

Sres.

Superintendencia de Industria y Comercio Dirección de Nuevas Creaciones

E. S. D

Re: Expediente No. NC2022/0007674

Solicitud de patente de invención titulada: “ANTICUERPOS IGY NANOCONJUADOS PARA LA DETECCIÓN DE LA ENFERMEDAD RENAL”

Solicitantes: UNIVERSIDAD SIMÓN BOLÍVAR

RESPUESTA AL OFICIO No. 19968 de 11 de noviembre de 2025

(PRIMER EXAMEN DE FONDO)

FREDY SÁNCHEZ MERINO, mayor de edad y vecino de Barranquilla, identificado tal como aparece al pie de mi firma, en mi carácter de apoderado de las instituciones solicitantes, me permito manifestar lo siguiente ante el auto emanado por ese Despacho, dentro del plazo legal previsto en el artículo 45 de la Decisión 486, en los siguientes términos:

1. Nos permitimos dar respuesta al Oficio No. 19968 de 11 de noviembre de 2025, dentro del término legal establecido. En atención a las observaciones formuladas por la Dirección de Nuevas Creaciones en relación con la claridad, coherencia interna y sustentación del capítulo reivindicatorio, el solicitante ha procedido a presentar una versión enmendada de dicho capítulo, con el fin de garantizar su plena correspondencia con la descripción y asegurar el cumplimiento de lo dispuesto en los artículos 28 y 30 de la Decisión 486 de 2000.

En la versión enmendada, la reivindicación independiente ha sido reorganizada y reformulada de manera integral, precisa y técnicamente coherente, de modo que en un único cuerpo reivindicatorio se integran de forma expresa y ordenada las etapas esenciales que definen el método para la detección de biomarcadores de daño renal urinario objeto de la invención. Esta reorganización responde a la necesidad de reflejar con mayor claridad la secuencia lógica y funcional de las operaciones técnicas involucradas (desde la obtención de los anticuerpos hasta la detección colorimétrica), evitando dispersiones innecesarias de características esenciales entre distintas reivindicaciones y eliminando posibles ambigüedades en la definición del alcance de la protección solicitada .

De manera particular, la nueva redacción del capítulo reivindicatorio define con mayor precisión la sucesión de etapas relativas a la obtención de anticuerpos IgY a partir de huevos de gallina inmunizada , su purificación mediante técnicas de precipitación selectiva, cromatografía o filtración , la evaluación de especificidad , y la posterior conjugación con nanopartículas de oro o sulfuro de cadmio mediante agentes de acoplamiento o adsorción física para la detección colorimétrica en muestras de orina . Con ello, se refuerza la comprensión objetiva del método reivindicado y la relación

funcional existente entre cada una de sus etapas, sin alterar la naturaleza técnica de la invención originalmente divulgada.

Las reivindicaciones dependientes han sido igualmente ajustadas con el propósito de expresar las características técnicas adicionales mediante parámetros estructurales y configuraciones concretas (como la selección del biomarcador NGAL o el uso de nanopartículas de oro coloidal), evitando la formulación de ventajas o resultados técnicos como si se tratara de características técnicas autónomas. De este modo, se preserva la claridad exigida por el artículo 30 de la Decisión 486 y se mantiene una delimitación precisa del objeto protegido.

Paralelamente, se ha procedido a fortalecer y reorganizar el capítulo descriptivo de la solicitud, mejorando la claridad expositiva y asegurando que la divulgación permita a una persona normalmente versada en la materia ejecutar la invención de manera reproducible, conforme al artículo 28 literal e) de la Decisión 486. Estas modificaciones no implican la incorporación de nueva materia, sino que consisten exclusivamente en la precisión, desarrollo explicativo y sistematización de información técnica sobre la producción de los nanoconjugados y los protocolos de ensayo que ya se encontraba contenida originalmente, en estricto cumplimiento del artículo 34 de la normativa comunitaria.

2. En cuanto a los ajustes introducidos, se deja constancia de que ninguno de ellos implica la incorporación de materia adicional ni excede el contenido originalmente divulgado, en estricto cumplimiento de lo dispuesto en el artículo 34 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. En particular, se armonizó la redacción general de la memoria descriptiva con el fin de precisar la secuencia técnica del método propuesto, incluyendo las etapas de obtención de anticuerpos IgY a partir de yemas de huevo, la síntesis química de nanopartículas metálicas, el proceso de nanoconjugación y la posterior detección colorimétrica de biomarcadores de daño renal en orina. Asimismo, se clarificaron los parámetros operativos y criterios técnicos asociados a la purificación de anticuerpos, las proporciones estequiométricas para la síntesis de nanopartículas de oro y sulfuro de cadmio, y las condiciones de centrifugación y resuspensión para la funcionalización, todos ellos ya descritos en la versión inicial de la solicitud.

De igual forma, se ajustó la redacción de las reivindicaciones dependientes con el propósito de asegurar su plena correspondencia con la descripción, precisando el carácter preferente de determinadas modalidades de ejecución (como el uso de nanopartículas de oro coloidal o de sulfuro de cadmio, la implementación de la conjugación mediante adsorción física o enlaces covalentes, y la detección específica de biomarcadores como la lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL)) sin alterar en ningún caso el alcance técnico originalmente divulgado.

Estas modificaciones constituyen ajustes meramente aclaratorios y de orden sistemático, destinados a mejorar la claridad reivindicatoria, la suficiencia descriptiva y la coherencia entre descripción y reivindicaciones, sin modificar la naturaleza ni el alcance técnico de la invención. En consecuencia, el contenido del expediente subsanado se mantiene plenamente dentro del marco normativo aplicable y respeta las limitaciones del artículo 34 de la Decisión 486.

En este contexto, frente a la observación de la Oficina en relación con la supuesta falta de claridad del método por la ausencia de ciertos detalles técnicos exhaustivos, resulta necesario abordar el alcance jurídico de las modificaciones admisibles. Si bien se ha procedido a precisar el capítulo descriptivo detallando los compuestos de síntesis (como el citrato de sodio y la tiourea) y las técnicas

de purificación dentro de los márgenes permitidos, no toda aclaración solicitada puede satisfacerse mediante la incorporación de parámetros técnicos que no se encontraran ya en la divulgación original. En consecuencia, a continuación se expone el marco jurídico aplicable a la imposibilidad de introducir valores o compuestos no divulgados originalmente, conforme a lo dispuesto en el artículo 34 de la Decisión 486 de 2000 y a la jurisprudencia del Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina.

5. Análisis detallado de D1(Sohrabian et al., 2012)

El documento D1, titulado “Particle enhanced turbidimetric immunoassay for the determination of urine cystatin C on Cobas c501”, divulga un inmunoensayo para la determinación de cistatina C en orina utilizando la técnica de PETIA (inmunoensayo turbidimétrico potenciado por partículas). Técnicamente, D1 describe un método que emplea anticuerpos de ave (IgY) fijados covalentemente a microesferas de poliestireno activadas para medir la aglutinación mediante absorbancia. Asimismo, D1 menciona la validación del método en una plataforma de química clínica automatizada (Cobas c501) para la cuantificación del inmunocomplejo a una longitud de onda de 450 nm.

Sin embargo, el contenido divulgado en D1 difiere sustancialmente de la solución reivindicada en la presente solicitud en cuanto a la naturaleza de la plataforma de detección y el mecanismo de transducción de señal.

