN SUERO SANGUÍNEO Y LECHE POR ANIMAL Y DE TANQUE", que corresponde a la solicitud internacional PCT/MX2018/050009 del 5 de abril de 2018.

Que la solicitud fue publicada en la Gaceta de la Propiedad Industrial N° 888 el 1 de abril de 2020, sin que se hubieran presentado oposiciones por parte de terceros.

Que realizado el examen de fondo mediante Oficio N° 5686, notificado el 25 de abril de 2022, se requirió al solicitante en los términos del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina para que presentara respuesta a las observaciones de carácter técnico, relacionadas con la patentabilidad o cumplimiento de los requisitos establecidos por esta Decisión para la concesión de la patente.

Que el solicitante mediante escrito radicado bajo el N° NC2019/0012373 el 6 de septiembre de 2022 respondió oportunamente el requerimiento formulado, mediante escrito radicado bajo el N° NC2019/0012373 el 6 de septiembre de 2022 presentó una descripción modificada y mediante escrito radicado bajo el N° NC2019/0012373 el 6 de septiembre de 2022 presentó las reivindicaciones 1 a 13 que reemplazan las originalmente presentadas. Se aceptan la descripción modificada y el capítulo reivindicatorio modificado, comoquiera que se ajustan a las prescripciones contenidas en el artículo 34 de la Decisión 486.

Que en virtud de lo dispuesto en el artículo 14 de la Decisión 486 expedida por la Comisión de la Comunidad Andina *"Los países miembros otorgarán patentes para las invenciones, sean de producto o de procedimiento, en todos los campos de la tecnología, siempre que sean nuevas, tengan nivel inventivo y sean susceptibles de aplicación industrial"*.

Que en el presente caso las reivindicaciones 1 a 13 incluidas en el radicado bajo el N° NC2019/0012373 el 6 de septiembre de 2022, no cumplen los requisitos indicados. Lo anterior, de acuerdo con las siguientes consideraciones:

Objeto de la invención

El problema planteado en esta solicitud consiste en la necesidad de un kit para la prueba de ELISA indirecto con hapteno nativo crudo (HN), para diagnóstico confirmatorio de



Resolución N° 73945

Ref. Expediente N° NC2019/0012373

brucelosis bovina en suero sanguíneo y leche por animal y de tanque, con el fin de disminuir la obtención de resultados falsos positivos respecto a las pruebas inmunológicas que utilizan el lipopolisacárido (LPS) de *Brucella* sp. como antígeno y un método de prueba de ELISA indirecto para la confirmación de brucelosis bovina.

Para resolver este problema técnico, la solicitud en estudio proporciona un KIT para prueba de ELISA indirecto a base de hapteno nativo para diagnóstico confirmatorio de brucelosis bovina en suero sanguíneo y leche de un animal y de tanque, caracterizado porque comprende:

diez (10) microplacas antigenizadas con hapteno nativo crudo, de 96 pocillos cada una (distribuidos en 12 tiras de 8 pocillos cada tira) de fondo plano y claro, con superficie especialmente tratada para una alta capacidad de adhesión del antígeno, con capacidad máxima de 360 microlitros por pocillo; cinco (5) microplacas de 96 pocillos, sin tratamiento, para realizar la predilución de la muestra; cuatro (4) frascos de sesenta (60) mililitros cada uno con solución de lavado a base de PBS-Tween 20 al 0.05%, diluida en una proporción 1:10; un frasco (1) de cuarenta (40) mililitros de diluyente de la muestra, a base de CABI (Carbonato bicarbonato) a concentración (10 X); un (1) frasco de cincuenta (50) mililitros de diluyente de conjugado, a base de CABI (Carbonato bicarbonato) a concentración (1 X); un (1) frasco de 50 mililitros de sustrato, el cual es una solución de ácido 2,2' – azino - bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS); un (1) vial de un (1) mililitro que consta de 25 microlitros de conjugado concentrado, el cual es una inmunoglobulina G – anti Bovina, conjugada con peroxidasa de rábano producida en cabra, el cual está prediluido en un estabilizador de peroxidasa; un (1) frasco de cincuenta (50) mililitros de solución de parada, la cual es dodecilsulfato sódico (SDS) al 4%; un (1) vial de suero sanguíneo positivo liofilizado; un (1) vial de suero sanguíneo negativo liofilizado; un (1) vial de suero de leche positiva liofilizada; y un (1) vial de suero de leche negativa liofilizada; y en donde todos los viales de controles se presentan para su reconstitución en un (1) mililitro de agua destilada.

Determinación del estado de la técnica

La fecha para determinar el estado de la técnica es el 6 de abril de 2017 que corresponde a la fecha de presentación de la solicitud de prioridad.

Consultadas las fuentes de información con que se cuenta, se encontraron los siguientes documentos que anticipan el objeto de esta solicitud:

Ítem	Documento	Título	Fecha de Publicación
D1	Alonso-Urmeneta B., et al. <i>Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology</i> .	“Evaluation of Lipopolysaccharides and Polysaccharides of Different Epitopic Structures in the Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Brucellosis in Small Ruminants and Cattle”	Noviembre de 1998
D3	Díaz – Aparicio E., et al. <i>Journal of Clinical Microbiology</i> ,	“Comparative Analysis of <i>Brucella</i> Serotype A and M and <i>Yersinia enterocolitica</i> 0:9 Polysaccharides for Serological Diagnosis of Brucellosis in Cattle, Sheep, and Goats.”	Diciembre de 1993



Resolución N° 73945

Ref. Expediente N° NC2019/0012373

El documento D1¹ divulga un método de diagnóstico de brucelosis en muestras de suero sanguíneo de bovinos, ovejas y cabras, usando diferentes antígenos tales como lipopolisacáridos crudos, polisacáridos hidrolíticos O y polisacáridos haptenos nativos (NH), evaluados con la prueba ELISA indirecto, usando anticuerpos policlonales y monoclonales o conjugados de proteína G (Abstract).

