

jvelasquez@correo.siq.gov.co 173

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 03-038031- -00009-0000

Fecha: 2009-03-10 15:03:03 Dep. 2020 NUECREACION  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII  
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 12

Señora

Jefe de la División de Nuevas Creaciones

Superintendencia de Industria y Comercio

Ministerio de Desarrollo Económico

E. S. D.

Ref.: Expediente No. 03.038.031

Solicitud de Patente de Invención para: **PROCESO PARA LA TIPIFICACION RAPIDA DE MICROORGANISMOS Y JUEGO DE REACTIVOS EMPLEADOS**

Solicitante: **CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS (CNIC)**

## **RESPUESTA AL EXAMEN DE FONDO**

**MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO**, mayor de edad, identificada y domiciliada como aparece al pie de mi firma, atentamente me permito presentar respuesta al oficio No. 15769 notificado por fijación en lista el 12 de diciembre de 2008 correspondiente al examen de fondo, estando dentro del término legal en los siguientes términos:

### **Claridad de las reivindicaciones**

Presento a consideración del examinador un juego nuevo de 14 reivindicaciones enmendadas las cuales sustituyen a las antiguas reivindicaciones enmendadas 1-14 con el fin de superar la objeción por claridad. En dicho pliego no se adicionó materia nueva, sino que las reivindicaciones se modificaron de acuerdo con las sugerencias del señor examinador. Así mismo, las reivindicaciones 11 a 14 han sido modificadas como procedimientos.

### **Consideraciones generales en respuesta a las objeciones de su Despacho**

Pongo de presente a su Despacho que en la preparación de ADN inmovilizado de bacterias para ser analizado mediante PFGE no es posible desligar el uso del molde del proceso de preparación de las muestras de ADN. La única forma para que el proceso de preparación de muestras sea exitoso y por tanto se puedan obtener resultados de calidad durante la electroforesis es preparando ADN inmovilizado en bloques de agarosa mediante un molde diseñado al efecto. De lo contrario, cuando se aísla el ADN en disolución las moléculas sufren rotura mecánica y después los resultados en PFGE no son adecuados aunque las disoluciones que se hayan utilizado durante la preparación sean las correctas.

**CASTELLANOS & CO.**

A B O G A D O S

Calle 94 A No. 7 A - 09

Bogotá, D.C., COLOMBIA

En particular, en esta solicitud, son las características del molde combinadas con las disoluciones que se emplean para preparar el ADN bacteriano inmovilizado en minibloques de 0.07cm de grosor lo que confiere parte del nivel inventivo al procedimiento propuesto. De aquí, la unidad de la invención en estos aspectos.

Por otra parte, aunque los componentes de algunas de las disoluciones reivindicadas en esta solicitud son utilizados ampliamente para aislar ADN, otros no lo son como es el caso de la Urea; además de que es precisamente las combinaciones de reactivos, así como el procedimiento mediante el cual se usan esas disoluciones las que permiten obtener los resultados que se muestran en la solicitud.

**Nivel inventivo**

Con el fin de superar la objeción por nivel inventivo, pongo a consideración de su Despacho los siguientes argumentos que demuestran la actividad inventiva de la presente invención en vista de los documentos D1-D3.

**Documento D1**

La única similitud entre lo reclamado en esta solicitud y lo publicado en D1 es que el método de uso del conjunto de disoluciones y el molde flexible permiten la preparación de ADN intacto e inmovilizado de bacterias de calidad para ser analizado mediante PFGE en menos de dos horas y el protocolo propuesto en D1 lo realiza en aproximadamente en 2 a 3 horas.

Sin embargo, en D1 se utilizan enzimas líticas y proteasas, las cuales no son utilizadas en esta solicitud. En las nuevas reivindicaciones modificadas donde se reclama el procedimiento para preparar ADN intacto e inmovilizado mediante el molde flexible y el conjunto de disoluciones (Nº 12-14) no se pretende reivindicar la utilidad, ni la duración, ni rapidez de dicho procedimiento sino solamente la secuencia de etapas lo cual incluye cuales disoluciones del juego de reactivos se utilizarían para preparar el ADN intacto e inmovilizado de *E. coli*, *P. aeruginosa* o *S. aureus*. Se incluye el tiempo de duración de algunas de las etapas ya que este es una característica física inherente a algunas de las disoluciones utilizadas.

**Documentos D2 y D3**

Ahora bien, las diferencias con los documentos D2 y D3 estriban en que en ellos se describen procedimientos de preparación de ADN intacto e inmovilizado sin utilizar enzimas líticas en el caso de D2 y de Proteinasa K en el caso de D3, pero es para casos particulares de microorganismos como el *Streptococcus pneumoniae*, lo cual no hace suponer para nada que este resultado sea generalizable a otros géneros y especies bacterianas.