De manera específica, el documento D1 no divulga ni sugiere las siguientes características técnicas esenciales que son determinantes para la sensibilidad y la aplicación como prueba rápida del método reivindicado:

a) La naturaleza de los nanoconjugados. D1 se centra en el uso de microesferas de poliestireno (partículas de látex) como soporte para los anticuerpos. No describe ni sugiere el empleo de nanopartículas metálicas funcionalizadas (como oro o sulfuro de cadmio) que permitan la detección basada en las propiedades fotofísicas intrínsecas de los metales, las cuales son fundamentales para generar el cambio de coloración reivindicado en la presente solicitud.

b) El mecanismo de detección colorimétrica visual. Mientras que D1 es un método turbidimétrico diseñado para equipos de laboratorio automatizados de alto rendimiento que cuantifican la absorbancia, la invención reivindicada establece un cambio de coloración observable a simple vista. D1 no enseña un método simplificado de fácil interpretación visual que permita prescindir de instrumentación especializada y plataformas de química clínica complejas.

c) La detección multianálito de biomarcadores específicos. Aunque D1 analiza la cistatina C, no divulga la configuración específica para la detección de un panel de biomarcadores asociados al daño renal temprano (como NGAL, osteopontina o nefrina) mediante la funcionalización selectiva de nanoconjugados metálicos. La invención reivindicada introduce una combinación funcional de reactivos destinada al pronóstico temprano que no se desprende de la enseñanza de un ensayo automatizado para un único analito.

En consecuencia, el documento D1 describe un ensayo de laboratorio clínico automatizado, pero carece de la enseñanza técnica referida a la detección colorimétrica mediante nanoconjugados metálicos necesaria para lograr la rapidez y sencillez operativa que caracteriza a la presente invención. Por lo tanto, D1 no anticipa la invención reivindicada, ya que no divulga de forma directa y completa la secuencia de etapas ni la configuración de reactivos propuesta.

4. Análisis detallado de D2 (US2018/0156824 A1)

El documento D2, titulado “Kidney Function Biomarkers”, divulga métodos para evaluar la eficacia de tratamientos y diagnosticar trastornos renales mediante la medición de niveles de diversos biomarcadores en muestras biológicas como sangre u orina. Técnicamente, D2 describe el uso de kits de ensayo multiplexados que emplean anticuerpos de captura inmovilizados en placas de múltiples pozos y anticuerpos de detección marcados, orientados preferiblemente a la medición de señales mediante electroquimioluminiscencia (ECL) .

Sin embargo, el contenido divulgado en D2 difiere sustancialmente de la solución reivindicada en la presente solicitud en cuanto al origen de los reactivos biológicos y el método de transducción de la señal.

De manera específica, el documento D2 no divulga ni sugiere las siguientes características técnicas esenciales que definen la eficiencia y simplicidad del método propuesto:

a) El empleo de anticuerpos de origen aviar (IgY). D2 utiliza sistemas de detección basados en inmunoglobulinas convencionales (típicamente de mamífero). No contempla la obtención y purificación de anticuerpos IgY a partir de yema de huevo de gallina, una característica técnica fundamental de la presente solicitud que permite minimizar reacciones inespecíficas con el complemento humano o factores reumatoides, mejorando la robustez del ensayo en muestras de orina.

b) La formación de nanoconjugados metálicos como agentes de detección. Mientras que D2 confía en la inmovilización de anticuerpos en superficies sólidas de placas de ensayo y el uso de etiquetas para lectores electrónicos, la invención reivindicada propone la funcionalización de nanopartículas de oro o sulfuro de cadmio. D2 no enseña la creación de estos nanoconjugados que integran en una sola plataforma el reconocimiento antigénico y la capacidad de generar una señal física autónoma en solución.

c) La independencia de instrumentación compleja mediante respuesta colorimétrica visual. El método de D2 está intrínsecamente ligado al uso de lectores de placas especializados para cuantificar señales electrónicas o lumínicas. En contraste, la solución que se pretende proteger permite identificar la presencia de biomarcadores mediante un viraje de color observable a simple vista tras un breve periodo de incubación. D2 no divulga este efecto técnico que transforma una prueba de laboratorio sofisticada en una herramienta de diagnóstico rápido y simplificado.

Así, el documento D2 describe un sistema de monitoreo de biomarcadores dependiente de infraestructura de laboratorio, pero carece de la enseñanza técnica referida a la utilización de anticuerpos IgY conjugados a nanopartículas metálicas para una detección visual directa. Por lo tanto, D2 no anticipa la invención reivindicada, ya que no divulga de forma directa y completa la configuración funcional del método de diagnóstico propuesto

5. Diferencias técnicas comunes a D1 y D2

Aunado a las diferencias específicas previamente desglosadas frente a cada documento individual, existen divergencias técnicas transversales que permiten afirmar que la invención reivindicada se aparta clara, objetiva y sustancialmente del estado de la técnica citado. Estas diferencias sistémicas evidencian que la solución propuesta no es una mera yuxtaposición de elementos conocidos, sino un desarrollo técnico integral que no se encuentra divulgado ni sugerido en el arte previo.

a) Divergencia en la naturaleza del problema técnico y el campo de aplicación La invención reivindicada aborda un problema de diagnóstico clínico rápido y bionanotecnología: la creación de un método simplificado para la detección visual de biomarcadores de daño renal mediante nanoconjugados de anticuerpos IgY. Por el contrario, el documento D1 se circunscribe al campo de la química clínica de alto rendimiento en laboratorios automatizados, centrándose en la validación de un ensayo turbidimétrico para una plataforma específica (Cobas c501). Más distante aún resulta D2, el cual se orienta al monitoreo clínico de largo plazo y la evaluación de la eficacia de regímenes de tratamiento mediante ensayos multiplexados en plataformas de laboratorio sofisticadas. No existe identidad en los propósitos funcionales (detección rápida visual vs. análisis automatizado de laboratorio), lo cual impide considerar a D1 o D2 como referencias que motiven a un experto a buscar una solución simplificada de campo.

b) Ausencia de un proceso de manufactura e integración de reactivos La invención protege un método integral que abarca desde la obtención biológica de anticuerpos IgY en yema de huevo hasta la síntesis química y funcionalización de nanopartículas metálicas (oro o sulfuro de cadmio) para crear agentes de detección activos en solución. El estado de la técnica carece de esta integración. D1 utiliza reactivos comerciales ya preparados para ser insertados en un analizador; D2, por su parte, se basa en el uso de placas de múltiples pozos pre-fabricadas y captura de anticuerpos en superficies sólidas fijas, sin involucrar el diseño de nanoconjugados metálicos que actúen como sensores independientes en fase líquida.

c) Incompatibilidad técnica de la detección de D2 con el efecto colorimétrico Un pilar de la invención es disponer de nanopartículas metálicas que actúen como transductores ópticos activos, aprovechando sus propiedades fotofísicas para generar un cambio de color visible. En contraste, la metodología de D2 exige la captura del analito sobre la superficie de un pozo y el uso de anticuerpos de detección con etiquetas específicas para electroquimioluminiscencia (ECL). Este mecanismo requiere de un lector electrónico para "leer" la señal lumínica, lo cual es técnicamente incompatible con la detección visual directa y autónoma que propone la presente invención. Aplicar la enseñanza de D2 eliminaría la simplicidad operativa buscada.

d) Diferencia radical en los medios físicos de detección El núcleo funcional de la invención es la detección colorimétrica visual, basada en el cambio de color inducido por la interacción entre el biomarcador y los nanoconjugados metálicos. D1 emplea la turbidimetría (medición de la absorbancia y la dispersión de luz por aglutinación de partículas de látex), y D2 utiliza la electroquimioluminiscencia. Los principios físicos de medición (cambio de coloración visual vs. turbidez automatizada vs. luminiscencia electrónica) son técnicamente inconexos.

