

P-11423

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Re: Expediente No. **16-059.568**
Solicitud de patente a nombre de **ENTOPSIS**

Yo, CAROLINA DAZA MONTALVO identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la Carrera 11 No. 86-53, obrando como apoderada de la sociedad **ENTOPSIS**, domiciliada en Coral Gables, Florida, Estados Unidos de América, solicitante de la patente de la referencia, en respuesta al Oficio No. **9511** notificado por comunicación electrónica el 3 de agosto de 2018 y relacionado con concepto técnico de fondo, me permito manifestar:

1. Título

En primer lugar, tomando en consideración lo expuesto por el examinador en el oficio arriba mencionado con relación al título de la presente solicitud, me permito manifestar que es deseo del solicitante presentar el siguiente nuevo título:

«MATRIZ DETECTABLE QUE COMPRENDE UN SUSTRATO REVESTIDO CON UN REVESTIMIENTO DE SILANO O SILOXANO PARA FIJAR MACROMOLÉCULAS, Y MÉTODOS PARA PRODUCIRLA»

De esta manera, el nuevo título es lo suficientemente claro, breve y descriptivo para referirse a la solicitud en estudio.

2. Modificaciones al capítulo reivindicatorio

Por otro lado, con fundamento en la facultad que confiere el Artículo 34 de la Decisión 486/00 al solicitante para modificar la solicitud de patente en cualquier momento del trámite, me permito presentar junto con este memorial un nuevo capítulo reivindicatorio que consta de 16 reivindicaciones y reemplaza completamente al anteriormente presentado, el cual comprende las siguientes modificaciones:

2.1. La reivindicación 8 anteriormente presentada fue establecida como la nueva reivindicación 4, especificando que el sustrato comprende de 2-864 macromoléculas químicamente distintas para eliminar el término “al menos”.

2.2. Las reivindicaciones 4 a 7 anteriormente presentadas, que corresponden a las nuevas reivindicaciones 5 a 8, fueron modificadas para eliminar el término “al menos” y para que dependan de la nueva reivindicación 4.

2.3. La redacción de la reivindicación 10 anteriormente presentada fue modificada para brindarle claridad a la misma.

En cuanto a estas modificaciones, me permito decir que las mismas no amplían de ninguna manera la materia objeto de la presente solicitud, y se realizaron con el ánimo de superar las objeciones planteadas por el examinador en su concepto técnico.

3. Pago de tasas

En relación con el número de reivindicaciones, atentamente me permito comentar que no se adjunta tasa por reivindicaciones adicionales, toda vez que el nuevo capítulo reivindicatorio cuenta con el mismo número de cláusulas del anteriormente presentado.

4. Claridad y concisión del capítulo reivindicatorio

Ahora bien, con relación a la claridad y concisión de las reivindicaciones, me permito manifestar que mediante el nuevo capítulo reivindicatorio quedan subsanadas la totalidad de las objeciones a este respecto, ya que las nuevas reivindicaciones proporcionan claridad y concisión a la invención reclamada, cuentan con pleno soporte en la descripción de la solicitud en estudio, y siguen las recomendaciones realizadas por el examinador en su concepto técnico. En particular, frente a cada objeción, me permito señalar lo siguiente:

4.1. *“Las reivindicaciones 4 a 8 no son claras, porque la expresión “al menos” se considera imprecisa, dado que no permite diferenciar la solicitud con respecto al estado de la técnica. Se sugiere mencionar específicamente la cantidad de macromoléculas que se fijan al sustrato.”*

En respuesta a lo anterior, me permito indicar que el término “al menos” ha sido eliminado de todas las nuevas reivindicaciones. De esta manera, la objeción a este respecto se ve superada.

4.2. *“La reivindicación 10 no es clara, porque caracterizan la matriz en función de los analitos que puede ligar, lo cual no se considera como una característica técnica que*

defina la matriz. Se sugiere omitir estas referencias y reemplazarlas por elementos que si sean características esenciales de la matriz reclamada."

Frente lo anterior, me permito indicar que, tal y como se expuso en el numeral 2.3 del presente memorial, la redacción de la reivindicación 10 anteriormente presentada fue modificada para brindarle claridad a la misma en respuesta a los comentarios del examinador. Por tanto, me permito solicitar a ese Despacho que la objeción a este respecto sea retirada.

En consecuencia, me permito manifestar que el nuevo capítulo reivindicatorio adjunto al presente memorial, que incluye 16 reivindicaciones, cumple a cabalidad con las disposiciones del Artículo 30 de la Decisión 486/00.