El documento D3² divulga la comparación de diferentes haptenos por inmunodifusión radial inversa para el diagnóstico de brucelosis en bovinos, ovejas y en cabras. Donde el hapteno nativo crudo de *B. melitensis* 16M mostró la mayor sensibilidad (89,6 a 97,3 %) independientemente de la especie huésped y permitió diferenciar bovinos, ovinos y caprinos infectados de vacunados (Abstract, Tabla 2, Págs. 3137 – 3139).

Nivel Inventivo (Art. 18 Decisión 486)

Según lo dispuesto en el artículo 18 de la Decisión 486: *“Se considerará que una invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica”*.

En el presente caso, el kit reclamado en la solicitud no tiene nivel inventivo, teniendo en cuenta que la reivindicación 1 está referida a: *“KIT para prueba de ELISA indirecto a base de hapteno nativo para diagnóstico confirmatorio de brucelosis bovina en suero sanguíneo y leche de un animal y de tanque, caracterizado porque comprende: (...)”* (Radicado N° NC2019/0012373 del 6 de septiembre de 2022).

La siguiente tabla presenta la comparación entre las características técnicas esenciales de la solicitud estudiada, mencionadas en la reivindicación 1, y las reveladas en los documentos D1 y D3 que representan el estado de la técnica:

Tabla 1. Comparación de las características técnicas esenciales, con las del estado de la técnica:

Características esenciales	D1	D3
KIT para prueba de ELISA indirecto a base de hapteno nativo para diagnóstico confirmatorio de brucelosis bovina en suero sanguíneo y leche de un animal y de tanque, caracterizado porque comprende	Materiales y métodos para prueba de ELISA indirecto con hapteno nativo como antígeno de <i>Brucella</i> sp. (Pág. 750, Sección iELISA).	Test serológico para el diagnóstico de brucelosis en suero sanguíneo de bovinos, ovinos y caprinos usando hapteno nativo crudo sin purificar de <i>B. melitensis</i> 16M (Pág. 3137, Col. Der, Sección Serological tests; Pág. 3138, Sección – Results, Sensitivity of precipitation tests with different polysaccharide preparations and sera from infected animals, y– Pág. 3139, Col. Der. Sección – Discussion, Tabla 2).

¹Alonso-Urmeneta B., et al. (1998). Evaluation of Lipopolysaccharides and Polysaccharides of Different Epitopic Structures in the Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Brucellosis in Small Ruminants and Cattle. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 5(6). Recuperado desde: <https://dadun.unav.edu/bitstream/10171/29425/1/Evaluation%20of%20lipopolysaccharides.pdf>

²Díaz-Aparicio E., et al. (1993). Comparative Analysis of *Brucella* Serotype A and M and *Yersinia enterocolitica* 0:9 Polysaccharides for Serological Diagnosis of Brucellosis in Cattle, Sheep, and Goats. *Journal of Clinical Microbiology*. 31(12), p. 3136 3141. Recuperado de: <https://dadun.unav.edu/bitstream/10171/29443/1/Comparative%20analysis.pdf>



Resolución N° 73945

Ref. Expediente N° NC2019/0012373

diez (10) microplacas antigenizadas con hapteno nativo crudo, de 96 pocillos cada una (distribuidos en 12 tiras de 8 pocillos cada tira) de fondo plano y claro, con superficie especialmente tratada para una alta capacidad de adhesión del antígeno, con capacidad máxima de 360 microlitros por pocillo;	Microplaca con 96 pocillos standard de poliestireno con solución madre de extracto de antígeno (HN purificado). Se utilizaron dos marcas diferentes de pocillos y no se encontraron diferencias significativas entre ellas. Se trató la superficie de los pocillos con dos soluciones de recubrimiento: solución carbonato/bicarbonato y solución salina fosfatada y se incubó toda la noche para adhesión del antígeno (Pág. 750, Sección iELISA)	Se usa hapteno nativo crudo sin purificar de <i>B. melitensis</i> 16M (Pág. 3136, Col. Der, Sección Crude NH, Pág. 3137, Sección – Serological Test; Pág. 3138, Sección – Results, Sensitivity of precipitation tests with different polysaccharide preparations and sera from infected animals, y– Pág. 3139, Col. Der. Sección – Discussion, Tabla 2).
cinco (5) microplacas de 96 pocillos, sin tratamiento, para realizar la predilución de la muestra;	Pre-dilución de la muestra de suero (Pág. 750, Sección iELISA). No menciona microplacas sin tratamiento	No menciona
cuatro (4) frascos de sesenta (60) mililitros cada uno con solución de lavado a base de PBS-Tween 20 al 0.05%, diluida en una proporción 1:10;	Solución de lavado con PBS Tween 20 al 0.05% (Pág. 750, Sección iELISA).	
un frasco (1) de cuarenta (40) mililitros de diluyente de la muestra, a base de CABI (Carbonato bicarbonato) a concentración (10 X);	Solución de lavado con PBS Tween 20 al 0.05% (Pág. 750, Sección iELISA).	
un (1) frasco de cincuenta (50) mililitros de diluyente de conjugado, a base de CABI (Carbonato bicarbonato) a concentración (1 X);	Solución de lavado con PBS Tween 20 al 0.05% (Pág. 750, Sección iELISA).	
un (1) frasco de 50 mililitros de sustrato, el cual es una solución de ácido 2,2' – azino - bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS);	Se utilizó ácido 2,2' – azino - bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) como sustrato (Pág. 750, Sección iELISA)	
un (1) vial de un (1) mililitro que consta de 25 microlitros de conjugado concentrado, el cual es una inmunoglobulina G – anti Bovina, conjugada con peroxidasa de rábano producida en cabra, el cual está prediluido en un estabilizador de peroxidases;	Se utilizaron cuatro conjugados: i) inmunoglobulina G anti-oveja policlonal conjugada con peroxidasa de especificidad de cadena pesada y ligera, ii) inmunoglobulina G anti bovina policlonal conjugada con peroxidasa de especificidad de cadena pesada y ligera, iii) anticuerpo monoclonal inmunoglobulina G1 anti-rumiante conjugado con peroxidasa y iv) proteína G recombinante (que reacciona con la IgG de rumiantes) conjugada con peroxidasa (Pág. 750, Sección iELISA). No menciona el estabilizador de peroxidases.	
un (1) frasco de cincuenta (50) mililitros de solución de parada, la cual es	No menciona	