e) Diferencia en la funcionalización y soporte químico La invención se distingue por la conjugación de anticuerpos IgY sobre nanopartículas metálicas (oro o cadmio) mediante agentes de acoplamiento o adsorción física. D1, en cambio, enseña la unión de anticuerpos a microesferas de poliestireno (plástico) activadas. La sustitución de un soporte plástico para turbidimetría por un núcleo metálico plasmónico o fluorescente altera el mecanismo de señalización y la naturaleza misma del reactivo, alejándose de la solución reivindicada.

f) Diferencia en el estado de la materia activa (Nanopartículas) El método reivindicado utiliza nanopartículas metálicas como el transductor óptico principal que genera la señal de respuesta. En D1, las partículas de poliestireno son un mero soporte físico para facilitar la aglutinación mecánica; no poseen propiedades ópticas activas que generen color por sí mismas. En D2, el soporte es la superficie sólida de la placa. En la invención, la nanopartícula es el componente activo del diagnóstico; en los antecedentes, es un soporte pasivo o no se emplea en forma de nanoconjugado en solución.

g) Arquitectura del kit y materiales La invención define un método de detección en fase líquida diseñado para ser ejecutado con una muestra de orina y una solución de nanoconjugados, optimizando la rapidez del diagnóstico visual. D1 utiliza una arquitectura de reactivos para analizadores de alto flujo y D2 utiliza placas rígidas de ensayo multiplexado. Ninguno de los antecedentes sugiere una configuración simplificada que permita la interpretación del resultado sin necesidad de hardware de laboratorio.

h) Falta de motivación para la combinación Finalmente, no existe motivación técnica para que un experto combine las enseñanzas de un ensayo turbidimétrico automatizado (D1) con las de plataformas de monitoreo de tratamiento de alta complejidad (D2) para llegar a una prueba rápida visual basada en nanoconjugados metálicos e IgY. Al estar D1 y D2 orientados a la infraestructura de laboratorio clínico y al uso de lectores de señales no visibles, sus enseñanzas son contrarias al objetivo de la invención, que requiere una respuesta colorimétrica directa, económica y ejecutable fuera de un entorno clínico especializado. La combinación carece de propósito funcional y sentido técnico.

6. Formulación del problema técnico objetivo

De conformidad con la metodología reiteradamente desarrollada por el Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina para el examen del requisito de nivel inventivo (en particular en las Interpretaciones Prejudiciales 141-IP-2014, 589-IP-2016 y 371-IP-2021), el análisis debe partir de la correcta identificación del problema técnico objetivo, formulado a partir de las limitaciones reales del estado de la técnica más cercano, evitando cualquier razonamiento retrospectivo (*ex post facto*). Esta formulación resulta esencial para determinar si la solución reivindicada habría sido evidente para una persona versada en la materia a la fecha de presentación de la solicitud.

En el presente caso, a partir del análisis conjunto de los documentos D1 y D2, se advierte que el estado de la técnica presenta, de manera objetiva, las siguientes limitaciones técnicas relevantes:

(i) La ausencia de métodos de diagnóstico para daño renal que sean de bajo costo, rápidos y de fácil interpretación visual, permitiendo su aplicación en entornos de atención primaria o fuera de laboratorios de alta complejidad.

(ii) La falta de herramientas de diagnóstico que utilicen de manera funcional anticuerpos IgY para reducir la interferencia con factores de la muestra de orina, integrándolos en una plataforma de detección colorimétrica simplificada.

(iii) La inexistencia de soluciones que combinen de manera sinérgica nanopartículas metálicas con anticuerpos de ave específicos para generar una respuesta cromática clara y directa ante biomarcadores de daño renal temprano.

(iv) La dependencia, en el estado de la técnica, de instrumentación especializada y costosa (analizadores turbidimétricos automáticos o lectores de electroquimioluminiscencia) para la obtención de resultados, lo que limita la accesibilidad de las pruebas de tamizaje temprano.

Sobre esta base, el problema técnico objetivo que enfrenta la invención puede formularse de la siguiente manera:

¿Cómo desarrollar un método para la detección de biomarcadores de daño renal urinario, de bajo costo y fácil ejecución, que permita una respuesta colorimétrica visual rápida y reproducible, asegure la especificidad mediante el uso de nanoconjugados de anticuerpos IgY y supere las limitaciones de

complejidad operativa y dependencia de equipos de laboratorio de los métodos conocidos en el estado de la técnica?

Este problema técnico no se encuentra planteado ni resuelto en los documentos citados por la Oficina.

El documento D1 se orienta a un ensayo turbidimétrico automatizado de alto rendimiento para cuantificar cistatina C. No divulga un método basado en nanoconjugados metálicos para detección visual, ni aborda el problema de la simplificación del diagnóstico para su uso sin equipos de lectura espectrofotométrica. D1 no resuelve el problema de la accesibilidad del diagnóstico rápido fuera del entorno de un laboratorio clínico robusto.

Por su parte, el documento D2 se sitúa en un dominio técnico relativo al diagnóstico multiplexado mediante electroquimioluminiscencia (ECL). D2 no persigue la obtención de una respuesta colorimétrica visual, no contempla el uso de anticuerpos IgY para optimizar la especificidad en solución, y no resuelve el problema técnico de la eliminación de hardware sofisticado para la interpretación del resultado.

Tal como lo ha señalado el Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina, el problema técnico objetivo debe formularse a partir de las deficiencias del estado de la técnica más cercano, y no a partir de la solución reivindicada. En este caso, ni D1 ni D2 reconocen la necesidad de un sistema de diagnóstico basado en nanoconjugados de IgY que genere un viraje de color directo, fabricado a partir de materiales bionanotecnológicos que permitan un procedimiento seguro y reproducible a bajo costo.

La solución reivindicada responde a este problema técnico mediante un conjunto funcional y sinérgico de características técnicas, que comprenden:

- (a) La utilización de anticuerpos IgY específicos contra un panel de biomarcadores (NGAL, osteopontina, nefrina o cistatina C).
- (b) La nanoconjugación de dichos anticuerpos con partículas de oro o sulfuro de cadmio mediante protocolos de adsorción o enlace químico.
- (c) Un procedimiento de ensayo simplificado que requiere únicamente contacto, agitación y espera de un tiempo predeterminado.
- (d) La obtención de un resultado visual directo mediante el cambio de coloración inducido por la interacción antígeno-anticuerpo.

El resultado técnico alcanzado, consistente en un método de diagnóstico de daño renal homogéneo, reproducible, económico y de fácil interpretación visual, no se deriva de manera evidente del estado de la técnica citado.

En relación con una eventual combinación de D1 y D2, el Tribunal ha sido claro (en particular en la Interpretación Prejudicial 475-IP-2022) en señalar que la combinación de documentos del estado de la técnica solo es admisible cuando existe una motivación técnica clara, objetiva y directa que conduzca al experto en la materia a realizar dicha combinación para resolver el mismo problema técnico.

En el presente caso, no existe motivación técnica razonable que conduzca a combinar un ensayo turbidimétrico para analizadores automáticos (D1) con una plataforma de lectura de electroquimioluminiscencia (D2) para arribar a una prueba rápida colorimétrica basada en

nanoconjugados de IgY. Cualquier combinación requeriría reconstruir artificialmente las enseñanzas de ambos documentos con conocimiento previo de la invención, lo cual constituye un razonamiento retrospectivo (*ex post facto*) proscrito por la jurisprudencia. En consecuencia, la correcta formulación del problema técnico objetivo confirma que la solución reivindicada no resulta obvia y satisface plenamente el requisito de nivel inventivo, conforme al artículo 18 de la Decisión 486.