5. Descripción

Por otra parte, con relación a lo señalado por el examinador en cuanto a que: *"La descripción no divulga la invención de manera suficientemente completa para que persona normalmente versada en la materia técnica correspondiente pueda ejecutarla o reproducirla, porque no existe referencia alguna sobre el desarrollo de matrices que contengan como sustrato al menos 2, 12, 72, 96, 288 macromoléculas diferentes. El desarrollo de la solicitud se limita realizar ciertas combinaciones de mezclas de monómeros para configurar el sustrato, pero no existe el desarrollo de las macromoléculas que se refieren en la solicitud. Por tanto, se sugiere realizar las respectivas aclaraciones"*, amablemente me permito reiterar que una persona normalmente versada en la materia sí sería capaz de reproducir la invención reclamada a la luz de las enseñanzas de la descripción de la solicitud en estudio. Por ejemplo, el Ejemplo 1 de la descripción proporciona todos los pasos necesarios para producir un sustrato, por ejemplo, una platina recubierta con un revestimiento de sustrato adecuado. El experto en la materia entendería completamente que toda la platina puede estar recubierta según este Ejemplo o pueden revestirse manchas individuales, por ejemplo, usando técnicas litográficas conocidas en la técnica, una impresora de micromatrices conocida en la técnica o, por ejemplo, utilizando una platina de vidrio que comprende cavidades grabadas o que comprende cavidades creadas por enmascaramiento hidrofóbico.^{1,2}

¹ Véase, por ejemplo, el párrafo [0034]: *«Por ejemplo, se pueden usar técnicas litográficas que son bien conocidas en el arte, para crear diferentes patrones de macromoléculas en las diferentes superficies. Como otro ejemplo, cuando el sustrato es una placa, las macromoléculas fijadas a cada cavidad de la placa pueden tener diferentes entidades químicas. Como otro ejemplo, cuando el sustrato es una platina, cada macromolécula químicamente distinta puede ser fijada a una ubicación diferente en la platina; en este caso, cada una de las diferentes ubicaciones en la platina es una superficie diferente, de modo tal que la platina comprenda una pluralidad de superficies con macromoléculas químicamente distintas fijadas a ella.»*

² Véase, por ejemplo, SuperMask substrate slides
(http://www.arrayit.com/Products/Microarray_Slides/microarray_slides.html)

De forma similar, el Ejemplo 2 de la descripción proporciona todos los pasos necesarios para crear precursores de macromoléculas para depositar directamente sobre un sustrato. Por ejemplo, los nombres de los monómeros, diluciones, solventes y concentraciones se proporcionan en la Tabla 2, y los Ejemplos 3/4 describen una forma en que estos monómeros pueden mezclarse para generar tres placas diferentes, cada una con 288 combinaciones diferentes de precursores de polímeros, generando así 864 diferentes mezclas de macromoléculas. El experto en la materia apreciaría totalmente que las concentraciones de los monómeros comprendidos en una mezcla de monómeros, o el número de monómeros diferentes en cada mezcla, darían como resultado macromoléculas diferentes, y sería experimentalmente rutinario usar un sistema de pipeteado automático para aumentar la diversidad de una matriz simplemente añadiendo monómeros adicionales a cada mezcla (por ejemplo, combinaciones de tres monómeros en una macromolécula en lugar de simplemente dos).

Además, el Ejemplo 6 enseña cómo aplicar tales macromoléculas o mezclas de monómeros a un área distinta de un sustrato y cómo polimerizar éstas al revestimiento de silano o siloxano funcionalizado usando luz ultravioleta para crear de ese modo las matrices detectables reivindicadas.

A partir de lo anterior, es claro que para una persona normalmente versada en la materia sería rutinario escalar este tipo de experimentos y obtener matrices en donde el sustrato comprenda de 2 a 864 macromoléculas químicamente distintas, o específicamente 2, 12, 72 o 96 macromoléculas químicamente distintas, como se reclama en las nuevas reivindicaciones 4-8. Por tanto, me permito solicitar a ese Despacho que la objeción a este respecto sea retirada.

6. Nivel inventivo

Por otro lado, el examinador establece en su concepto técnico la falta de nivel inventivo de las reivindicaciones 1 a 10 anteriormente presentadas en vista de las enseñanzas descritas en los documentos US2003/129296 (D3) y US2003/032043 (D4).

A este respecto, me permito indicar que el Artículo 18 de la Decisión 486/00 establece que: *“Se considerará que una invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica”*.