Resolución N° 73945

Ref. Expediente N° NC2019/0012373

dodecilsulfato sódico (SDS) al 4%;		
un (1) vial de suero sanguíneo positivo liofilizado; un (1) vial de suero sanguíneo negativo liofilizado;	Control negativo de suero (Pág. 750, Sección iELISA). No menciona que sea liofilizado	
un (1) vial de suero de leche positiva liofilizada;	Control positivo de suero sanguíneo de un animal infectado (Pág. 750, Sección iELISA). No menciona que sea liofilizado ni menciona suero de leche.	
y un (1) vial de suero de leche negativa liofilizada;	No menciona	
y en donde todos los viales de controles se presentan para su reconstitución en un (1) mililitro de agua destilada.	No menciona	

El documento D1 se considera el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 1 porque divulga un método para realizar la prueba ELISA indirecto que emplea hapteno nativo como antígeno (Pág. 750) para detectar la presencia de anticuerpos de *Brucella sp.* en muestras de suero de ganado, ovejas y cabras con el fin de identificar a los animales que padecen brucelosis (Págs. 749 y 750); este documento también divulga que los materiales y métodos para realizar la prueba son: 96 pocillos de poliestireno con NH purificado, pretratados para favorecer la adhesión del antígeno, PBS-Tween 20 al 0.05% para diluir las muestras y los conjugados y como solución de lavado, substrato (ABTS), cuatro tipos de conjugados, un control positivo y un control negativo (Pág. 750, Sección iELISA).

La diferencia entre la invención definida en la reivindicación 1 y el método divulgado de D1 consiste en el uso de hapteno crudo, las microplacas sin tratamiento para la dilución de la muestra, la solución de parada (SDS al 4%), los controles positivos y negativos liofilizados, tanto de suero como de leche y los viales de los controles son reconstituidos en agua destilada.

No hay efecto asociado a incluir el hapteno nativo crudo en un kit de prueba de ELISA indirecto ni de incluir microplacas sin tratamiento para la dilución de la muestra, solución de parada (SDS al 4%), controles positivos y negativos liofilizados, tanto de suero como de leche y que los viales de los controles sean reconstituidos en agua destilada, ya que la dilución de la muestra previo a la prueba se puede realizar en materiales diferentes a microplacas sin tratamiento, la prueba produce resultados confiables sin el uso de SDS al 4% como solución de parada según lo demostrado en D1 y los controles liofilizados que previamente a la prueba son reconstituidos en agua destilada son ampliamente conocidos y utilizados en la rutina para llevar a cabo diferentes tipos de pruebas de laboratorio dado que para garantizar la confiabilidad de los resultados los mismos deben ser incluidos en el test, así mismo, no se evidencia en el capítulo descriptivo ejemplos o pruebas que demuestren un efecto técnico asociado a las diferencias descritas.

Por lo tanto, el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: ¿Cómo modificar los materiales para la prueba de ELISA indirecto conocidos en D1 con el fin de obtener un kit alternativo?



Resolución N° 73945

Ref. Expediente N° NC2019/0012373

Sin embargo, el incluir hapteno crudo en un procedimiento para diagnosticar brucelosis en bovinos con el fin de mejorar la confiabilidad ya está divulgado en el documento D3 que se refiere a la comparación de diferentes haptenos por inmunodifusión radial inversa para el diagnóstico de brucelosis en bovinos, ovejas y en cabras. Donde el hapteno nativo crudo de *B. melitensis* 16M mostró la mayor sensibilidad (89,6 a 97,3 %) independientemente de la especie huésped y permitió diferenciar bovinos, ovinos y caprinos infectados de vacunados, además de permitir que las 95 muestras de bovinos libres de brucelosis fueran negativas en dicha prueba, con resultados similares para sueros de ovejas y cabras, por lo cual los resultados fueron confiables (Abstract, Tabla 2, Pág. 3137, Sección – Serological Test; Pág. 3138, Sección – Results, Sensitivity of precipitation tests with different polysaccharide preparations and sera from infected animals y Pág. 3139, Col. Der. Sección - Discussion).

Además, D3 menciona que el hapteno nativo crudo sin tratamiento de purificación de *B. melitensis* 16M es fácil de obtener en comparación con extracción de los polisacáridos, además que este funciona mejor en el diagnóstico de brucelosis para vacas, ovejas y cabras (Pág. 3139, Col. Der., Párr. 1; Tabla 2).

En consecuencia, la persona normalmente versada en la materia estaría motivada a incluir el hapteno crudo del documento D3 en el método de D1, además de una microplaca sin tratamiento para diluir las muestras, para así llegar al objeto de la reivindicación 1. Por lo cual se considera obvia.