**CASTELLANOS & CO.**

A B O G A D O S

Calle 94 A No. 7 A - 09

Bogotá, D.C., COLOMBIA

Las evidencias experimentales acerca de la solución positiva de la problemática, es decir sobre la calidad de las muestras de moléculas de ADN intacto e inmovilizado de *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*, que son preparadas con el juego de reactivos compuesto por las disoluciones reclamadas en esta solicitud y el molde flexible, son que estas moléculas se digieran totalmente con enzimas de restricción, que no se degraden o fraccionen durante el tratamiento y que cuando se sometan a PFGE se obtengan patrones de bandas nítidos, en los cuales no aparezca barrido (señal de degradación o ruptura mecánica de las moléculas) con bandas con la misma forma del pozo de aplicación y semejante grosor en todas las carrileras.

Estas evidencias se pueden apreciar en las **Figuras 3, 4 y 10** (ver también pies de figuras en la descripción). En la Esencia de la Invención también se muestran otros ejemplos de preparación de ADN intacto e inmovilizado de otros microorganismos en los cuales se utiliza el molde flexible (**Ejemplo 2, Figura 2** y pie de la misma, en la descripción). Estas también son evidencias experimentales de que durante la inmovilización de las células en los moldes se producen bloques de tamaños homogéneos ya que en los patrones de bandas después del análisis de las moléculas de ADN en ECP se obtienen bandas de semejante grosor en todas las carrileras y con formas semejante al pozo de aplicación. No se reclama la inmovilización de células diferentes a las bacterianas en bloques de agarosa formados en esos moldes en aras de mantener la unidad de la invención. No obstante, el **Ejemplo 2** y la **Figura 2** aportan evidencias experimentales adicionales de la utilidad y funcionalidad del molde flexible que se reclama en la solicitud.

A partir de lo publicado por Gautom (D1) y Mc Ellistrem (D3) no era posible deducir que disoluciones que contienen Urea eran capaces de liberar y desproteínizar las moléculas de ADN bacteriana y que la utilización secuencial del conjunto de disoluciones que se reclama permitiría la preparación de ADN intacto e inmovilizado de *P. aeruginosa*, *E. coli* o *S. aureus*.

De hecho, uno de los argumentos para realizar la afirmación anterior es que el mecanismo de acción de la Lisozima y la Proteínasa K es totalmente diferente al de las disoluciones que se reclaman en este trabajo. De igual forma, el mecanismo por el cual se explica en D3 que no es necesario utilizar Proteínasa K (porque el *S. pneumoniae* posee una proteasa intracelular que ayuda aleatoriamente en el proceso de preparación de las muestras de ADN) es totalmente diferente al de las disoluciones que se reclaman en este trabajo.

En este orden de ideas, en la actualidad continúan utilizándose reactivos enzimáticos costosos para preparar ADN intacto e inmovilizado de bacterias, a pesar de las informaciones conocidas del estado del arte y que en este momento las enfermedades infecciosas permanecen siendo un serio problema emergente de salud. Este hecho provee evidencias adicionales de que no es obvio deducir generalizaciones a partir de la información conocida del estado del arte.

**CASTELLANOS & CO.**

A B O G A D O S

Calle 94 A No. 7 A - 09

Bogotá, D.C., COLOMBIA

De aquí que el conjunto de disoluciones que se reclaman en la solicitud posea actividad inventiva. La simplicidad de la composición de las disoluciones que se reclaman en esta invención: sales, agentes quelantes, detergentes, disoluciones tamponadas y un agente químico que rompe los puentes hidrogenos (urea) facilita su aplicación industrial ya que pueden ser preparadas fácilmente, así como producidas en forma de un juego de reactivos en instalaciones con pocos requerimientos tecnológicos.

En la solicitud de patente se revela un molde que puede estar compuesto de diferentes materiales flexibles y forma minibloques individuales de tamaños idénticos conteniendo células inmovilizadas.

El molde flexible permite ser doblado para despegarle fácilmente los minibloques de el, y de esta forma los minibloques puedan caer directamente dentro de la disolución de tratamiento y así no es necesario cortarlos, lo cual garantiza que se formen bloques de tamaños homogéneos y que no sea necesario manipularlos con aditamentos adicionales. Esta propiedad de ser flexible lo diferencia de las soluciones conocidas en el estado del arte que describen moldes rígidos que no pueden ser doblados. La propiedad de generar bloques del tamaño de los que serán utilizados también lo diferencia de las soluciones conocidas en el estado del arte en las que los bloques se forman de dimensiones diferentes a las que se colocan en los geles y al momento de utilizarlos hay que cortarlos con otros aditamentos.

Los materiales flexibles empleados para construir el molde descrito en la solicitud de patente pueden ser esterilizados en autoclave. Los moldes que pueden ser esterilizados en autoclave son útiles para tipificar bacterias patógenas porque ellos incrementan la bioseguridad del proceso. Los moldes conocidos con anterioridad están compuestos por materiales que no pueden ser esterilizados en autoclave.

El molde reivindicado en la presente solicitud permite formar minibloques individuales e idénticos, mientras que los moldes conocidos en el estado del arte forman tiras de agarosa que tienen que ser cortadas para obtener los minibloques lo cual constituye una manipulación adicional. Cuando las tiras de agarosa son cortadas pueden obtenerse minibloques de diferentes tamaños. El uso de minibloques de diferentes tamaños afecta la reproducibilidad de los patrones de bandas.

