

意见陈述书正文

尊敬的国家知识产权局：

申请人收到了国家知识产权局对申请号为 201811284970.3 发出的第三次审查意见通知书。申请人首先感谢审查员对完善本专利申请所作的辛勤劳动，申请人仔细阅读了审查意见通知书正文，按通知书的要求进行了修改，申请人提出以下意见，希望和审查员商榷：

一、修改说明：

1、将权利要求 2、3 中的附加技术特征加入到权利要求 1 中，形成新的权利要求 1。

2、删除权利要求 2、3，并相应的修改其他权利要求的编号和引用关系。

以上修改没有超出原权利要求书和说明书的范围。详见修改后的权利要求书。

二、关于权利要求 1 的创造性

在进行创造性争辩之前，要指出审查意见里中提出的对比文件 4 的公开时间是 2020-02-15，本专利的申请日是 2018-10-31，远在本申请的申请日之后，因此，对比文件 4 不构成本申请的现有技术，不能用来评述本申请的创造性和新颖性。通过后期和审查员沟通了解到，审查员之所以选择对比文件 4 是因为该对比文件是本申请人的发明人团队后期发表的文章，而文章中公开的部分实验数据与本申请的实验数据有差异，需要申请人在答复审查意见时加以解释说明。

申请人的论文中主要分离了三个多糖，本申请的这个迭鞘石斛酸性多糖的体外细胞免疫活性没有其他两个高，但实际上是这个多糖体外细胞实验免疫活性不是很高，但经过多次实验表明本申请的这个迭鞘石斛酸性多糖在体内小鼠实验显示免疫活性非常强，而其他两个体内实验显示免疫活性，所以当时申请人申请专利时选择的是本申请的这一个多糖。为了证明这一点，申请人在本次

意见答复中增加了多糖体内实验的数据；并增加了这个多糖的结构以示证明。

审查意见里指出：本领域技术人员知晓，不同多糖在不同浓度的低级醇或酮中具有不同的溶解度，一般随着聚合度和相对分子质量的增大，在乙醇中的溶解度逐步降低。根据这一性质，在糖的浓水溶液中，逐次按比例由小而大加入这些醇或酮（常见的有甲醇、乙醇、异丙醇、丙醇、丙酮），使浓度渐增，进行分级沉淀（证据文件 3）。据此，为了获得不同级分的迭鞘石斛酸性多糖，本领域技术人员有动机采用逐次按比例由小而大加入乙醇，通过增加乙醇浓度来实现目标酸性多糖的分离纯化，不存在技术障碍。即本领域技术人员有动机选用分级沉淀的方式来分离迭鞘酸性多糖，且根据本领域普通技术知识可知，其可分离出分子量不同的多种迭鞘石斛酸性多糖。

申请人并不认同这一观点，申请人认为：**修改后的权利要求 1 与对比文件 1 的区别在于：**两者醇沉工艺不同，本申请的制备工艺可概括为迭鞘石斛粉末——去除脂溶性物质——碱提取——中和碱——去蛋白——分级沉淀——超声波振荡沉淀——有机溶剂洗涤——透析——冷冻干燥，首次采用“超声波振荡沉淀”方法用于纯化多糖，使多糖高度纯化。权利要求 1 采用分级沉淀的方式分离出了特定级分的迭鞘石斛酸性多糖，并限定了具体的醇沉工艺，而对比文件 1 公开的是醇沉，保留沉淀；两者的其他工艺和参数均有不同。所述步骤 1 中的石油醚的沸点为 60-90℃，迭鞘石斛粉末与石油醚的质量体积比（g/ml）为 1:4-3:4；回流提取时间为 0.5h-1.5h；所述乙醇的体积百分含量为 80%；所述步骤 1 中的氢氧化钠与迭鞘石斛粉末的摩尔质量比（mmol/g）为 1:1-5:1；磁力搅拌浸提时间为 4-8h；所述步骤 1 中的第一次旋转蒸发的物质与迭鞘石斛粉末体积质量比为 3:2-7:2，Sevag 试剂为体积比为 1:4 的正丁醇和三氯甲烷；Sevag 试剂与迭鞘石斛粉末体积质量比为 3:2-7:2，第二次旋转蒸发的上清液与迭鞘石斛粉末的体积质量比（mL/g）为 5:2-10:2；所述步骤 3 中的透析时间为 64h-80h，8h 换一次水。

基于上述区别技术特征，对比文件 1 制备了 5 种石斛酸性多糖，其中迭鞘石斛多糖结构上连接的糖醛酸含量为 **112.983mg/g**，红外光谱的结构特征峰值为：迭鞘石斛 3433.92，3415.27，2997.70，1630.50，1418.83，1412.88，1248.24，1145.23，1052.54，1044.22，896.25，为 β 构型的多糖。