7. Nivel inventivo del proceso

El señor Examinador sostiene que las características técnicas definidas en las reivindicaciones independientes podrían derivarse de manera evidente a partir de una combinación de las enseñanzas de los documentos D1 (Sohrabian et al., 2012) y D2 (US20180156824A1 / Glezer et al.). Con el debido respeto, dicha conclusión no resulta jurídica ni técnicamente sostenible, en la medida en que parte de una formulación incorrecta del problema técnico objetivo, presume una motivación técnica inexistente y se apoya en una reconstrucción retrospectiva (*ex post facto*) del estado de la técnica, expresamente prohibida por la jurisprudencia comunitaria.

De conformidad con la doctrina reiterada del Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina, en particular la Interpretación Prejudicial 141-IP-2014, el análisis del nivel inventivo exige determinar si la solución reivindicada habría resultado evidente para una persona versada en la materia, partiendo del estado de la técnica más cercano, sin conocimiento previo de la invención y sin razonamientos retrospectivos. En el presente caso, tales condiciones no se cumplen.

7.1 Estado de la técnica más cercano y diferencias reales

El propio Examinador identifica a D1 como el estado de la técnica más cercano, dado que divulga el uso de anticuerpos de ave (IgY) para la determinación de biomarcadores renales como la cistatina C. No obstante, el propio documento reconoce que su técnica se basa en un inmunoensayo turbidimétrico (PETIA) sobre microesferas de poliestireno para ser ejecutado en plataformas automatizadas (Cobas c501).

La diferencia técnica esencial radica en que D1 no divulga ni sugiere el uso de nanoconjugados basados en nanopartículas metálicas (oro o sulfuro de cadmio) funcionalizadas con IgY para producir una respuesta colorimétrica visual. Esta diferencia no es meramente formal, sino que responde a un problema técnico concreto no abordado por D1: cómo lograr una detección rápida, de bajo costo y fácil interpretación visual que prescinda de la infraestructura de un laboratorio clínico automatizado.

7.2. Error en la formulación del problema técnico objetivo

El Examinador formula el problema técnico objetivo como una simple búsqueda de una “alternativa” al método de D1. Esta formulación es jurídicamente incorrecta conforme a la doctrina del Tribunal (Interpretación Prejudicial 371-IP-2021), ya que no refleja una limitación técnica objetiva, sino que se construye a partir de la solución misma.

D1 no identifica ni resuelve la necesidad de simplificar el diagnóstico para su uso en campo o en atención primaria. El problema técnico objetivo correctamente formulado es:

¿Cómo desarrollar un método de detección de biomarcadores de daño renal mediante nanoconjugados de IgY que permita una respuesta colorimétrica visual rápida y reproducible, eliminando la dependencia de equipos de laboratorio automatizados y conservando una alta especificidad?

Este problema no está planteado ni resuelto en D1 ni en D2.

7.3. Inexistencia de motivación técnica para combinar D1 y D2

El Examinador sostiene que el experto estaría motivado a combinar D1 con D2. Sin embargo, esta afirmación carece de sustento. El documento D2 se inscribe en un campo de alta complejidad tecnológica, orientado a ensayos multiplexados mediante electroquimioluminiscencia (ECL).

No existe en D1 (turbidimetría automatizada) indicación alguna que lleve al experto a buscar soluciones en el campo de la electroquimioluminiscencia (D2) para llegar a un método colorimétrico visual. De hecho, las enseñanzas de D2, que dependen de lectores de señales lumínicas electrónicas y superficies sólidas fijas, se alejan de la simplicidad operativa y la detección en fase líquida que propone la presente invención. La supuesta motivación solo surge con conocimiento previo de la invención (*ex post facto*).

7.4. Carácter no evidente del efecto técnico alcanzado

La invención reivindicada no se limita a aplicar etapas conocidas, sino que introduce una secuencia técnica funcionalmente integrada en la que:

- (a) Se obtienen y purifican anticuerpos IgY específicos;
- (b) Se nanoconjugan con partículas metálicas (oro o cadmio) mediante protocolos de adsorción o enlace químico; y
- (c) Se genera un efecto técnico no previsible: un cambio de coloración visual directo inducido por la interacción específica en la plataforma nanoconjugada.

Este efecto (un diagnóstico visual de daño renal temprano ejecutable en minutos sin necesidad de hardware) no se deriva de la aglutinación mecánica de D1 ni de la luminiscencia electrónica de D2. Conforme a la 141-IP-2014, el nivel inventivo se configura al establecer una relación funcional nueva que produce un resultado técnico no evidente, condición que se cumple plenamente en esta solicitud.

8. Incompatibilidad funcional y de propósito entre D1 y D2

Uno de los elementos determinantes para descartar la combinación de los documentos D1 y D2 como fundamento para cuestionar el nivel inventivo de la presente solicitud radica en la divergencia sustancial de propósito técnico, enfoque metodológico y lógica funcional que caracteriza a cada uno de dichos antecedentes, aun cuando ambos se relacionen de manera amplia con el diagnóstico de la función renal.

En efecto, el documento D1 (Sohrabian et al.) se orienta específicamente al ámbito de la química clínica de alto rendimiento, describiendo un inmunoensayo turbidimétrico (PETIA) diseñado para ser

ejecutado en plataformas de laboratorio automatizadas. El enfoque de D1 es fundamentalmente instrumental y de optimización de flujo de trabajo hospitalario, centrado en la precisión analítica y la estabilidad de los reactivos bajo condiciones de automatización. Sin embargo, D1 no aborda la detección colorimétrica visual, no identifica la necesidad de pruebas rápidas de campo, ni propone el uso de nanoconjugados metálicos que permitan prescindir de equipos de lectura de absorbancia.

Por su parte, el documento D2 (Glezer et al.) se enfoca en plataformas de diagnóstico multiplexado de alta sensibilidad, basadas en la tecnología de electroquimioluminiscencia (ECL). El propósito técnico de D2 es la cuantificación simultánea de múltiples analitos mediante el uso de superficies sólidas con electrodos y anticuerpos marcados con etiquetas luminiscentes, cuya señal debe ser procesada por lectores electrónicos especializados. D2 no describe métodos de diagnóstico rápido visual, no contempla el uso de anticuerpos IgY en solución para generar cambios cromáticos, ni evalúa efectos fotofísicos asociados a nanopartículas metálicas en fase líquida.

Así, aunque ambos documentos se inscriben de manera general en el ámbito de la detección de biomarcadores renales, responden a problemas técnicos radicalmente distintos:

- D1 se orienta a la automatización de laboratorio mediante turbidimetría, sin profundizar en la simplificación del método para uso visual o en el uso de bionanotecnología metálica.
- D2 se orienta al monitoreo clínico complejo mediante señales electrónicas y lumínicas, sin considerar aplicaciones colorimétricas directas ni la autonomía diagnóstica que brinda la presente invención.

Desde esta perspectiva, la combinación de sus enseñanzas exigiría trasladar procedimientos desarrollados para grandes analizadores automáticos (D1) o lectores de luminiscencia sofisticados (D2) a un contexto de diagnóstico visual simplificado en solución, sin que exista en ninguno de los documentos una sugerencia que justifique dicho traslado. Tal operación no se desprende de manera natural ni lógica del estado de la técnica, y solo puede concebirse con conocimiento previo de la invención.

Tal como lo ha señalado el Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina en la Interpretación Prejudicial 589-IP-2016, no puede considerarse evidente una invención cuando los documentos que se pretenden combinar no responden al mismo problema técnico ni persiguen una finalidad coincidente, dado que en tal escenario no existe una motivación técnica objetiva que conduzca al experto en la materia a integrar sus enseñanzas.