El nivel inventivo de esta parte de la invención es la estructura (forma) del molde y las características físicas que le confieren los materiales flexibles utilizados para su construcción, por ej, silicona. Los materiales flexibles poseen la propiedad de poder ser esterilizados por autoclave y doblados, así como también mayor durabilidad, por ej. el molde de acrílico es mas frágil. El molde descrito en esta solicitud permite obtener directamente minibloques individuales sin realizar manipulaciones adicionales.

Por otra parte, la construcción de estos moldes es mas simple, ya que los materiales flexibles pueden ser fundidos y los moldes contruidos en un 'pre-molde' diseñado previamente para que le confiera la forma requerida al molde de formar minibloques independientes.

**CASTELLANOS & CO.**  
A B O G A D O S  
Calle 94 A No. 7 A - 09  
Bogotá, D.C., COLOMBIA

Esta tecnología facilita la producción industrial del molde. Por último, los moldes de acrílico tienen que ser contruidos uno a uno mediante carpintería de plástico.

Así las cosas, solicito a su Despacho conceder el privilegio de patente a la presente invención toda vez que las objeciones de su Despacho han sido claramente superadas con los argumentos previamente expuestos.

**Anexos**

- Nuevo capítulo reivindicatorio
- Formulario de Modificaciones
- Recibo de Pago

De la Señora Jefe,

  
Margarita Castellanos Abondano

C.C. No. 39.779.654 de Usaquén

T.P.A. No.70819 del C. Sup. de la Judicatura

Calle 94 A No. 7 A - 09

Teléfonos: 610 74 20

Bogotá, D.C.,

**- 9 MAR. 2009**



**Industria y Comercio**  
SUPERINTENDENCIA

Espacio reservado para el adhesivo de radicación

**FORMULARIO ÚNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES**

① SOLICITUD DE:

☐ Corrección de Error Material      ☒ Modificación a una solicitud

|               |                                                                                                  |                               |                               |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| ② SOLICITANTE | Nombre: <b>CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS (CNIC)</b>                             | IDENTIFICACIÓN                |                               |
|               | Dirección: <b>Ave. 25 No. 15202 esq a 158, Cubanacán, Playa, Ciudad de la Habana 12100, CUBA</b> | C.C. <input type="checkbox"/> | NIT <input type="checkbox"/>  |
|               | Nacionalidad o Domicilio: <b>CUBA</b>                                                            | C.E. <input type="checkbox"/> | Otro <input type="checkbox"/> |
|               |                                                                                                  | Cual _____                    |                               |
|               | Teléfono: _____ Fax: _____                                                                       | Número _____                  |                               |
|               | E-mail: _____                                                                                    |                               |                               |

|                             |                                                  |                                          |                               |
|-----------------------------|--------------------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------|
| ③ REPRESENTANTE O APODERADO | Nombre: <b>MARGARITA CASTELLANOS A.</b>          | IDENTIFICACIÓN                           |                               |
|                             | Dirección: <b>CALLE 94A No. 7A-09</b>            | C.C. <input checked="" type="checkbox"/> | NIT <input type="checkbox"/>  |
|                             | Teléfono: <b>610 74 20</b> Fax: <b>610 07 06</b> | C.E. <input type="checkbox"/>            | Otro <input type="checkbox"/> |
|                             | E-mail: <b>info@castellanosyco.com</b>           | Cual _____                               |                               |
|                             |                                                  | Número <b>39'779.654</b>                 | TPA <b>70.819</b>             |

④ Número de Expediente: **03.038.031**

⑤ Descripción de la corrección o modificación solicitada:

Presento nuevo pliego reivindicatorio sobre el cual solicito se otorgue el privilegio de patente

⑥ Comprobante de pago No. **09-18,784** Fecha **9 de marzo de 2009**

⑦ Anexos:

☒ Comprobante de pago de la tasa.

☐ Poderes si fuere el caso, junto con la sustitución de los mismos a mi favor.

☐ Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas

☒ Nuevo capítulo reivindicatorio

☐ Nuevo resumen

⑧ NOMBRE **MARGARITA CASTELLANOS A.** FIRMA   
CC 39'779.654 Usaquén - TPA 70.819 CSJ

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página - MCA/ P954

- 9 MAR. 2009

7954  
179

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 03-038031- -00009-0000

Fecha: 2009-03-10 15:03:03 Dep. 2020 NUECREACION  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII  
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 12

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 18,784  
FECHA : MARZO 9 DE 2009

\*\*\*\*\* CONSIGNACION \*\*\*\*\*

| DEPOSITANTE        | TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO | FECHA PGO  | Vr. PAGO     |
|--------------------|--------------|-----------------|-----------|----------|------------|--------------|
| ALVARO CASTELLANOS | CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 19884804 | 09/03/2009 | 1,011,000.00 |

\*\*\*\*\* CONCEPTO \*\*\*\*\*

| CANT. | RENTISTICO  | CONCEPTO                       | TOTAL CONCEPTO                |
|-------|-------------|--------------------------------|-------------------------------|
| 1     | 50005-01-03 | CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA | 12 MARCAS Y LEMAS COMERCIALES |
|       |             | TOTAL :                        | \$ 111,000.00                 |