Adicionalmente, el documento D1 menciona que los controles negativo y positivo empleados en el método demostraron ser adecuados para permitir la interpretación de los resultados aun cuando no menciona que fueron liofilizados (Págs. 751 y 752, Figs. 2 y 3), así mismo, los resultados se expresan como la DO a 405 nm del suero de control positivo o como el porcentaje de la DO a 405 nm del control positivo en la dilución que ofrezca la mejor discriminación entre los animales vacunados y los animales infectados (Pág. 750). Este documento no menciona el uso de una microplaca sin tratamiento para la predilución de las muestras, pero si menciona la necesidad de diluir las muestras antes de la distribución en la placa antigenizada (Pág. 750). Finalmente, cabe mencionar que incluir controles positivos y negativos liofilizados y la reconstitución de los controles con agua destilada, ya está divulgado en la literatura³. Así como el emplear dodecilsulfato sódico (SDS) como solución de parada en las pruebas ELISA indirecto para determinar infección por *Brucella sp.* en bovinos es ampliamente conocido en la técnica⁴ por lo que tampoco aporta nivel inventivo a la materia reclamada.

La reivindicación dependiente 2 no mencionan alguna característica que, junto con las características de la reivindicación independiente, aporte nivel inventivo al kit de prueba de ELISA indirecto de la reivindicación 1, por lo cual se considera que no tiene nivel inventivo.

En el presente caso, el procedimiento reclamado en la solicitud no tiene nivel inventivo, teniendo en cuenta que la reivindicación 3 está referida a: *“Procedimiento de Prueba de ELISA indirecto a base de hapteno nativo para diagnóstico confirmatorio de brucelosis bovina en suero sanguíneo y leche de un animal y de tanque, caracterizado porque*

³ DRG International Inc., USA. (2012). DRG® Brucella ELISA (bovine) (EIA-2497 : 96 wells / EIA-5487: 480 wells). Vers. 8.1. Recuperado desde: <https://www.yumpu.com/en/document/view/24689225/eia-2497-96-wells-eia5487-480-wellsdrg-internationa>

⁴ Padilla Poester F., et al. (2000). The serological response of adult cattle after vaccination with *Brucella abortus* strain 19 and RB51. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 37(1). (Pág. 2). Recuperado desde: <https://www.scielo.br/bjvras/a/QRfDDqLyfVFXc8tP9H8HWJK/?lang=en>



Resolución N° 73945

Ref. Expediente N° NC2019/0012373

comprende las etapas de: (...)” (Radicado N° NC2019/0012373 del 6 de septiembre de 2022).

La siguiente tabla presenta la comparación entre las características técnicas esenciales de la solicitud estudiada, mencionadas en la reivindicación 3, y las reveladas en los documentos D1 y D3 que representan el estado de la técnica:

Tabla 2. Comparación de las características técnicas esenciales, con las del estado de la técnica:

Características esenciales	D1	D3
Procedimiento de Prueba de ELISA indirecto a base de hapteno nativo para diagnóstico confirmatorio de brucelosis bovina en suero sanguíneo y leche de un animal y de tanque, caracterizado porque comprende las etapas de:	Procedimiento de prueba de ELISA indirecta a base de hapteno nativo purificado, obtenido de <i>B. melitensis</i> 16M, para diagnóstico confirmatorio de brucelosis bovina en suero sanguíneo (Pág. 750, Sección iELISA).	Test serológico para el diagnóstico de brucelosis en suero sanguíneo de bovinos, ovinos y caprinos (Pág. 3137 – 3139, Tabla 2).
Distribuir un diluyente de muestra a cada pocillo en una microplaca de predilución;	Pre-dilución de la muestra de suero (Pág. 750, Sección iELISA).	No menciona
Agregar un control negativo en los pocillos A1 y B1; y un control positivo en los pocillos C1 y D1;	Agregar el control negativo en algunos pocillos de cada placa, así mismo, con el control positivo (Pág. 750, Sección iELISA).	
Agregar una muestra de suero sanguíneo o leche en los pocillos restantes; Tomar las muestras y controles diluidos en la microplaca de pre-dilución;	Agregar el control negativo en algunos pocillos de cada placa, así mismo, con el control positivo Adicionar 100 µL de cada muestra diluida de suero sanguíneo en los pocillos restantes (Pág. 750, Sección iELISA).	
Pasar las muestras y controles diluidos a una microplaca antigenizada con hapteno nativo;	La placa que lleva las muestras y los controles diluidos está previamente antigenizada con hapteno nativo purificado (Pág. 750, Sección iELISA).	
Incubar la microplaca antigenizada;	La placa es incubada 1h a 37°C (Pág. 750, Sección iELISA).	
Lavar cada pocillo con una solución de lavado previamente diluida y eliminar el exceso de solución;	Cada pozo es lavado cuatro veces con solución de lavado (PBS Tween 20 al 0.05%) (Pág. 750, Sección iELISA).	
Agregar un conjugado previamente diluido a cada pocillo;	Agregar un conjugado previamente diluido a una dilución 1:1000 o 1:2000 a cada pocillo (Se utilizaron cuatro conjugados: i) inmunoglobulina G anti-oveja policlonal conjugada con peroxidasa de especificidad de cadena pesada y ligera, ii) inmunoglobulina G anti bovina	