Lo anterior significa que el análisis de nivel inventivo no es una comparación del estado del arte y la solicitud en estudio. El análisis de nivel inventivo debe demostrar la obviedad

de la invención analizada, estableciendo que para una persona normalmente versada en la materia dicha invención habría sido evidente a la luz de lo divulgado por el arte previo en el momento de su desarrollo.

Considerando esta definición, me permito exponer los siguientes argumentos técnicos que demuestran el nivel inventivo de la invención definida en las nuevas reivindicaciones 1 a 16.

6.1. El problema en el estado del arte:

El examinador afirma que el problema técnico objetivo es "cómo modificar la matriz divulgada en el documento D3 para obtener una matriz alternativa para obtención de diversos analitos posibles"; sin embargo, me permito resaltar que el problema técnico objetivo debería expresarse como "cómo capturar y detectar diversas especies de analitos (por ejemplo, para su uso en un método de diagnóstico) utilizando una reacción de pardeamiento no enzimática".

Específicamente, la presente invención busca resolver las limitaciones de las matrices de la técnica anterior (incluidas las matrices D3), a saber, su dependencia de restos de unión específicos (por ejemplo, oligonucleótidos, anticuerpos, carbohidratos) para la captura de tipos únicos de analitos, y su dependencia de anticuerpos o marcadores para la detección de analitos. Este problema se discute claramente en la presente divulgación.

Por ejemplo, la presente divulgación enseña que las matrices de la técnica anterior están limitadas porque solo pueden detectar un tipo de analito:

"Típicamente, las matrices detectables se limitan a una unión selectiva de un analito simple o un tipo de analito simple. Por ejemplo, una matriz detectable puede contener una pluralidad de sondas de secuencia de ADN para unirse con el ADN que tiene secuencias complementarias a las secuencias de las sondas. En otro ejemplo, las matrices pueden incluir una pluralidad de receptores de ligandos potenciales para la unión selectiva con un ligando de interés. [0003] La aplicación de tales matrices del arte previo está limitada. Por ejemplo, como las muestras ambientales pueden contener múltiples analitos de interés, más que una matriz se puede necesitar para ligar y detectar la presencia de analitos. Además, mientras que las matrices conocidas son específicas de un analito o un tipo de analito, los estados patológicos de los sujetos se pueden caracterizar por la presencia o la ausencia de más de un analito. **De esta manera, hay una necesidad de**

una matriz detectable que puede unir como detectar múltiples analitos,
así como métodos de diagnóstico usando tales matrices detectables.”³

La presente divulgación también enseña que los métodos de etiquetado de la técnica anterior son inferiores debido a su costo, complejidad y tendencia a llevar a resultados no reproducibles debido, por ejemplo, a un error del usuario:

“**[0044]** En particular, la reacción de Maillard y la reacción de caramelización puede tener varias ventajas respecto de otros métodos de detección. Por ejemplo, pueden ser métodos libres de rotulación en donde no se requiere rotulación (por ejemplo, por adición de tintura, tinción, ligando, etc.). De esta manera, la tinción con la reacción de Maillard o caramelización puede evitar el uso de tinturas de rotulación, tinciones costosas, y similares, reduciendo así el costo de los ensayos. Como estos enfoques requieren sólo una breve aplicación de calor más que una reacción química compleja o proceso biológico, son rápidos y fáciles de llevar a cabo y tienden menos a errores del usuario que con los métodos de detección asequibles en comercios.”

Por lo tanto, cuando se presentó la presente solicitud, había una necesidad en la técnica de matrices más versátiles y métodos de detección de analitos que pudieran usarse para muestrear una amplia gama de muestras, incluidas muestras biológicas, y detectar una amplia gama de analitos. Por ejemplo, para fines de diagnóstico.

6.2. La solución al problema:

La presente invención reivindicada se dirige a una matriz detectable que comprende sitios de unión neutros capaces de unirse a más de un analito o tipo de analitos⁴ (véase las matrices de D3, que preferiblemente utilizan moléculas de captura parciales que **"preferiblemente se unen a un ligando afín** (objetivo).”⁵ Además, de manera importante, la composición de las macromoléculas de unión a analito (polímeros sintéticos) y la forma en que se forman (síntesis on-slide a través de la polimerización de precursores de monómeros que dan como resultado una unión covalente al revestimiento de la superficie) hacen a las matrices reivindicadas adecuadas para su uso en el método de detección libre de rótulos reivindicado debido no solo a su estabilidad en condiciones de alto calor, sino también a su alta capacidad para unir analitos a través de la presencia de varios grupos funcionales, y "también en función de la forma de los polímeros y su interacción con los analitos en tres dimensiones.”⁶ Estas

³ Párrafos [0002] y [0003] de la descripción de la presente solicitud. (La negrita es nuestra)

⁴ Párrafo [0026] de la descripción de la presente solicitud.