CON: CIENTO ONCE MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. \_\_\_\_\_

## REIVINDICACIONES

1. Molde, conjunto de disoluciones compuestas solamente por reactivos químicos las cuales conforman un juego de reactivos, y procedimiento por medio del cual se preparan moléculas de ADN intactas e inmovilizadas a partir de células de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* o *Staphylococcus aureus* incluidos en minibloques de agarosa de 0.07 cm de grosor, disoluciones caracterizadas porque poseen las siguientes composiciones:

- una sal (NaCl 0.15 M) o un agente quelante de metales (EDTA 0.01M) y una sal (NaCl 0.15M), disoluciones de dicho juego de reactivos por medio de las cuales las células bacterianas se lavan e incluyen en minibloques de agarosa,

- un agente quelante de metales (EDTA 0.1M), dos detergentes aniónicos (Sarcosil 1% y Nonidet P-40 1%) y Tris base 0.01M, disoluciones que podrían contener adicionalmente Urea 4M, disoluciones de dicho juego de reactivos mediante las cuales las células bacterianas se tratan,

- un agente quelante de metales (EDTA 0.1M) y Tris base 0.01M, disolución de dicho juego de reactivos mediante la cual los minibloques se lavan y se conservan;

siendo dicho conjunto de disoluciones utilizadas secuencialmente de acuerdo con un procedimiento.

2. Conjunto de disoluciones de la reivindicación N° 1 caracterizado porque la composición de una disolución para el lavado de células de dicho juego de reactivos es NaCl 0.15M y EDTA 0.01M, pH 8.0 (disolución N° 1).

3. Conjunto de disoluciones de la reivindicación N° 1 caracterizado porque la composición de una disolución para el lavado de células de dicho juego de reactivos es NaCl 0.15M (disolución N° 2).

4. Conjunto de disoluciones de la reivindicación N° 1 caracterizado porque la composición de una disolución para la inmovilización de células de dicho juego de reactivos es agarosa de bajo punto de gelificación fundida en NaCl 0.15M a una concentración de 1.5 % (disolución N° 3).
5. Conjunto de disoluciones de la reivindicación N° 1 caracterizado porque la composición de una disolución para la inmovilización de células de dicho juego de reactivos es agarosa de bajo punto de gelificación fundida en NaCl 0.15M y EDTA 0.01M, pH 8.0 a una concentración de 1.5 % (disolución N° 4).
6. Conjunto de disoluciones de la reivindicación N° 1 caracterizado porque la composición de una disolución de tratamiento de células de dicho juego de reactivos es EDTA 0.1 M, Sarcosil 1 %, Nonidet P-40 1 % y Tris base 0.01 M, pH 8.0 (disolución N° 5).
7. Conjunto de disoluciones de la reivindicación N° 1 caracterizado porque la composición de una disolución de tratamiento de células de dicho juego de reactivos es EDTA 0.1 M, Sarcosyl 1 %, Nonidet P-40 1 %, Tris base 0.01M y Urea 4M, pH 8.0 (disolución N° 6).
8. Conjunto de disoluciones de la reivindicación N° 1 caracterizado porque la composición de la disolución de lavado y conservación de los minibloques de dicho juego de reactivos es EDTA 0.1 M y Tris base 0.01M, pH 8.0 (disolución N° 7).
9. Moldes de la reivindicación N° 1, moldes flexibles para formar minibloques de agarosa que contienen células bacterianas; moldes caracterizados porque son láminas de materiales tales como la silicona, y se cubren con tapas de vidrio; láminas que poseen hasta 0.5 cm de grosor y tienen estampadas en una de sus superficies múltiples depresiones cuadradas

con lados de 0.3 cm de tamaño y desde 0.03 hasta aproximadamente 0.1 cm de profundidad, depresiones en las cuales la mezcla de agarosa y células bacterianas solidifica formando minibloques con dichas dimensiones, moldes que son lo suficientemente flexibles para doblarse y permitir que los minibloques se despeguen de los mismos, moldes que son reutilizables después de esterilizarlos mediante autoclave, siendo dichos moldes y tapas ensamblados completamente, para preparar mediante un procedimiento, minibloques de agarosa de 0.07 cm de grosor conteniendo células de bacterias inmovilizadas en su interior.

10. Moldes flexibles de la reivindicación N° 9 caracterizados porque las láminas flexibles que los forman son de silicona, goma o cualquier otro material flexible, láminas que pueden tener cualquier forma, tamaño y cantidad de depresiones cuadradas idénticas (preferentemente hasta 50) estampadas en una superficie.

11. Procedimiento caracterizado porque para preparar ADN intacto inmovilizado en minibloques de agarosa de 0.07cm de grosor mediante uno de dichos moldes flexibles de la reivindicación N° 9 comprende los pasos siguientes:

- i) verter la suspensión de células bacterianas y agarosa sobre la superficie del molde que posee estampadas las depresiones;
- ii) distribuir uniformemente dicha suspensión con una espátula hasta rellenar dichas depresiones;
- iii) cubrir el molde con su tapa y esperar hasta que se formen los minibloques;
- iv) doblar el molde sobre un frasco cualquiera para despegar los minibloques.