Resolución N° 73945

Ref. Expediente N° NC2019/0012373

	policlonal conjugada con peroxidasa de especificidad de cadena pesada y ligera, iii) anticuerpo monoclonal inmunoglobulina G1 anti-rumiante conjugado con peroxidasa y iv) proteína G recombinante (que reacciona con la IgG de rumiantes) conjugada con peroxidasa). (Pág. 750, Sección iELISA).	
Incubar la microplaca;	La placa es incubada 1h a 37°C (Pág. 750, Sección iELISA).	
Lavar cada pocillo con una solución de lavado previamente diluida y eliminar el exceso de solución;	Lavar cada pocillo con una solución de lavado diluida y eliminar exceso de solución (Pág. 750, Sección iELISA).	
Agregar un sustrato a cada pocillo;	Se agrega 100 µL del sustrato ácido 2,2' – azino - bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS) en cada pozo (Pág. 750, Sección iELISA)	
Incubar la microplaca;	Incubar la microplaca durante 15 minutos a temperatura ambiente (20°C) en oscuridad (Pág. 750, Sección iELISA).	
Distribuir una solución de parada en cada pocillo y leer una densidad óptica;	Leer la microplaca a 405 nm (Pág. 750, Sección iELISA). No menciona solución de parada.	
Y en donde el hapteno nativo se emplea crudo, y es obtenido de una cepa de <i>Brucella melitensis</i> 16M, sin ningún tratamiento de purificación.	Y en donde el hapteno nativo se emplea purificado, y es obtenido de una cepa de <i>Brucella melitensis</i> 16M (Pág. 750, Sección iELISA).	usando hapteno nativo crudo sin purificar de <i>B. melitensis</i> 16M (Pág. 3136, Col. Der., Sección Crude NH, Pág. 3137 – 3139, Tabla 2).

El documento D1 se considera el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 3 porque divulga un procedimiento para realizar la prueba ELISA indirecto que emplea hapteno nativo de *B. melitensis* 16M como antígeno (Pág. 750, Sección iELISA) para detectar la presencia de anticuerpos de *Brucella* sp. en muestras de suero de ganado, ovejas y cabras con el fin de identificar a los animales que padecen brucelosis (Págs. 749 y 750). Donde se usa como sustrato ácido 2,2' – azino - bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS), el conjugado es diluido a una dilución 1:1000 o 1:2000 y la lectura de la microplaca es leída a 405 nm (Pág. 750, Sección iELISA).

La diferencia entre la invención definida en la reivindicación 3 y el procedimiento de prueba ELISA divulgado en D1 consiste en el uso de hapteno nativo crudo sin ningún tratamiento de purificación de *B. melitensis* 16M y el uso de la solución de parada.

No hay efecto asociado a incluir el hapteno nativo crudo en un procedimiento de prueba de ELISA indirecto ni de incluir una solución de parada (SDS al 4%), ya que la prueba

Resolución N° 73945

Ref. Expediente N° NC2019/0012373

produce resultados confiables sin el uso de SDS al 4% como solución de parada según lo demostrado en D1 (Págs. 749 y 750).

Por lo tanto, el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: ¿Cómo modificar el procedimiento de prueba ELISA conocido en D1 con el fin de obtener un procedimiento alternativo?

Sin embargo, el incluir hapteno nativo crudo sin ningún tratamiento de purificación de *B. melitensis* 16M, en un procedimiento para diagnosticar brucelosis en bovinos, para mejorar la confiabilidad ya está divulgado en el documento D3 que se refiere a la comparación de diferentes haptenos por inmunodifusión radial inversa para el diagnóstico de brucelosis en bovinos, ovejas y en cabras. Donde el hapteno nativo crudo de *B. melitensis* 16M mostró la mayor sensibilidad (89,6 a 97,3 %) independientemente de la especie huésped y permitió diferenciar bovinos, ovinos y caprinos infectados de vacunados, además de permitir que las 95 muestras de bovinos libres de brucelosis fueran negativas en dicha prueba, con resultados similares para sueros de ovejas y cabras, por lo cual los resultados fueron confiables (Abstract, Tabla 2, Págs. 3137 – 3139).

Además, D3 menciona que el hapteno nativo crudo sin tratamiento de purificación de *B. melitensis* 16M es fácil de obtener en comparación con extracción de los polisacáridos, mencionando que este funciona mejor en el diagnóstico de brucelosis para vacas, ovejas y cabras (Pág. 3139, Col. Der., Párr. 1; Tabla 2).

Adicionalmente, el uso de solución de parada está ampliamente descrito en la literatura⁴, así como la dilución de las muestras sin necesidad de una microplaca de tratamiento para lo cual se puede usar diferentes tipos de recipiente. Los volúmenes que se distribuyen de las muestras y de las soluciones en la microplaca dependen de la concentración de estas.

En consecuencia, la persona normalmente versada en la materia estaría motivada a incluir el hapteno nativo crudo sin tratamiento de purificación de *B. melitensis* 16M del documento D3 en el procedimiento de D1, para así llegar al objeto de la reivindicación 3. Por lo cual se considera obvia.

Las reivindicaciones dependientes 4 a 13 no mencionan alguna característica que, junto con las características de la reivindicación independiente, aporte nivel inventivo al procedimiento de la reivindicación 3, por lo cual se considera que no tienen nivel inventivo.

Respuesta a los argumentos del solicitante

En referencia al argumento del solicitante, según el cual menciona “a. En cuanto a los requisitos de patentabilidad, ese Despacho considera que la altura inventiva de las Reivindicaciones 1, 3 y 6 está afectada por la combinación de los documentos D1 (Alonso-Urmeneta B., et al. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*) y D3 (Díaz – Aparicio E., et al. *Journal of Clinical Microbiology*).

b. En respuesta a la observación del Despacho, respetuosamente expongo mi desacuerdo y presento las siguientes aclaraciones que demuestran que el Kit y el método reclamados por la solicitante, en las nuevas Reivindicaciones 1 y 3 y sus dependientes, no es obvio ni derivado de manera evidente a partir de los documentos D1 y D3 citados para afectar la patentabilidad del mismo.



Resolución N° 73945

Ref. Expediente N° NC2019/0012373

En primer lugar es preciso aclarar cuál es el objeto de los documentos citados por ese Despacho. En cuanto al documento D1, se tiene que éste evaluó la eficacia de la prueba ELISA indirecto con tres antígenos específicos: LPS, LPS-O y HN purificado, buscando las estructuras epitópicas (Epítomos A, M y C) para diagnosticar Brucella en pequeños rumiantes y ganado.