⁵ D3, párrafo [0068] (La negrita es nuestra).

⁶ Párrafo [0031] de la descripción de la presente solicitud.

características estructurales de las matrices reivindicadas se diferencian de las matrices de la técnica anterior y proporcionan ventajas técnicas debido a la capacidad de detectar múltiples tipos de analitos sin la necesidad de reacciones de amplificación y etiquetado costosas o laboriosas. Por lo tanto, la invención reivindicada sí tiene nivel inventivo sobre la técnica citada.

6.3. Las matrices detectables de la presente invención se diferencian de las matrices de D3 y D4 al menos en composición y estructura, y estas diferencias hacen que las matrices reclamadas sean adecuadas para su uso en métodos de detección de analitos que utilizan una reacción de Maillard o de caramelización.

Como se indica en la reivindicación 1, ciertas características mencionadas de la matriz reivindicada incluyen que

- (i) la superficie del sustrato está revestida con silano o siloxano;
- (ii) las macromoléculas se fijan directamente al sustrato mediante la polimerización de un grupo funcional en el silano o siloxano en la columna vertebral de la macromolécula; y
- (iii) las macromoléculas comprenden sitios de unión neutros para unir una pluralidad de analitos.

Como asunto preliminar, me permito manifestar que D3 no enseña la característica (ii) "fijar directamente las macromoléculas a la superficie", ni mucho menos "polimerizar un grupo funcional en el silano o siloxano en la columna vertebral de la macromolécula". Más bien, D3 enseña indirectamente inmovilizar partículas de captura preformadas en un sustrato recubierto con película, película que a su vez está unida opcionalmente al sustrato a través de aminosilano:

"La presente invención proporcionó métodos y composiciones para aplicar soluciones de partículas de captura en películas de manera que las partículas de captura se inmovilizan en la película en puntos de captura discretos en la película".⁷

"Las soluciones de partículas de captura se pueden depositar en una película mediante cualquier técnica adecuada, de manera que se forme un punto de captura en la película".⁸

"Preferiblemente, las partículas de captura se forman uniendo partículas con reactivos de captura antes de ser depositadas en una película".⁹

⁷ D3, párrafo [0100].

⁸ D3, párrafo [0097].

⁹ D3, párrafo [0067].

Por lo tanto, la afirmación del examinador sobre que D3 enseña que “un revestimiento de sustrato de siloxano para fijar macromoléculas a la superficie” (el subrayado es nuestro) es inexacto. En el mejor de los casos, D3 enseña un recubrimiento tal para fijar una película a la superficie: “La superficie de un sustrato puede recubrirse con moléculas como, por ejemplo, aminosilanos para entrecruzarse con la película”.¹⁰ Sin embargo, D3 deja claro que la película en sí no es una porción de captura de analito similar a las macromoléculas actualmente reivindicadas, sino que es más bien una modalidad para inmovilizar tales porciones de captura:

“Tal como se usa en el presente documento, el término” película “se refiere a cualquier sustancia capaz de recubrir al menos una porción de la superficie de un sustrato e inmovilizar partículas de captura”.¹¹

Por consiguiente, las matrices de D3, que comprenden una estructura de tres capas, se distinguen de las matrices reivindicadas, que comprenden una estructura de dos capas:

Estructura de la matriz de D3:

[1. sustrato recubierto de aminosilano] - [2. película] - [3. partícula de captura de unión a analito]

Estructura de la matriz reclamada:

[1. sustrato recubierto de silano o siloxano] - [2. macromolécula de unión a analito].

Más bien, las matrices de D3 son análogas a las matrices presentadas en D1 y su solicitud estadounidense relacionada, D4, cada una de las cuales requiere un elemento enlazador de capa intermedia (similar a la película en D3) para unir los restos de captura a la matriz.

Estructura de la matriz de D1/D4:

[1. parte del ancla] - [2. capa intermedia (incluye brazos enlazadores) - [3. película adsorbente de unión a analito que comprende partículas adsorbentes].

Por lo tanto, toda la técnica citada se diferencia claramente de las matrices actualmente reivindicadas que utilizan polimerización on-slide para formar macromoléculas que se unen directamente al revestimiento del sustrato mediante la polimerización del revestimiento de silano o siloxano en las macromoléculas.