12. Procedimiento caracterizado porque la preparación de ADN intacto e inmovilizado proveniente de células de *P. aeruginosa* incluido en bloques de agarosa de 0.07 cm de grosor mediante dicho juego de reactivos y de uno de los mencionados moldes flexibles de las reivindicaciones N° 1 y 9, comprende los pasos siguientes:

- i) coleccionar las células del microorganismo cultivadas en medio líquido o sólido y lavarlas en la disolución N° 2 de dicho juego de reactivos,
- ii) resuspender dichas células en la disolución N° 3 de dicho juego de reactivos y verter la suspensión sobre un molde flexible,
- iii) despegar los minibloques del molde, después que la agarosa solidifique, doblando dicho molde e incubar los minibloques en la disolución N° 6 de dicho juego de reactivos durante 30 minutos a 50°C,
- iv) lavar los minibloques dos veces a 50°C durante 10 minutos en la disolución N° 7 de dicho juego de reactivos y posteriormente conservarlos en dicha disolución.

13. Procedimiento caracterizado porque la preparación de ADN intacto e inmovilizado proveniente de células de *S. aureus* incluido en bloques de agarosa de 0.07 cm de grosor mediante dicho juego de reactivos y de uno de los mencionados moldes flexibles de las reivindicaciones N° 1 y 9, comprende los pasos siguientes:

- i) coleccionar las células del microorganismo cultivadas en medio líquido o sólido y lavarlas en la disolución N° 1 de dicho juego de reactivos,
- ii) resuspender dichas células en la disolución N° 4 de dicho juego de reactivos y verter la suspensión sobre un molde flexible,
- iii) despegar los minibloques del molde, después que la agarosa solidifique, doblando dicho molde e incubar los minibloques en la disolución N° 6 de dicho juego de reactivos durante 60 minutos a 50°C,

- iv) lavar los minibloques dos veces a 50°C durante 10 minutos en la disolución N° 7 de dicho juego de reactivos y posteriormente conservarlos en dicha disolución.

14. Procedimiento caracterizado porque la preparación de ADN intacto e inmovilizado proveniente de células de *E. coli* incluido en bloques de agarosa de 0.07 cm de grosor mediante dicho juego de reactivos y de uno de los mencionados moldes flexibles de las reivindicaciones N° 1 y 9, comprende los pasos siguientes:

- i) coleccionar las células del microorganismo cultivadas en medio líquido o sólido y lavarlas en la disolución N° 1 de dicho juego de reactivos,
- ii) resuspender dichas células en la disolución N° 3 de dicho juego de reactivos y verter la suspensión sobre un molde flexible,
- iii) despegar los minibloques del molde, después que la agarosa solidifique, doblando dicho molde, e incubar los minibloques en la disolución N° 5 de dicho juego de reactivos durante 10 minutos a 37°C,
- iv) incubar los minibloques en la disolución N° 6 de dicho juego de reactivos durante 30 minutos a 50°C.
- v) lavar los minibloques dos veces a 50°C durante 10 minutos en la disolución N° 7 de dicho juego de reactivos y posteriormente conservarlos en dicha disolución.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Radicación No. 03-38031  
Clasificación Internacional (IPC): C12Q1/68.  
Concepto Técnico No. 727

|                                 |                                     |                               |                                     |
|---------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|
| Patente de Invención            | <input checked="" type="checkbox"/> | Patente de Modelo de Utilidad | <input type="checkbox"/>            |
| Vía Nacional                    | <input type="checkbox"/>            |                               |                                     |
| Vía PCT (fase nacional)         | <input checked="" type="checkbox"/> | Cap. I                        | <input type="checkbox"/>            |
|                                 |                                     | Cap. II                       | <input checked="" type="checkbox"/> |
| No. Sol. Internacional          | <u>PCT/CU01/00008</u>               |                               |                                     |
| Fecha de Presentación Internal. | <u>02/11/2001</u>                   |                               |                                     |

Como resultado del examen definitivo, realizado con fundamento en el artículo 48 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica:

1. Documentos estudiados

|                                    |                   |                                    |
|------------------------------------|-------------------|------------------------------------|
| <u>Descripción:</u>                | Folios: 9 a 53    | como se radicó inicialmente        |
| <u>Reivindicaciones:</u>           | Folios 54 a 67    | como se radicó inicialmente        |
|                                    | Folios 154 a 158  | tal como se modificó el 08/05/2008 |
|                                    | Folios            | tal como se modificó el 10/03/2009 |
| <u>Dibujos:</u>                    | Folios 69 a 78    | tal como se radicó inicialmente    |
| <u>Prioridad:</u>                  | Folios: 1 a 1     |                                    |
|                                    | Fecha             | 7/11/2000                          |
|                                    | País              | CU                                 |
|                                    | Número            | 0247/2000                          |
| <u>Argumentos del solicitante:</u> | Folios: 144 a 151 |                                    |