Asimismo, conforme a lo precisado en la Interpretación Prejudicial 371-IP-2021, el análisis de nivel inventivo debe partir del estado de la técnica más cercano y de sus deficiencias reales. En el presente caso, D1 no reconoce el problema de la dependencia de equipos de laboratorio para el tamizaje rápido, y D2 no reconoce problema alguno relacionado con la detección visual autónoma o la optimización de costos mediante nanoconjugados de IgY. Ninguno de los documentos identifica la necesidad de combinar la especificidad de los anticuerpos de ave con arquitecturas de detección colorimétrica para resolver un problema común.

Desde el punto de vista de una persona versada en la materia, no existiría motivación técnica razonable para combinar:

- (i) un documento orientado a la turbidimetría automatizada en analizadores de alto flujo, con
- (ii) un documento orientado al diagnóstico multiplexado por electroquimioluminiscencia dependiente de lectores electrónicos,

para arribar a un método de detección colorimétrica visual basado en nanoconjugados de IgY como el reivindicado.

Como ha reiterado el Tribunal en las Interpretaciones Prejudiciales 141-IP-2014 y 475-IP-2022, toda combinación de documentos que solo resulta posible a partir del conocimiento previo de la invención constituye un razonamiento retrospectivo (*ex post facto*), incompatible con el examen objetivo del nivel inventivo exigido por el artículo 18 de la Decisión 486.

Por lo anterior, la incompatibilidad funcional y de propósito entre D1 y D2 impide considerarlos combinables de manera legítima. No resulta válido suponer que una persona versada en la materia, enfrentada al problema técnico de obtener un método de diagnóstico de daño renal rápido, económico y de fácil interpretación visual, encontraría en D1 y D2 enseñanzas convergentes que la condujeran de manera evidente a la solución reivindicada.

9. Ausencia de motivación técnica para combinar las enseñanzas de D1 y D2

Más allá de la incompatibilidad funcional y de propósito previamente expuesta entre los documentos D1 y D2, resulta igualmente determinante destacar la ausencia total de motivación técnica objetiva que pudiera conducir a una persona versada en la materia a combinar sus enseñanzas para arribar al método de detección colorimétrica visual reivindicado en la presente solicitud.

De conformidad con los criterios desarrollados por el Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina, en particular en la Interpretación Prejudicial 141-IP-2014, el examen del nivel inventivo exige determinar si el experto en la materia habría contado con una razón técnica clara, previa y funcional para integrar tales elementos con el fin de resolver un mismo problema técnico. Dicha motivación no puede construirse *a posteriori*, sino que debe desprenderse directamente de la lógica interna de los documentos citados.

En el presente caso, ni D1 ni D2 identifican el problema técnico efectivamente resuelto por la invención: la necesidad de obtener un método de diagnóstico de daño renal que sea de bajo costo, rápido y de fácil interpretación visual, permitiendo su aplicación sin la dependencia de infraestructura de laboratorio sofisticada.

El documento D1 (Sohrabian et al.) se limita a la validación de un inmunoensayo turbidimétrico (PETIA) para su uso en analizadores automáticos de alto rendimiento. Su enseñanza se centra en la precisión analítica y la estabilidad de los reactivos dentro de un entorno de laboratorio clínico estrictamente controlado. D1 no ofrece indicio alguno que motive al experto a buscar soluciones en el ámbito de la bionanotecnología metálica para generar señales cromáticas visibles, ni mucho menos a simplificar el proceso para que sea ejecutado fuera de una plataforma automatizada.

Por su parte, el documento D2 (Glezer et al.) describe métodos multiplexados basados en la electroquimioluminiscencia (ECL), los cuales requieren necesariamente de etiquetas luminiscentes y lectores electrónicos para cuantificar la señal. D2 no se inscribe en el campo de las pruebas rápidas colorimétricas, no aborda el uso de nanopartículas metálicas como transductores ópticos directos y no sugiere en modo alguno que tales sistemas complejos puedan ser reemplazados por una interacción bionanotecnológica que produzca un viraje de color observable a simple vista.

Desde esta perspectiva, no existe una relación lógica entre las enseñanzas de D1 y D2 que permita al experto inferir que su combinación conduciría al método reivindicado. Como ha señalado el Tribunal en la Interpretación Prejudicial 371-IP-2021, la combinación de documentos solo es legítima cuando ambos responden al mismo problema técnico. En este escenario, pretender que un experto combinaría un ensayo de laboratorio automatizado (D1) con un sistema de lectura electrónica (D2) para obtener una prueba visual simplificada en solución carece de todo sentido técnico.

Cualquier intento de combinar D1 y D2 exigiría asumir que un procedimiento desarrollado para la alta complejidad clínica resulta aplicable a la creación de una herramienta de diagnóstico autónoma y económica. Esta suposición solo sería concebible a partir del conocimiento previo de la invención, lo cual constituye un razonamiento retrospectivo (*ex post facto*) expresamente proscrito por la jurisprudencia comunitaria (Interpretación Prejudicial 475-IP-2022).

Así, la ausencia de motivación técnica razonable confirma que la solución reivindicada no se deriva de manera evidente del estado de la técnica. Por tanto, la presente invención cumple plenamente con el requisito de nivel inventivo, conforme a lo dispuesto en el artículo 18 de la Decisión 486 de la Comunidad Andina.

10. Ausencia de características triviales o evidentes en la configuración técnica reivindicada

En relación con el requisito de nivel inventivo previsto en el artículo 18 de la Decisión 486 de la Comunidad Andina, resulta necesario precisar que la invención reivindicada no incorpora características triviales, rutinarias ni derivables de manera directa del estado de la técnica, ni consideradas de forma aislada ni mediante una hipotética combinación de documentos previos como D1 y D2.

La memoria descriptiva pone de manifiesto una configuración técnica compleja e integrada, estructurada como un método de diagnóstico colorimétrico visual, en el que la especificidad biológica, la selección de bionanomateriales, la funcionalización química y el protocolo de ensayo cooperan funcionalmente para resolver un problema técnico específico no abordado previamente en el estado de la técnica: obtener una detección rápida, específica y reproducible de biomarcadores de daño renal urinario que pueda ser interpretada visualmente sin dependencia de infraestructura instrumental.

En particular, la invención reivindicada articula de manera sinérgica y no trivial:

- (a) la obtención y purificación de anticuerpos IgY específicos a partir de yemas de huevos de gallinas inmunizadas contra un panel de biomarcadores de daño temprano;
- (b) la síntesis controlada de nanopartículas metálicas de oro o sulfuro de cadmio con propiedades fotofísicas capaces de generar una respuesta óptica en el espectro visible;

- (c) la funcionalización de dichas nanopartículas con uno o más anticuerpos IgY para crear nanoconjugados estables que actúan como sensores activos en solución;
- (d) la implementación de un procedimiento de ensayo simplificado que requiere únicamente el contacto con la muestra de orina y una agitación mecánica controlada; y
- (e) la generación de una señal colorimétrica visual directa derivada de la interacción específica entre el biomarcador presente en la muestra y la plataforma bionanotecnológica.

Cada una de estas etapas, considerada de manera aislada, podría corresponder a técnicas conocidas en contextos distintos; sin embargo, su integración funcional específica dentro de un mismo método de diagnóstico no se desprende de manera evidente del estado de la técnica. Tal como lo ha precisado el Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina en la Interpretación Prejudicial 141-IP-2014, el nivel inventivo no se excluye por el hecho de que ciertos elementos individuales sean conocidos, cuando su combinación produce una solución técnica que no era previsible para la persona versada en la materia.