Referente al antígeno HN purificado, D1 en su discusión menciona y concluye que “el Hapteno Nativo en su forma purificada utilizado en su ELISA indirecta, no es el antígeno óptimo en ensayos de inmunoabsorción para brucelosis” dado que, no muestra diferencias significativas en comparación con sus ELISAS de LPS y PS, por lo tanto, concluyen que “su método no es capaz de identificar falsos positivos (FPSR)”.

Esta es una de las diferencias sustanciales de la presente invención frente a D1, toda vez que la invención emplea el Hapteno Nativo crudo y demuestra que el efecto técnico es permitir disminuir significativamente los falsos positivos (FPSR) y los falsos negativos. Como bien se muestra en la figura 5 de la presente solicitud, que 741 animales son positivos a las pruebas convencionales; por lo tanto, con la presente invención se evitará la eliminación de 355 animales, que representan el 47,9% de los falsos positivos detectados en dichas pruebas convencionales, siendo una alta diferencia significativa. En este punto cabe señalar que no se debe comparar la diferencia en el beneficio del presente kit entre 14,02% y 15,24%, dado que estos son porcentajes con base en el total de animales (n= 2533), evaluados en las pruebas de la presente invención.

Dado que existe un amplio rango de titulación de anticuerpos, el valor de los controles es la referencia para determinar el punto de corte de una ELISA y, a partir de dicho valor, se emiten los resultados falsos y verdaderos de una ELISA, teniendo un efecto sorprendente en la presente solicitud. En el documento D1, no se puede realizar una comparación, puesto que dicho documento solo menciona que se utilizaron como controles sueros positivos y negativos apropiados para cada especie animal, sin mostrar un procedimiento para determinar y documentar el Valor de las Densidades Ópticas de los controles positivos y negativos. Así, adicional al empleo de HN crudo, la innovación de la presente invención, consiste en que aporta el RANGO exacto de la Densidad Óptica (OD) absorbancias leídas a 405 nm para la selección de los controles liofilizados, la cual es = OD >1 para Controles Positivos y OD 0.20 - 0.28 para Controles Negativos. Así como, cuando dichos controles liofilizados sean utilizados en la ELISA, deberán presentar una diferencia entre control positivo y negativo ≥ 0.6 y, con base en la lectura de dichas absorbancias y su conversión al porcentaje de positividad, se determinó el punto de corte, siendo, para suero sanguíneo, de 66.5% a 67.5% (negativo= $\leq 66.5\%$, sospechoso= 66.51% a 67.49% y positivo= $\geq 67.5\%$) y, para leche de un animal y de tanque de 7.5 % a 8.0 % (negativo= $\leq 7.5\%$, sospechoso= 7.51% a 7.99% y positivo= $\geq 8.0\%$) (...).”

“(…) Por su parte, el documento D3 divulga que el hapteno nativo crudo de B. melitensis 16M mostró la mayor sensibilidad (89,6 a 97,3 %) independientemente de la especie huésped y permitió diferenciar bovinos, ovinos y caprinos infectados de vacunados. La alta sensibilidad mostrada por el D3 se debe al uso del hapteno nativo crudo, sin PURIFICACIÓN, sin embargo, el método RID utilizado por D3 (inmunodifusión radial inversa) es un método cualitativo e impreciso, y es diferente al método cuantitativo de ELISA indirecto usado en la solicitud.

Por lo tanto, la característica distintiva de la presente invención con respecto al documento D3 es el empleo del hapteno nativo crudo, pero por el método de ELISA indirecto.



Resolución N° 73945

Ref. Expediente N° NC2019/0012373

Es importante notar que nadie ha utilizado el hapteno nativo crudo en ELISA indirecto, todos los autores estudiados realizaron algún procedimiento que alteró la estructura antigénica natural del hapteno nativo. Específicamente D1 usó hapteno nativo purificado restando especificidad antigénica a su estado natural con la consiguiente emisión de un mayor porcentaje de falsos positivos. Lo anterior en un claro indicio de que el empleo del HN crudo en el método RID, que es muy diferente a la prueba de ELISA indirecto, no constituyó, al momento en el que la presente invención NO se conocía, una motivación técnica que llevara a los diversos autores de previos estudios a desarrollar una prueba de ELISA indirecto empleando Hapteno nativo crudo, sin purificar. Si la publicación de D3 hubiese aportado alguna sugerencia a este respecto, de seguro se habrían encontrado en el arte previo publicaciones mostrando el empleo de HN crudo, sin purificar, en la prueba ELISA indirecto. (...)

“(...) Por tanto, el experto en la materia que se enfrenta al problema técnico, no habría considerado las enseñanzas de D3, ni combinado las mismas con D1, ya que ninguno de estos documentos ofrece una solución al problema de falta de especificidad de la prueba ELISA indirecto, identificado en la presente invención.

El efecto técnico de la presente invención proviene del arte de conservar una estructura antigénica lo más completa posible, lo más cercana posible a la naturaleza, que le confiere la mayor especificidad, combinándola con un método cuantitativo de alta sensibilidad que permite un diagnóstico más eficaz, reduciendo el porcentaje de animales falsos positivos, lo que tiene un alto impacto económico en el sector ganadero, evitando la emisión de falsos positivos y falsos negativos en el diagnóstico de brucelosis. Esta combinación logra la solución inventiva: la mayor sensibilidad del método ELISA indirecto con la mayor especificidad del antígeno hapteno nativo crudo (sin purificación).