而本发明所获得的酸性多糖结构中糖醛酸含量为 **292.2 mg/g**，红外光谱的结构特征峰为 3426.12, 2930.33, 2078.59, 1644.02, 1521.81, 1422.74, 1079.09, 1018.65, 858.87, 762.94, 709.17, 579.87, 530.48，且为 α 构型的多糖，故本发明所获得的酸性多糖完全不同于对比文件中的酸性多糖，本技术提取分离的酸性多糖为全新的多糖，这个结构独一无二。而且只要缺乏或者改变了该酸性多糖制备的任何环节，都不能得到这个酸性多糖，该工艺是一个整体的方案，不能拆分，更不能省略或者替换其中某步骤，本技术具有现有技术不具备的创造性。

由图 1-图 4 可知，本发明制备的迭鞘石斛酸性多糖能有效提高 RAW264.7 细胞吞噬能力，在较高浓度时能促进 RAW264.7 细胞分泌 IL-6；采用制备的活性成分迭鞘石斛酸性多糖对糖醛酸含量的测定，糖醛酸含量为 **290.5 mg/g**。能有效提高 RAW264.7 细胞吞噬能力，吞噬指数为 **1.94**。能够促进 RAW264.7 细胞分泌 TNF- α ，TNF- α 的产量为 **1705pg/mL**。因此，本申请相对于对比文件 1 具有预料不到的技术效果。

审查意见里指出：对比文件 2 明确教导了“石斛多糖作为石斛属植物重要的药用成分之一，已被证实具有增强免疫力的作用”和“中科院成都生物研究所植化组从迭鞘石斛中提取的迭鞘石斛多糖对小鼠淋巴细胞增殖以及腹腔巨噬细胞的增殖具有增强作用，且可明显促进 IL-2 和 IL-6 的分泌，且具有量效关系”。据此，本领域技术人员能够获知本申请制备的特定级分的迭鞘石斛多糖也应具有免疫活性。此时，判断本申请请求保护的特定级分的迭鞘石斛多糖具备创造性的关键则为请求保护的多糖在免疫活性方面是否取得了不可预期的技术

效果。

申请人并不认同这一观点，申请人认为：对比文件 2 公开了石斛多糖作为石斛属植物重要的药用成分之一，已被证实具有增强免疫力的作用。但是文献仅限于动物水平上的药理作用，而且对比文件 2 公开的石斛多糖也只显示只能促进小鼠的白细胞介素 2 和 6(IL-2, IL-6)的分泌,不能促进肿瘤坏死因子(TNF- α) 的分泌，也没有提到在细胞水平的实验效果。同时，也没有公开“糖醛酸含量为 290.5 mg/g、能有效提高 RAW264.7 细胞吞噬能力，吞噬指数为 1.94、能够促进 RAW264.7 细胞分泌 TNF- α ，TNF- α 的产量为 1705pg/mL”技术效果；因此，本发明所获得的酸性多糖，不但可以促进白细胞介素的分泌，同时还能促进肿瘤坏死因子（TNF- α ）的分泌，这是对比文件 2 所不具备的技术效果。故申请相对于对比文件 2 具有预料不到的技术效果。

对比文件 3：“生物活性成分分离技术（第 1 版）”，王振宇等，第 79-80 页，哈尔滨工业大学出版社，2015 年 05 月 31 日，不同多糖在不同浓度的低级醇或酮中具有不同的溶解度，一般随着聚合度和相对分子质量的增大，在乙醇中的溶解度逐步降低，不存在技术障碍且技术效果可预期。

申请人并不认同这一观点，申请人认为：虽然“不同多糖在不同浓度的低级醇或酮中具有不同的溶解度，一般随着聚合度和相对分子质量的增大，在乙醇中的溶解度逐步降低”这是目前普遍认可的规律，但是，并没有教导本领域技术人员将该技术用于选翘石斛酸性多糖的制备中。就好比我国诺贝尔奖获得者屠呦呦发现青蒿素的过程一样，当时的普遍共识是不同极性的溶剂可以提取获得不同的化学成分，而“乙醚”也常常用于中药化学成分的提取。但是当时没有人用乙醚去提取青蒿里的化学成分，这时屠呦呦尝试用乙醚提取青蒿，结果在乙醚提取物中发现了青蒿素。所以，虽然目前有用乙醇或酮类溶剂制备多糖等大分子化合物，但是没有现有技术和文献报道将这种分级沉淀的方法用于选翘石斛这种材料的研发，更没有文献报道采用这种技术制备能得到“糖醛酸