## 2. Objeto de la invención

- Título de la solicitud: (folio 9) "Proceso para la tipificación rápida de microorganismos y juego de reactivos empleado".
- La presente solicitud se refiere a un proceso de tipificación de microorganismos mediante Electroforesis de Campos Pulsantes PFGE mediante el uso de un juego de reactivos determinado y un molde adecuado para tal fin.
- El problema planteado en esta solicitud es el de realizar una tipificación eficiente de microorganismos, en el menor tiempo y con menos costos en reactivos y materiales.
- Para solucionar este problema técnico, la solicitud en estudio proporciona un conjunto de disoluciones compuestas solamente por reactivos químicos que conforman un juego de reactivos y un molde que produce mini bloques de agarosa el cual puede ser autoclavable, así como una serie de pasos para realizar el procedimiento de tipificación de microorganismos en dicho molde y con dichos reactivos.
- La Clasificación Internacional de Patentes (IPC.) C12Q1/68.

## 3. De la solicitud de Patente

### Reivindicaciones (artículo 30 D 486)

El capítulo reivindicatorio de la solicitud en estudio presenta los siguientes defectos:

- Nuevamente se define un conjunto de disoluciones ampliamente conocidas en el Estado de la Técnica para el análisis de ADN por PFGE y se reivindica además el molde pero sin definirlo por sus características técnicas. De la lectura de la reivindicación 1 no queda claro lo que se pretende proteger dado que la redacción no permite establecer cual es el objeto inventivo si el molde o el conjunto de disoluciones presentado. Debido a que no se mencionan las características técnicas esenciales del molde, cualquier molde empleado para electroforesis de campos pulsantes podría utilizarse como se determina en la reivindicación 1 para llegar al objetivo de obtener minibloques de agarosa de 0.07 cm de grosor.

Por lo anterior, el capítulo reivindicatorio no cumple con el requisito de definición, claridad, concisión o sustento por la descripción de acuerdo al art. 30 de la Decisión 486.y/o art.22 Tratado PCT.

4. Unidad de invención (artículo 25 D 486)

La presente solicitud no tiene unidad de invención, dado que contempla diferentes conceptos inventivos relacionados así:

- Un conjunto de disoluciones compuestas solamente por reactivos químicos las cuales conforman un juego de reactivos por medio del cual se prepara moléculas de ADN intactas e inmovilizadas a partir de células de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* o *Staphylococcus aureus*.
- Moldes flexibles para formar minibloques de agarosa que contienen células bacterianas.

Entre ellos no existe una relación dado que los moldes no ejercen un efecto directo sobre la resolución del problema biotecnológico planteado, el cual es realizar electroforesis de campos pulsantes para tipificación de microorganismos. El molde presenta unas propiedades específicas que lo hacen útil y aplicable en este método pero no es indispensable para llegar a la solución del problema técnico planteado. Es así como no se encuentra asociación entre las ventajas que propone el solicitante cuando reivindica el molde, con el efecto que conceden las disoluciones empleadas sobre la eficiencia en el proceso de tipificación de microorganismos.

Por lo anterior, se puede concluir que la presente solicitud no cumple con el requisito de unidad de invención.

5. Determinación del Estado de la Técnica

- La fecha que se ha tenido en cuenta para determinar el estado de la técnica es: Fecha de presentación de la solicitud prioritaria 07/11/2000
- Teniendo en cuenta la fecha indicada se realizó la búsqueda en el estado de la técnica de documentos relacionados con la solicitud encontrándose los siguientes documentos más relevantes:

| Nº | Documento         | Título                                                                                                                              | Fecha de publicación* |
|----|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| D1 | Romesh K. G.      | "Rapid Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Typing of <i>Escherichia coli</i> O157:H7 and other Gram – Negative Organisms in 1 day" | 28/07/1997            |
| D2 | EP0320937         | "Electrophoresis medium membrane, pulse field electrophoresis method and apparatus"                                                 | 15/12/1988            |
| D3 | McEllistre, M. C. | "Simplified protocol for pulsed-field gel electrophoresis analysis of <i>Streptococcus pneumoniae</i> "                             | 01/2000               |

## 6. Análisis de patentabilidad (artículo 14 D486)

### Nivel inventivo (artículo 18 D486)

La reivindicación 1 y sus dependientes reclaman un molde, un conjunto de disoluciones compuestas solamente por reactivos químicos y un procedimiento por medio del cual se preparan moléculas de ADN intactas e inmovilizadas a partir de células de *E. coli*, *P. aeruginosa* o *S. aureus*. Las disoluciones están caracterizadas porque poseen las siguientes composiciones:

- una sal (NaCl 0.15M) o un agente quelante de metales (EDTA 0.01 M) y una sal (NaCl 0.15M), disoluciones de dicho juego de reactivos por medio de las cuales las células bacterianas se lavan e incluyen en minibloques de agarosa,
- un agente quelante de metales (EDTA 0.1M), dos detergentes aniónicos (Sarcosil 1% y Nonidet P-40 1%) y Tris base 0.01M, disoluciones que podrían contener adicionalmente Urea 4M, disoluciones de dicho juego de reactivos mediante las cuales las células bacterianas se tratan,
- un agente quelante de metales (EDTA 0.1M) y Tris base 0.1M, disolución de dicho juego de reactivos mediante la cual los minibloques se lavan y se conservan;

siendo dicho conjunto de disoluciones utilizadas secuencialmente de acuerdo con un procedimiento.