La no trivialidad de la invención se refuerza por el hecho de que la configuración reivindicada no se limita a una simple prueba de aglutinación o a una sustitución de anticuerpos, sino que introduce una plataforma de nanoconjugados metálicos cuyo efecto conjunto es permitir la identificación visual de nefropatías en etapas iniciales, efecto que no se encuentra anticipado ni sugerido en D1, que depende de la turbidimetría automatizada y partículas de látex, ni en D2, que se orienta al monitoreo mediante electroquimioluminiscencia y lectores electrónicos.

Como ha reiterado el Tribunal en la Interpretación Prejudicial 371-IP-2021, una configuración técnica no puede considerarse evidente cuando introduce una relación funcional distinta entre elementos conocidos, produciendo un efecto técnico cualitativamente diferente al esperado a partir del estado de la técnica. En el presente caso, la relación funcional entre la inmunología aviar, la nanotecnología metálica y la respuesta colorimétrica visual excede claramente una aplicación rutinaria de técnicas conocidas.

Asimismo, conforme a la Interpretación Prejudicial 589-IP-2016, no puede calificarse como obvia una solución que exige decisiones técnicas específicas sobre cómo funcionalizar una nanopartícula para que mantenga su estabilidad óptica y su afinidad biológica simultáneamente en una muestra compleja como la orina. La configuración reivindicada no surge de una optimización incremental de D1 o D2, sino de una concepción técnica distinta, orientada a resolver un problema de accesibilidad diagnóstica no identificado en dichos documentos.

En definitiva, el valor inventivo de la presente invención radica en la organización funcional novedosa de elementos biológicos y nanotecnológicos, que produce un efecto técnico no anticipable: una detección colorimétrica visual autónoma, rápida y específica para el daño renal temprano. Dicha configuración no resulta evidente para una persona versada en la materia y satisface plenamente el requisito de nivel inventivo, conforme al artículo 18 de la Decisión 486 de la Comunidad Andina.

11. Efecto técnico distinto y no previsible

Finalmente, la combinación de características técnicas que conforman la presente invención produce un efecto técnico distinto y no previsible para una persona versada en la materia. La invención no

consiste en la mera yuxtaposición de técnicas conocidas, sino en la articulación funcional de una plataforma bionanotecnológica, en la que la inmunología aviar, la selección de nanomateriales metálicos y la funcionalización de nanoconjugados cooperan para resolver un problema técnico que no estaba identificado ni abordado en el estado de la técnica: obtener una detección rápida, específica y reproducible de biomarcadores renales que pueda ser interpretada visualmente sin dependencia de infraestructura instrumental costosa.

En particular, la invención logra de manera conjunta:

- a) Un nanoconjugado biológicamente estable y funcional, mediante la unión específica de anticuerpos IgY con nanopartículas de oro o sulfuro de cadmio, lo que evita reacciones inespecíficas con factores de la muestra de orina y asegura la estabilidad de la señal óptica en solución.
- b) Una mejora sustancial en la reproducibilidad visual, derivada de la interacción específica entre el biomarcador y la plataforma bionanotecnológica, lo que garantiza un cambio de coloración claro y consistente independientemente de las variaciones menores en la composición de la muestra biológica.
- c) Una detección temprana accesible y autónoma, al favorecer una respuesta cromática interpretable a simple vista, superando las limitaciones asociadas a métodos en los que la señal debe ser procesada por lectores electrónicos de luminiscencia o analizadores de absorbancia automatizados.
- d) Una mayor estabilidad operativa del método de diagnóstico, que permite su ejecución en tiempos reducidos (aproximadamente cinco minutos) sin pérdida de sensibilidad, proporcionando una herramienta de orientación inmediata para el tratamiento del paciente.

Estos efectos técnicos no pueden deducirse de manera directa ni evidente a partir de las enseñanzas individuales de los documentos citados por la Oficina. En efecto:

- El documento D1 (Sohrabian et al.) describe inmunoensayos turbidimétricos automatizados que dependen de la aglutinación de partículas de poliestireno, pero no aborda la detección colorimétrica visual ni reconoce las ventajas de los nanoconjugados metálicos para eliminar la dependencia de hardware de laboratorio.
- El documento D2 (Glezer et al.) describe procesos de monitoreo mediante electroquimioluminiscencia y ensayos multiplexados, sin considerar aplicaciones basadas en anticuerpos IgY para diagnóstico colorimétrico simplificado y sin sugerir que la bionanotecnología en fase líquida pueda sustituir los sistemas de lectura electrónica.

Ninguno de estos documentos sugiere que la combinación funcional de:

- (i) El uso de anticuerpos de ave (IgY),
- (ii) Una plataforma de nanopartículas metálicas (oro o cadmio), y
- (iii) Un método de detección colorimétrica visual en solución,

pueda conducir a una prueba diagnóstica con desempeño superior en términos de accesibilidad y rapidez, ni mucho menos que dicha combinación produzca un efecto técnico sinérgico que transforme un complejo análisis clínico en una herramienta de tamizaje visual directo.

Los resultados alcanzados por la presente invención constituyen, por tanto, un efecto técnico inesperado, derivado de la interacción cooperativa entre bionanomateriales y anticuerpos específicos, que hasta el momento se empleaban de forma aislada o en sistemas dependientes de instrumentación pesada. El método reivindicado supera claramente el rendimiento previsible de los ensayos conocidos, introduciendo una solución técnica cualitativamente superior para el pronóstico temprano del daño renal.

De conformidad con la doctrina reiterada del Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina, existe nivel inventivo cuando la combinación de elementos conocidos produce un efecto técnico distinto y no anticipable. En el presente caso, la invención satisface plenamente dicho criterio, pues redefine la forma de obtener un diagnóstico renal estable, específico y reproducible fuera de un entorno clínico especializado.

12. Conclusión

A la luz de los argumentos técnicos y jurídicos desarrollados a lo largo del presente escrito, y conforme a los criterios interpretativos reiteradamente establecidos por el Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina en la aplicación de los artículos 16 y 18 de la Decisión 486 de 2000, se concluye que la invención reivindicada en la solicitud NC2022/0007674 cumple plenamente con los requisitos sustantivos de patentabilidad exigidos por la normativa comunitaria andina.

En relación con el requisito de novedad, se ha demostrado de manera clara, suficiente y técnicamente fundamentada que ninguno de los documentos citados por la Oficina, considerados de forma individual, revela de manera directa, completa, inequívoca y unitaria la configuración técnica del método para la detección de biomarcadores de daño renal, ni la combinación funcional de características que lo definen. En particular, el estado de la técnica no divulga un método que integre simultáneamente:

- (a) la obtención y purificación de anticuerpos IgY específicos a partir de huevos de gallina inmunizada;
- (b) la utilización de un panel de biomarcadores específicos seleccionados entre NGAL, osteopontina, cistatina C o nefrina;
- (c) la conformación de nanoconjugados metálicos mediante la unión de dichos anticuerpos con nanopartículas de oro o sulfuro de cadmio;
- (d) un procedimiento de ensayo simplificado basado en el contacto directo y agitación en fase líquida; y
- (e) la detección de la presencia del biomarcador mediante la observación de un cambio de coloración visual directo inducido por la interacción bionanotecnológica.

En consecuencia, no se configura anticipación alguna en los términos exigidos por el artículo 16 de la Decisión 486, ni conforme a la doctrina vinculante sobre divulgación integral y unitaria del estado de la técnica.