Ese Despacho debe tener en cuenta que el objeto de la presente invención es precisamente la de conservar una estructura antigénica lo más completa posible, SIN PURIFICAR, es decir, es lo más cercano a la naturaleza, y que, gracias a la presencia de estas impurezas, se genera una reacción antígeno-anticuerpo que, con base en la referencia de las densidades ópticas indicadas para los controles, es capaz de arrojar resultados de mayor confiabilidad y eficiencia en el diagnóstico.

“(...) Así entonces, considero que se ha aportado información suficiente que demuestra la altura inventiva del KIT para prueba de ELISA indirecto y el procedimiento de prueba de ELISA indirecto, Reivindicaciones 1 y 3, respectivamente, de la presente invención, respetuosamente solicito el retiro de las observaciones planteadas y se proceda con la concesión del privilegio solicitado”.

Se aclara que, el capítulo reivindicatorio del escrito radicado bajo el número N° NC2019/0012373 del 6 de septiembre de 2022 no cumple con el requisito de nivel inventivo, tal como se señaló en el análisis de patentabilidad. En primer lugar, esta oficina reconoce que la diferencia entre el documento D1 y la materia reclamada en la solicitud es el uso de hapteno nativo crudo de la cepa *B. melitensis* 16M, sin embargo, el uso de este hapteno no representa ningún efecto asociado, pues en ningún momento se compara el kit de ELISA con hapteno nativo purificado frente al que usa hapteno nativo crudo.

Como se muestra en el capítulo descriptivo, la comparación que se realizó es con pruebas convencionales que miden anti LPS-O, por lo tanto, el hecho de que el kit permita evitar los falsos positivos no está dado por el hecho de que el hapteno sea crudo y no hay evidencia en el capítulo descriptivo ni en sus ejemplos que permitan realizar esta afirmación (Pág. 19).



Resolución N° 73945

Ref. Expediente N° NC2019/0012373

En este sentido, lo que se atribuye a la detección del 15,24% de falsos positivos que se realiza a través del uso de kit se debe a que el mismo tiene hapteno nativo y no LPS-O (Fig. 5).

Pero un método para realizar la prueba ELISA indirecto que emplea hapteno nativo como antígeno (Pág. 750) para detectar la presencia de anticuerpos de *Brucella sp.* en muestras de suero de ganado, ovejas y cabras con el fin de identificar a los animales que padecen brucelosis ya está divulgado en D1 (Págs. 749 y 750), por lo cual la materia reclamada carece de nivel inventivo, de tal forma que una persona normalmente versada en la materia estaría motivada a usar el método descrito en D1, ya que permite la detección de Brucelosis en ganado. Así mismo, el problema planteado en esta solicitud que consiste en la necesidad de un kit para la prueba de ELISA indirecto con hapteno nativo crudo (HN), para diagnóstico confirmatorio de brucelosis bovina en suero sanguíneo y leche animal y de tanque, con el fin de disminuir la obtención de resultados falsos positivos respecto a las pruebas inmunológicas que utilizan el lipopolisacárido (LPS) de *Brucella sp.* como antígeno y un método de prueba de ELISA indirecto para la confirmación de brucelosis bovina, ya estaría resuelto en D1, pues el uso del hapteno permitió la detección de casos de Brucelosis en muestras de suero de ganado, ovejas y cabras (Págs. 749 y 750).

Pese a que D1 indica que el hapteno nativo no es el antígeno más óptimo en los ensayos inmunoabsorbentes para brucelosis, señala que esto podría ser debido al tipo de epítomos presentes en el hapteno nativo en relación a los encontrados en LPS, que podría darse por la existencia de anticuerpos para diagnósticos específicos para diferente tipo de epítomos, además, se sugiere que los resultados menos satisfactorios por el uso de hapteno está dado por la adsorción de poliestireno, pues dependiendo de las condiciones, el hapteno nativo y los PS muestran diferente encuadración al poliestireno y de hecho D1 menciona que no tienen la explicación exacta por la cual el desempeño del hapteno nativo no fue satisfactorio (Pág. 753, Col. Izq y Col. Der); aun así, el hapteno nativo permitió detectar brucelosis para el biotipo 1 y 3 en ovejas, el biotipo 1 y 3 en bovinos y el biotipo 1 de cabras, este último con el 100% de los casos (Tabla 2), por lo cual, el hapteno nativo ya era sugerido para su uso en una prueba de ELISA en dicho documento. Así las cosas, se reitera que la diferencia entre la invención y D1 está dada por el uso del hapteno crudo, el cual como se mencionó anteriormente no fue comparado con el hapteno purificado por el solicitante y en este caso no está probada la ventaja del uso de este con los resultados presentados por el solicitante.

De otra parte, el incluir hapteno crudo en un procedimiento para diagnosticar brucelosis en bovinos con el fin de mejorar la confiabilidad ya está divulgado en el documento D3 que se refiere a la comparación de diferentes haptenos por inmunodifusión radial inversa para el diagnóstico de brucelosis en bovinos, ovejas y en cabras. Donde el hapteno nativo crudo de *B. melitensis* 16M mostró la mayor sensibilidad (89,6 a 97,3 %) independientemente de la especie huésped y permitió diferenciar bovinos, ovinos y caprinos infectados de vacunados, además de permitir que las 95 muestras de bovinos libres de brucelosis fueran negativas en dicha prueba, con resultados similares para sueros de ovejas y cabras, por lo cual los resultados fueron confiables (Abstract, Tabla 2, Pág. 3137, Sección – Serological Test; Pág. 3138, Sección – Results, Sensitivity of precipitation tests with different polysaccharide preparations and sera from infected animals y Pág. 3139, Col. Der. Sección - Discussion). Lo que indica, que el uso de hapteno nativo crudo permite distinguir falsos positivos y pese a que el solicitante argumenta que D3 no habla de una prueba ELISA, debe mencionarse que describe la técnica de inmunodifusión radial inversa la cual también es una prueba inmunológica y una persona



Resolución N° 73945

Ref. Expediente N° NC2019/0012373

normalmente versada en la materia estaría motivada a usar hapteno nativo crudo en otro test inmunológico para detectar brucelosis como es el caso de un ELISA indirecto. Por tanto es claro que ante las enseñanzas de D1 y D3 la materia reclamada carece de nivel inventivo.