El documento del estado de la técnica más cercano es D1 que enseña un protocolo para tipificar *Escherichia coli* y otras bacterias Gram negativas en un día mediante PFGE (ver folios: 159 - 162) donde se incluyen procedimientos habituales y procedimientos rápidos. Cualquiera de estos incluye los pasos de:

- o suspender las células en buffer TE (0.1M Tris y 0.1M de EDTA)
- o Incluir las células en bloques de agarosa
- o Posterior a la solidificación de los bloques en el molde, transferir los bloques a una solución buffer- lítica, que comprende (Tris, EDTA, sarcosina al 1% , y 1mg/ml de proteinasa K)
- o Remover la solución empleando agua destilada estéril y luego TE (10 mM de Tris, 1mM de EDTA)

Como se ha identificado antes, la diferencia radica en la utilización de enzimas líticas, particularmente proteinasa K, encargadas de digerir compuestos proteicos y restos celulares que puedan quedar de remanente en los bloques. Este paso sin embargo, no es del todo esencial en el proceso de tipificación de microorganismos por campos pulsantes

D2 enseña en el ejemplo 1 la utilización de gel de agarosa al 1.5% en solución buffer TBE (Tris, ácido bórico, EDTA, NaCl) para llevar a cabo la electroforesis de campos pulsantes para el análisis de muestras de DNA (ve folio: 163).

A partir de D2 se observa que no necesariamente la inclusión de otros compuestos en el proceso para obtener ADN intacto e inmovilizado, como lo son las enzimas líticas, son indispensables en el proceso.

D3 enseña un protocolo simple para el análisis de *Streptococcus pneumoniae* empleando PFGE sin el recurrente uso de enzimas líticas durante el proceso. En los resultados (folio 165 primera columna) se lee: "La eliminación serial de enzimas para lisis, incluyendo lysozima, mutanolisina, y RNasa A, no causaron cambios cualitativos ni cuantitativos en el patrón de bandas. El paso lítico fue

removido, y la digestión fue desarrollada exitosamente en ausencia de proteinasa K. La lisis y la digestión fueron completadas en un solo paso con buffer ES (0.5 M EDTA – 1% N lauroyl sarcosina)…” De esta forma en D3 el proceso de PFGE es llevado a cabo únicamente empleando reactivos químicos en los mismos pasos que se incluyen en la solicitud.

Los tres documentos presentan las características técnicas esenciales de la solicitud: un juego de reactivos, que puede ser químico únicamente, y un procedimiento que se basa en 1) lavar las células en buffer e introducirlas en moldes de agarosa para formar bloques, 2) tratar las células con EDTA, Sal y buffer, opcionalmente detergentes aniónicos, urea y/o enzimas líticas como proteinasa k, y 3) lavar los bloques en buffer TE. Por no cumplir el requisito de unidad de invención, el molde no ha sido tenido en cuenta, sin embargo, los “plugs” o bloques presuponen la utilización de un molde o un proceso de obtención de cubitos de agarosa por cualquier método posible.

Resumiendo:

| Solicitud                                                                                                                                     | D1                                                                                       | D2 (pág 8)                                            | D3                                                                     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| A. Molde                                                                                                                                      | UI                                                                                       | UI                                                    | UI                                                                     |
| B. Conjunto de disoluciones                                                                                                                   |                                                                                          |                                                       |                                                                        |
| 1. lavado                                                                                                                                     |                                                                                          | Buffer TBE                                            | Buffer                                                                 |
| Sal (NaCl 0.15 M)<br>y/o<br>Agente quelante (EDTA, 0.01 M)                                                                                    | -Sal (NaCl)<br>-EDTA<br>(pág 2977 2ª<br>col, 3er parrafo)                                | - Sal<br>- EDTA<br>-Tris<br>-acido bórico             | - Sal<br>- Tris<br>(pág 351, 2ª<br>columna 2º<br>párrafo)              |
| 2. Tratamiento                                                                                                                                |                                                                                          |                                                       |                                                                        |
| - Agente quelante (EDTA 0.1M)<br>- Dos detergentes aniónicos<br>(sarcosil 1% y Nonidet P-40 1%)<br>- Tris<br>- Urea 4M (opcional)<br>-Agarosa | -EDTA<br>-Sarcosil<br>-Tris<br>- Proteinasa k<br>-Agarosa<br>(pág, 2978,<br>1er parrafo) | -Buffer TBE<br>-Agarosa                               | -NaCl<br>- EDTA<br>- Sarcosil y<br>deoxycholate<br>- Tris<br>- Agarosa |
| 3. Lavado y conservación de<br>bloques                                                                                                        |                                                                                          |                                                       | Buffer TE                                                              |
| - Agente quelante (EDTA 0.1M)<br>- Tris base 0.1 M                                                                                            | - EDTA<br>- Tris                                                                         | - Buffer TBE<br>- Glicerol<br>- Azul de<br>bromofenol | - EDTA<br>- Tris                                                       |
|                                                                                                                                               |                                                                                          |                                                       |                                                                        |

Así las cosas, las modificaciones planteadas por la presente solicitud no confieren un efecto técnico inesperado en la medida en que con lo desarrollado por D1, D2 y D3, una persona conocedora de la materia estaría motivada a llevar a cabo los procedimientos que se reivindican en la presente solicitud. De manera que para una persona medianamente versada en la materia sería obvio, llegar a los efectos técnicos alcanzados por la presente solicitud. Por lo que NO se considera que la solicitud cumpla con el requisito de nivel inventivo.