Asimismo, en lo que respecta al requisito de nivel inventivo, se ha acreditado que la solución técnica reivindicada no resulta evidente para una persona versada en la materia, ni a partir del documento D1, ni del documento D2, ni mediante una eventual combinación de ambos. Dichos documentos responden a problemas técnicos distintos, persiguen finalidades no coincidentes y se inscriben en enfoques instrumentales incompatibles, sin que exista una motivación técnica objetiva y razonable que conduzca al experto a integrar sus enseñanzas para arribar a la configuración reivindicada.

En particular, mientras D1 se limita a describir un ensayo turbidimétrico automatizado para laboratorios de alto flujo, D2 se orienta al monitoreo mediante electroquimioluminiscencia dependiente de lectores electrónicos, sin relación alguna con la detección colorimétrica visual simplificada ni con la generación de nanoconjugados metálicos activos en solución. La combinación de ambos documentos solo sería posible mediante un razonamiento retrospectivo (*ex post facto*), expresamente proscrito por la jurisprudencia comunitaria.

La invención reivindicada introduce una configuración técnica no trivial, en la que la especificidad de la inmunología aviar y las propiedades fotofísicas de las nanopartículas cooperan funcionalmente para producir un efecto técnico distinto y no previsible, consistente en un método de diagnóstico rápido, económico y de fácil interpretación visual, con mejora sustancial en la accesibilidad del tamizaje renal temprano. Este efecto técnico no se desprende de manera evidente del estado de la técnica citado.

De conformidad con la doctrina reiterada del Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina, existe nivel inventivo cuando la combinación de elementos conocidos produce un resultado técnico cualitativamente distinto y no anticipable para la persona versada en la materia, condición que se cumple plenamente en el presente caso. La invención objeto del expediente NC2022/0007674 constituye una solución técnica concreta, reproducible y técnicamente verificable, superando las limitaciones de los métodos conocidos en cuanto a dependencia instrumental y complejidad operativa.

En virtud de todo lo anterior, se solicita respetuosamente que la Superintendencia de Industria y Comercio tenga por debidamente atendidas las observaciones formuladas en el requerimiento de fondo y, en consecuencia, continúe el trámite hacia la concesión de la patente solicitada, al verificarse el cumplimiento de los requisitos de novedad y nivel inventivo exigidos por la Decisión 486 de la Comunidad Andina

Atentamente,



Fredy S. Merino

C.C. 1043177293

T.P. 268742 del C.S. de la J.

Anexos: pliego reivindicatorio y capítulo descriptivo modificados.

“ANTICUERPOS IGY NANOCONJUGADOS PARA LA DETECCIÓN DE LA ENFERMEDAD RENAL”

Campo de la invención

La presente invención se inscribe en el campo de la medicina y el diagnóstico in vitro, particularmente en el área de métodos para la detección de biomarcadores urinarios asociados al daño renal.

Estado de la técnica

En el estado de la técnica se conocen diversos métodos para el diagnóstico y monitoreo de enfermedades renales basados en la detección de biomarcadores presentes en muestras biológicas, particularmente en orina. Entre dichos métodos se encuentran los inmunoensayos turbidimétricos, ensayos enzimáticos y métodos colorimétricos que emplean anticuerpos específicos contra proteínas asociadas al daño renal, tales como la cistatina C, la lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL), la osteopontina y la nefrina.

Algunos documentos describen el uso de anticuerpos conjugados a partículas sólidas o nanopartículas para mejorar la sensibilidad de detección, así como el empleo de plataformas automatizadas de laboratorio clínico. No obstante, estos métodos suelen requerir equipamiento especializado, tiempos prolongados de incubación y protocolos complejos que dificultan su implementación como pruebas rápidas o de fácil interpretación visual.

En consecuencia, persiste la necesidad de desarrollar métodos alternativos que permitan la detección rápida y sencilla de biomarcadores de daño renal urinario, con adecuada especificidad y sensibilidad, y que puedan ser ejecutados mediante procedimientos simplificados.

RU2670908

MÉTODO PARA EL DIAGNÓSTICO DE NEFROPATÍA

La invención encontrada comprende un método para el diagnóstico de la nefropatía, una serie de análisis que permiten diagnosticar trastornos en el flujo de sangre renal en etapa preclínica para los casos de nefropatía hipertensiva

El documento describe un enfoque basado en técnicas de análisis molecular y kits de diagnóstico, sin contemplar el uso de anticuerpos IgY nanoconjugados ni mecanismos de detección colorimétrica visual.

WO9744663

MÉTODO DE EXAMINACIÓN Y KIT DE EXAMINACIÓN PARA NEFROPATÍA POR IgA

La invención se refiere a un método para el examen de nefropatía por IgA sin necesidad de realizar una biopsia como procedimiento esencial en métodos convencionales. Se trata de un método que utiliza técnicas de análisis molecular. La solución incluye un kit para la realización del análisis.

Difiere de la solución que se pretende proteger en tanto esta última usa anticuerpos nanoconjugados como componente y método totalmente distintos en el pronóstico temprano de afectaciones renales.

Breve descripción de la invención

La solución planteada propone la utilización de nanopartículas metálicas (oro o sulfuro de cadmio) funcionalizadas con uno o más anticuerpos IgY específicos (anti-osteopontina, anti-NGAL, anti-nefrina y/o anti-cistatina C), para la detección en orina de biomarcadores asociados al daño renal, mediante un cambio de coloración observable derivado de la interacción antígeno–anticuerpo en la plataforma nanopartícula–anticuerpo.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Diagrama de flujo del proceso

Descripción detallada de la invención

La utilización de plataformas basadas en nanomateriales en conjunto con anticuerpos IgY en pruebas rápidas de fácil uso para la detección temprana en diversas patologías, ha generado un alto interés en sus desarrollos, cuya aplicación brinda una herramienta de orientación en la toma de decisiones con respecto a las guías de tratamiento a seguir.

En ese orden, entre las aplicaciones comprendidas está destinada a facilitar la identificación de ciertas enfermedades. Entre ellas las enfermedades renales que en sus etapas tempranas son silenciosas y asintomáticas lo cual es un inconveniente para su diagnóstico y pronto tratamiento.

Este inconveniente puede ser superado mediante el desarrollo de pruebas rápidas para la detección temprana basada en conjugados de nanopartículas metálicas con anticuerpos IgY (uno o más anticuerpos) dirigidos contra biomarcadores urinarios tempranos de daño renal, esto permitirá la detección en muestras de orina, proporcionando una detección temprana en fases iniciales de la enfermedad renal.

La presente invención se refiere a un método para la detección de biomarcadores de daño renal urinario basado en el uso de anticuerpos IgY nanoconjugados, que permite identificar la presencia de dichos biomarcadores mediante un cambio de coloración observable.

En una realización preferida, los anticuerpos IgY se obtienen a partir de huevos de gallina inmunizada con un antígeno correspondiente a un biomarcador de daño renal seleccionado entre lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL), osteopontina, cistatina C o nefrina. Los anticuerpos IgY son posteriormente purificados mediante técnicas convencionales, tales como precipitación selectiva, cromatografía o filtración.

Una vez purificados, los anticuerpos IgY son evaluados para confirmar su especificidad antigénica frente al biomarcador correspondiente mediante ensayos inmunológicos conocidos por la persona experta en la materia.

Posteriormente, los anticuerpos IgY purificados se conjugan con nanopartículas, preferiblemente nanopartículas de oro coloidal o de sulfuro de cadmio, mediante adsorción física o mediante enlaces covalentes activados químicamente.