En relación con los controles positivos y negativos reclamados junto al kit, debe enfatizarse que el solicitante dice que lo que hace diferentes dichos controles es el ajuste de las lecturas de absorbancia realizadas a 405 nm, sin embargo, esta condición técnica no resulta esencial de acuerdo con lo presentado en el último capítulo reivindicatorio pues es incluida en una reivindicación dependiente. Así, de acuerdo con los argumentos del solicitante, las absorbancias determinadas en los controles a 405 nm eran esenciales para el método y por tanto debían ser incluidas en la reivindicación independiente. Así las cosas, D1 también usa un control positivo y un control negativo que les resulta favorable para la validez de la prueba de ELISA, por lo cual no se observa el efecto técnico sorprendente de los controles reclamados por el solicitante. Adicionalmente, D1 menciona que para evaluar la reproducibilidad de la prueba, los lotes de placas se recubrieron simultáneamente, secaron, sellaron y fueron almacenados a 4°C, donde los controles con sueros positivos y negativos mostraron que bajo estas condiciones las placas fueron estables durante varios meses (Pág. 750, Col. Izq, sección – iELISA), por lo cual contrario a lo afirmado por el solicitante, de manera implícita en D1 se tuvieron que haber evaluado cuales eran las absorbancias correctas para poder determinar que era negativo y positivo frente a los controles y darle validez al test.

El solicitante menciona que el hapteno nativo purificado pierde su estructura antigénica, pero no proporciona evidencia de que esto en realidad ocurra y que esto lo haga desventajoso frente al hapteno nativo crudo, además como se mencionó previamente, tampoco se presenta evidencia de que sea el uso del hapteno nativo crudo específicamente lo que permite distinguir los falsos positivos, dado que nunca se comparan estos dos tipos de haptenos y por el contrario, se usa hapteno vs LPS (Fig. 5), lo cual permite sugerir que el hapteno nativo (y no específicamente hapteno nativo crudo) es lo que le daría dicho efecto, pero D1 ya usa hapteno nativo de *B. melitensis* 16M. Por tanto, los resultados que se reclaman de mayor confiabilidad de la prueba parecen estar dados por el uso de hapteno nativo vs LPS, así, ante las enseñanzas de D1 y D3 la invención carece de nivel inventivo.

El solicitante finalmente menciona que, *"Teniendo en cuenta que el solicitante ha atendido de manera completa al requerimiento, modificando las Reivindicaciones para remover obstáculos de claridad y demostrando el cumplimiento del requisito de nivel inventivo de conformidad con el Artículo 18 de la Decisión 486, respetuosamente solicito se proceda a conceder la patente de invención a las Reivindicaciones 1 a 13 que presento en esta oportunidad. En el evento de subsistir cualquier objeción, solicito se emita un nuevo examen con el ánimo de corregirla"*

Esta Oficina aclara que ya se han realizado 3 exámenes de patentabilidad, y que esta Oficina no considera necesario realizar un cuarto examen de patentabilidad, teniendo en cuenta que no se presentó una modificación sustancial del capítulo reivindicatorio, ni el pago de la tasa correspondiente a un nuevo examen de patentabilidad; además de que es posible seguir empleando los documentos citados en el Oficio N° 5686, ante los cuales el solicitante ya tuvo la oportunidad de exponer sus argumentos.

Que de acuerdo con la modificación presentada por el solicitante en el escrito radicado bajo el NC2019/0012373 el 11 de marzo de 2022 y teniendo en cuenta el objeto de la solicitud,

Resolución N° 73945

Ref. Expediente N° NC2019/0012373

se modifica el título de la invención el cual quedará de la siguiente manera: “KIT PARA PRUEBA DE ELISA INDIRECTO QUE DETECTA ANTICUERPOS CONTRA HAPTENO NATIVO CRUDO Y MÉTODO DE ELISA INDIRECTO PARA DIAGNÓSTICO CONFIRMATORIO DE BRUCELOSIS BOVINA EN SUERO SANGUÍNEO Y LECHE”.

En conclusión, teniendo en cuenta que los argumentos del solicitante no desvirtúan de manera alguna las objeciones a la patentabilidad ya sustentadas, el Superintendente de Industria y Comercio (E),

RESUELVE

ARTÍCULO 1: Denegar la patente de invención a la creación titulada “KIT PARA PRUEBA DE ELISA INDIRECTO QUE DETECTA ANTICUERPOS CONTRA HAPTENO NATIVO CRUDO Y MÉTODO DE ELISA INDIRECTO PARA DIAGNÓSTICO CONFIRMATORIO DE BRUCELOSIS BOVINA EN SUERO SANGUÍNEO Y LECHE”.

ARTÍCULO 2: Notificar el contenido de la presente resolución a VICTORIA MAROUN CORTEZ, advirtiéndole que contra ella procede el recurso de reposición, ante el Superintendente de Industria y Comercio, el cual podrá ser interpuesto en el momento de la notificación o dentro de los diez (10) días hábiles siguientes a ella.

NOTIFÍQUESE Y CÚMPLASE

Dada en Bogotá D.C., el 24 de octubre de 2022



Firmado digitalmente
por: JUAN CAMILO
DURAN TELLEZ
Fecha: 2022.10.24
09:03:14 COT
Razón: Validez jurídica.
Ubicación: Bogotá,
Colombia.