De esta forma se establece que las reivindicaciones 1 a 14 no cumplen con el requisito de Nivel Inventivo

## 7. Respuesta a los argumentos del solicitante:

- Teniendo en cuenta el nuevo pliego reivindicatorio, se define el conjunto de disoluciones reivindicado anteriormente junto con el molde en la reivindicación 1, sin embargo, el hecho de presentar ambos objetos inventivos como fue señalado en el concepto técnico 3389, en la misma reivindicación, no necesariamente confiere a la solicitud unidad de invención. Este Despacho es de la opinión que no se ha subsanado la objeción realizada en el concepto técnico 3389 y por lo tanto los defectos analizados son nuevamente presentados en este concepto.
- El solicitante argumenta que no es posible desligar el uso del molde del proceso de preparación de las muestras de ADN. Objeta que: "La única forma para que el proceso de preparación de muestras sea exitoso y por tanto se puedan obtener resultados de calidad durante la electroforesis es preparando ADN inmovilizado en bloques de agarosa mediante un molde diseñado al efecto. De lo contrario, cuando se aísla el ADN en disolución las moléculas sufren rotura mecánica y después los resultados en PFGE no son adecuados aunque las disoluciones que se hayan utilizado durante la preparación sean las correctas".

Este Despacho considera que no necesariamente el tipo de molde es un elemento esencial en el proceso de PFGE debido a que los resultados obtenidos por otros investigadores, Ver D1, D2 o D3, indican patrones de banda confiables y definidos sin necesidad de emplear el mismo molde de la solicitud, y sin embargo las soluciones químicas empleadas son las mismas que las reivindicadas. Para determinar si el molde y la combinación de soluciones tienen un efecto sinérgico sería necesario realizar un diseño experimental que tuviera en cuenta estos dos factores de variación y demostrar estadísticamente su efecto en el modelo o la variable respuesta, ya sea patrón de bandas o definición de las mismas o tiempo, etc. Sin embargo, aunque numerosos estudios se han logrado en tipificación de microorganismos y el molde, siendo imprescindible en la consecución del método, no es el causante principal de los efectos técnicos alcanzados por el procedimiento, no se encuentra en el estado de la técnica evidencia experimental que demuestre que exista otro efecto mas que el de la practicidad por su forma y la opción de ser autoclavable.

Igualmente, los documentos encontrados demuestran la utilización de otros moldes, diferentes al reivindicado en la solicitud, para tipificación rápida de microorganismos por PFGE son validos para llevar a cabo resultados de calidad.

- El solicitante también argumenta la adición de otros compuestos como la Urea que en combinación con los reactivos y su forma de proceder permite obtener los resultados de la solicitud.

A partir de la reivindicación 1, es posible hacerse una clara idea de los compuestos que son esenciales para la técnica de tipificación de microorganismos por PFGE reivindicados. En dicha reivindicación se lee: "...disoluciones que podrían contener adicionalmente Urea 4M, disoluciones de dicho juego de reactivos mediante las cuales las células bacterianas se

tratan...” siendo un carácter opcional la adición de urea y por tanto no se tuvo en cuenta para el análisis de patentabilidad. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la urea ha sido ampliamente empleada en el estado de la técnica como desnaturalizante de la doble hebra de ADN para análisis por técnicas de electroforesis.

**8. Conclusión:**

En consecuencia y por todo lo expuesto anteriormente, se recomienda **Negar** las reivindicaciones: 1 a 14 (folios:180 - 184)

Bogotá, D.C.,

|                                    |                                                |
|------------------------------------|------------------------------------------------|
| <b>CONCEPTO TECNICO</b><br>No. 727 | <b>EXAMINADOR TECNICO</b><br>Código No. 202089 |
|------------------------------------|------------------------------------------------|

13. Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, and B. Swaminathan. 1994. Proposed criteria for interpreting pulsed-field gel electrophoresis patterns. Unpublished data.
14. Vindel, A., P. Trincado, M. M. Martin de Nicolas, E. Gomez, C. Martin Bourgon, and J. A. Saez Nieto. 1993. Hospital infections in Spain. I. *Staphylococcus aureus* (1978-91). *Epidemiol. Infect.* **110**:533-541.
15. Wei, M.-Q., and W. B. Grubb. 1992. Typing of Australian methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Med. Microbiol.* **37**:187-191.
16. Wenzel, R. P., M. D. Nettleman, R. N. Jones, and M. A. Pfaller. 1991. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: implications for the 1990s and the effective control measures. *Am. J. Med.* **91**(Suppl. 3B):221S-227S.