Para la detección, una solución que comprende los anticuerpos IgY nanoconjugados se pone en contacto con una muestra de orina, se somete a agitación mecánica y se deja reaccionar durante un tiempo predeterminado. La interacción entre el biomarcador presente

en la muestra y los anticuerpos IgY nanoconjugados produce un cambio de coloración, el cual indica la presencia del biomarcador de daño renal urinario.

La plataforma nanopartícula-anticuerpos IgY, ofrece una oportunidad para su aplicación en nefropatías para la detección temprana del daño renal en sus etapas iniciales, dando una herramienta en la toma de decisiones en la ruta a seguir en el tratamiento del paciente.

Los nanoconjugados (nanopartículas metálicas- anticuerpos IgY) obtenidos, comprenden ciertas características que le brindan aspectos idóneos para ser usados en el diagnóstico de daño renal, gracias al tamaño y forma de los nanoconjugados, los cuales presentan diámetros comprendidos entre 20 y 100 nm y pueden contener uno o más anticuerpos IgY, lo que les brinda la capacidad de reconocer biomarcadores urinarios de daño renal temprano. Así, el daño puede ser detectado visualmente mediante el cambio de color gracias a las propiedades fotofísicas de las nanopartículas metálicas.

La obtención de la prueba de detección por medio de nanoconjugados se desarrolla a través de varias etapas.

Lo primero es la producción de anticuerpos IgY, los cuales se obtienen con la inmunización de gallinas ponedoras High Light Brow de aproximadamente 16 semanas de edad, con proteínas recombinantes osteopontina, nefrina, NGAL, cistatina C, todas obtenidas de abcam. Los huevos colectados pre-inmunizados y post-inmunizados se almacenaron a 4°C hasta extracción de los anticuerpos IgY.

La extracción de los anticuerpos IgY, comienza con la separación de la yema del albumen mediante método físico, retirando los residuos de albumen con una servilleta absorbente. Para remoción de lípidos se emplea método PBS:Cloroformo proporción 1:2, con un periodo de incubación de 2 horas y centrifugación por 30 minutos a 2000 g a 4°C, almacenando el sobrenadante a -80°C. Los valores de proteínas en los extractos totales se cuantifican mediante patrón estándar una curva de calibración con albumina sérica bovina a 280 nm.

La reactividad de los anticuerpos IgY fue evaluada mediante ensayos ELISA convencionales usando como antígenos las proteínas recombinantes. La purificación de los extractos de anticuerpos IgY se realiza mediante cromatografía de afinidad.

La segunda etapa, es la elaboración de nanopartículas metálicas, para la obtención de nanopartículas de oro, se sintetizan mediante reducción química fragmentos de AuCl₃ usando citrato de sodio en una relación de 2.5, con agitación constante y suministro de calor

por 30 minutos. El cambio de color de la solución evidencia la formación de partículas de oro coloidal mono-dispersas. Éstas se caracterizan están midiendo su tamaño de partícula y su absorbancia en el espectro Uv-vis entre las longitudes de onda de 350 800 nm.

Por otra parte, las nanopartículas de sulfuro de cadmio se obtienen mediante la realización de mezclas de soluciones estequiométricas de sulfato de cadmio (CdSO_4) y tiourea ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$) en una proporción molar de 1:1.6. Esta proporción es modificable, de tal manera que, aumentando la proporción, disminuye el tamaño de la nanopartícula y viceversa.

Esta mezcla es sometida a radiación térmica generada por microondas, hasta obtener un cambio intenso en el color de la solución. Esta solución se deja en reposo por 24 horas protegida de la luz, transcurrido este tiempo se centrifuga, se desecha el sobrenadante y el precipitado se redispone en un $\frac{1}{4}$ del volumen inicial.

La tercera etapa corresponde a la funcionalización de las nanopartículas de oro o sulfuro de cadmio con los anticuerpos IgY anti osteopontina, anti nefrina, anti cistatina C y anti NGAL. Para la funcionalización de nanopartículas de oro con un solo anticuerpo IgY, se toman 2 mL de solución de AuNPs, se centrifugan a 6.000 rpm durante 5 minutos, se reconstituye el pellet con 1 mL solución de extracto con anticuerpo IgY, se centrifuga a 6.000 rpm por 5 minutos se almacena el pellet que contiene las nanopartículas funcionalizadas con el anticuerpo IgY. Para la funcionalización de nanopartículas de oro con dos o más anticuerpos IgY, se toman 2 mL de solución de AuNPs, se centrifugan a 6.000 rpm por 5 minutos se reconstituye el pellet con 0.5 o 0.3 mL solución de cada extracto con anticuerpo IgY, se almacena la solución que contiene las nanopartículas funcionalizadas con los anticuerpos IgY.

Para la funcionalización de las nanopartículas sulfuro de cadmio, el resultado se obtiene mezclando solución de puntos cuánticos con extracto de anticuerpo IgY en proporción estequiométrica de 2:1, esta mezcla se centrifuga a 6.000 rpm por 5 minutos. El pellet se reconstituye con 1 mL de PBS, y se almacena la solución que contiene las nanopartículas funcionalizadas con el anticuerpo IgY.

Para la funcionalización de varios anticuerpos con las nanopartículas de sulfuro de cadmio, se mezclan en proporciones 1:1 de cada anticuerpo y esta solución se mezcla con las nanopartículas de sulfuro de cadmio en una relación 2:1.

Las nanopartículas de sulfuro de cadmio obtenidos están constituidas por un núcleo cristalino de sulfuro de cadmio (CdS) y una capa de uno o más anticuerpos IgY.

Los conjugados de nanopartículas de oro con anticuerpos IgY, están constituido por un núcleo coloidal de átomos de oro y una capa de uno o más anticuerpos IgY. Las nanopartículas de oro o sulfuro de cadmio funcionalizadas con anticuerpos IgY actúan como agentes de detección para biomarcadores urinarios de daño renal.

En una realización ejemplar, se emplea 1 mL de una solución de anticuerpos IgY conjugados con nanopartículas de oro coloidal, la cual se mezcla con 100 mL de una muestra de orina. La mezcla se agita mecánicamente y se deja reaccionar durante aproximadamente cinco minutos. La aparición de una coloración visible indica la presencia del biomarcador de daño renal correspondiente.

REIVINDICACIONES

1. Método para la detección de biomarcadores de daño renal urinario, que comprende las etapas de:
 - (a) obtener anticuerpos IgY a partir de huevos de gallina inmunizada con al menos un antígeno correspondiente a un biomarcador de daño renal urinario seleccionado entre lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL), osteopontina, cistatina C o nefrina;
 - (b) purificar los anticuerpos IgY mediante al menos una técnica seleccionada entre precipitación selectiva, cromatografía o filtración;
 - (c) evaluar la especificidad antigénica de los anticuerpos IgY purificados frente al biomarcador correspondiente mediante un ensayo inmunológico;
 - (d) conjugar los anticuerpos IgY purificados con nanopartículas mediante un agente de acoplamiento químico;
 - (e) poner en contacto una solución que comprende los anticuerpos IgY conjugados con nanopartículas con una muestra de orina;
 - (f) incubar la mezcla durante un tiempo predeterminado bajo agitación controlada; y
 - (g) detectar la presencia del biomarcador mediante la observación de un cambio de coloración inducido por la interacción entre el biomarcador presente en la muestra y los anticuerpos IgY conjugados.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el biomarcador de daño renal urinario es la lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL).
3. El método de la reivindicación 1, en el que las nanopartículas son nanopartículas de oro coloidal o de sulfuro de cadmio, y la conjugación se realiza mediante adsorción física o mediante enlaces covalentes activados químicamente.