含量为 290.5 mg/g、能有效提高 RAW264.7 细胞吞噬能力，吞噬指数为 1.94、能够促进 RAW264.7 细胞分泌 TNF- α ，TNF- α 的产量为 1705pg/mL”的酸性多糖所取得的技术效果；因此，本申请相对于对比文件 3 具有预料不到的技术效果。

审查意见里指出：其一，对比文件 1 未公开其制备的迭鞘石斛酸性多糖的上述性能，本领域技术人员看不出本申请请求保护的迭鞘石斛多糖较对比文件 1 在上述性能方面孰优孰劣。其二，对比文件 2 公开的免疫活性方法和性能指标均与本申请不同，使得本领域技术人员亦无法评判请求保护的迭鞘石斛多糖的技术水平。故而，基于目前的证据，无法判断本申请请求保护的具有特定糖醛酸含量、具有特定红外光谱结构特征峰的迭鞘石斛酸性多糖较对比文件 1 公开的酸性多糖或其他级分的多糖在免疫活性等方面取得了预料不到的技术效果。

那么，很显然审查意见就进一步认同，对比文件 1 和 2 相结合对本申请不构成技术启示。如果对比文件都难以给出相应的技术启示，无法教导本领域技术人员根据对比文件及其现有技术的结合得出本技术方案，这不是说明本申请具有创造性吗？

审查意见里还指出：为了客观评判请求保护技术方案在免疫活性方面的技术水平，审查员仔细分析了申请人四川农业大学的硕士学位论文（参考文献 4：“叠鞘石斛多糖的提取分离及生物活性研究”，黄琴，中国优秀硕士学位论文全文数据库医药卫生科技辑，2020 年第 02 期，E057-128，2020 年 02 月 15 日），该论文的指导教师范益军为本申请的第二发明人，该论文作者的另一指导老师罗傲雪为本申请的第一发明人（信息获自硕士论文的致谢部分）。参考文献中 ddp60 在对 RAW264.7 细胞吞噬能力、TNF- α 和 IL-6 方面的效果劣于 ddp40 和 ddp80。这间接佐证了本申请保护的目标多糖的免疫活性差于其他级分，也理应差于其他级分的组合。

申请人并不认同这一观点，申请人认为：首先，对比文件 4 的公开时间是 2020-02-15，本专利的申请日是 2018-10-31，对比文件 4 的公开时间远在本申

请的申请日之后，因此，对比文件 4 不够成本申请的现有技术，不能用来评述本申请的创造性和新颖性。其次，即使是本申请人文献中的不同级分的组合熟好熟劣，并不影响本申请的效果最差的级分的组合就高于现有文献（对比文件 1 和 2）；这并不影响本申请的技术效果，现有文献中并没有能证明其技术效果高于本申请，因此，无法得到本申请的技术效果。

在此说明，申请人的论文中主要分离了三个多糖，本申请的这个选鞘石斛酸性多糖的体外细胞免疫活性没有其他两个高，但实际上是这个多糖体外细胞实验免疫活性不是很高，但经过多次实验表明本申请的这个选鞘石斛酸性多糖在体内小鼠实验显示免疫活性非常强，而其他两个体内实验显示免疫活性，所以当时申请人申请专利时选择的是本申请的这一个多糖。为了证明这一点，申请人在本次意见答复中增加了多糖体内实验的数据；并增加了本申请多糖的结构；

图1 本发明实施例多糖的结构:

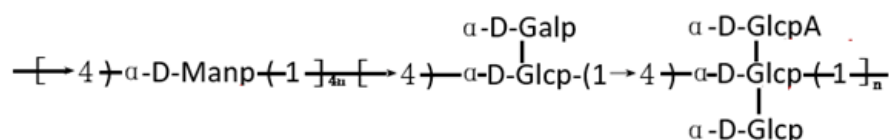


图 2 本发明实施例多糖对环磷酰胺诱导免疫功能低下小鼠的免疫指数的影响:

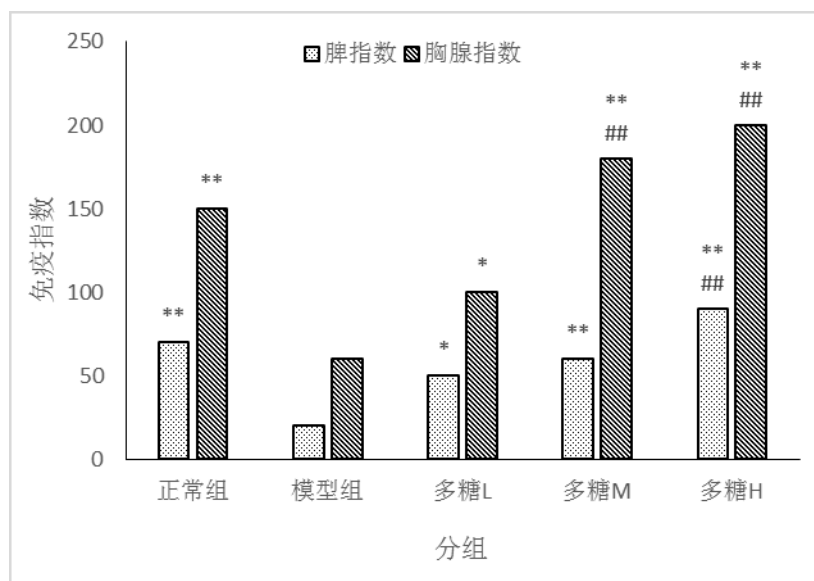
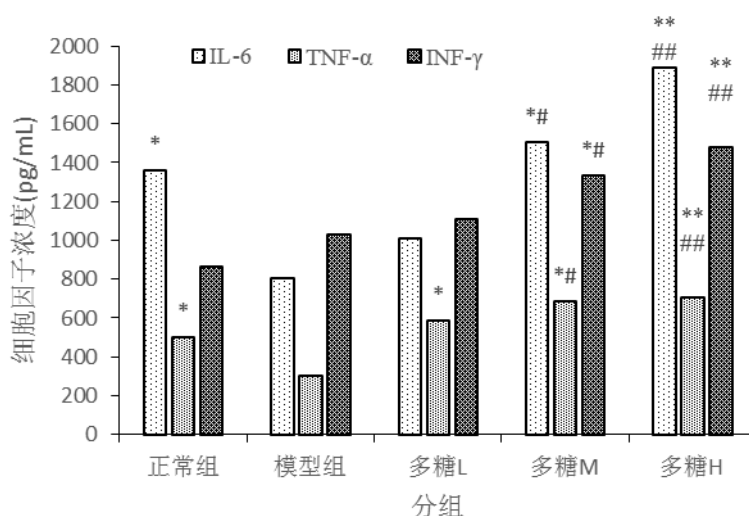


图 3 本发明实施例多糖对环磷酰胺诱导免疫功能低下小鼠的细胞因子释放的影响：



上述实验选取昆明种小鼠，体重 20.0 ± 2.0 g，雌雄各半，随机分成 5 个组，即对照组，模型组和酸性多糖组（ 2.5 mg/kg/d， 5.0 mg/kg/d， 10.0 mg/kg/d）。正常组及模型组连续 20 d 灌胃生理盐水，其他组灌服多糖；除正常组外所有小鼠于第 10、11、12 天分别腹腔注射一定剂量的环磷酰胺（CP）（ 10 mL/kg BW）。末次给药后次日，用电子天平精确称取小鼠体质量，摘眼球取血后处死，取小鼠胸腺，脾脏称其质量，按下列公式计算胸腺系数和脾脏系数。脏器指数=脏器质量（mg）/体重（g） $\times 10$ 。血样静置 1 h 后离心取上清。按 ELISA 试剂盒说明书操作，检测血清中 IL-6、TNF- α 、INF- γ 细胞因子的含量。

本研究证实，由环磷酰胺刺激引起免疫低下老鼠的胸腺指数和脾指数与酸性多糖存在剂量依赖性，随着酸性多糖的浓度增加，胸腺指数和脾指数逐渐增加，且在高剂量（ 10.0 mg/kg/d）时与模型组相比呈现极显著（图 2）。同时，石斛酸性多糖能显著增加由环磷酰胺刺激引起的 IL-6、TNF- α 、INF- γ 低水平，随着酸性多糖浓度增加，血清中细胞因子的含量增加，说明酸性多糖能在体内促进免疫低下小鼠细胞因子的分泌（图 3）。

最后，申请人恳请审查员更多的以事实证据为依据，更多的采用举证的方式来评价本申请的上述区别技术特征对创造性的贡献，而尽量避免主观臆断。

综上所述，本申请相对于对比文件 1-3（对比文件 4 并不能够成本申请的现有技术）以及公知常识具有突出的实质性特点和显著的进步，因而具有创造性。

三、关于修改后权利要求 2-4 的创造性

基于相同理由，在修改后的权利要求 1 具有创造性的前提下，权利要求 2-4 也必然具有创造性。

综上所述，本申请文件公开的技术方案具有突出的实质性特点和显著的进步，因而具有创造性。如有问题，望及时联系申请人或代理人，给予再次答复的机会，联系电话：13551134124。

请审查员继续审查。再次对审查员老师对本案审查所付出的辛勤劳动表示感谢！

申请人：四川农业大学

2021 年 04 月 27 日