Una persona normalmente versada en la materia no tendría motivación alguna para modificar el enfoque de síntesis de dos pasos que se enseña en D3 (es decir, la síntesis off-slide de las partículas de captura seguidas por la inmovilización on-slide a la película)

¹⁰ D3, párrafo [0091] (El subrayado es nuestro).

¹¹ D3, párrafo [0033].

para en su lugar realizar la síntesis on-slide requerida para hacer las matrices reivindicadas porque D3 enseña los beneficios de su enfoque de síntesis de dos pasos:

“En realizaciones preferidas, los reactivos de captura se recubren sobre partículas antes de que las partículas se depositen en una película. En este sentido, la presente invención proporciona una gran flexibilidad, ya que se pueden recubrir diferentes reactivos de captura en cualquier tipo de partícula que sea mejor para ese reactivo de captura (por ejemplo, antes de tomar medidas adicionales para inmovilizar las partículas de captura en una película) ... [Este enfoque de dos pasos permite la aplicación de] varios procedimientos de fijación diferentes ... para un solo reactivo de captura para aumentar la probabilidad de que se conserven características conformacionales importantes en la partícula de fase sólida”¹²

Además, la persona experta en la técnica, consciente de D4, tampoco estaría motivada a modificar el método de síntesis de matriz de dos pasos en D3 (o D4, para el caso) para utilizar en su lugar un enfoque de síntesis on-slide para llegar en la invención reivindicada porque D4 enseña una capa intermedia en lugar de un enlace directo, afirmando:

“Los dispositivos de la presente invención funcionan como biochips adsorbentes que comprenden tres partes: un sustrato que funciona para soportar la película adsorbente adherida a su superficie; una capa intermedia que está unida a la superficie del sustrato y que comprende brazos enlazadores a través de los cuales la película adsorbente se une al sustrato; y la película adsorbente que comprende partículas adsorbentes [también se describe como que incluye “una funcionalidad de unión”] que inmovilizará los analitos en el chip”.¹³

Esta capa intermedia, y específicamente los brazos enlazadores comprendidos en ella, es crítica para la invención de D4 porque el “uso de la capa intermedia permite unir un material adsorbente pre sintetizado al sustrato, en lugar de construir el material adsorbente directamente en el sustrato”¹⁴, y esta síntesis previa es la solución que presenta D4 para superar los problemas con las técnicas de la técnica anterior:

“Ahora se ha descubierto que una solución a los inconvenientes de los chips anteriores reside en la síntesis de una película adsorbente en un proceso que está separado del proceso por el cual la película se une al sustrato del

¹² D3 en el párrafo [0070].

¹³ D4 en el párrafo [0011] (El énfasis es nuestro).

¹⁴ D4 en el párrafo [0013].

chip. Al separar la unión de la película de la síntesis de las partículas adsorbentes que forman la película, los procesos individuales se controlan más fácilmente".¹⁵

Por lo tanto, un experto en la materia entendería que los brazos enlazadores presentes en la capa intermedia descrita por D4, que son similares a la película en D3, permiten la unión de la película adsorbente (o partículas de captura, en D3) que comprende la funcionalidad de enlace y estos enlazadores son necesarios para resolver los problemas conocidos en la técnica.

Dicha persona versada en la materia no tendría ninguna motivación o expectativa razonable de éxito en la modificación de D3 o D4 mediante la eliminación de la película o estos brazos enlazadores críticos, respectivamente, para llegar a la invención reivindicada, que incluye una polimerización directa de un recubrimiento de sustrato de silano o siloxano en las macromoléculas, debido a que tal modificación combinaría así la síntesis de las partículas de captura/adsorbentes con su unión de la película, y D4 enseña que la separación de estos pasos es la clave para la invención de D4 y D3 enseña que esta separación proporciona beneficios en flexibilidad. Por lo tanto, una persona experta en la técnica esperaría que una modificación de este tipo obviara las mejoras sobre los métodos de la técnica anterior que D4 pretende resolver y que D3 enseña que son beneficiosos.

Además, de manera importante, la composición de las macromoléculas (polímeros sintéticos) y la forma en que se forman (síntesis on-slide a través de la polimerización de monómeros precursores que dan como resultado una unión covalente al recubrimiento de la superficie) hacen que las matrices reivindicadas sean adecuadas para su uso en el método de detección libre de rótulos reclamado debido a su estabilidad a altas temperaturas y debido a su alta capacidad para unir analitos no solo por la presencia de varios grupos funcionales, "sino también en base a la forma de los polímeros y su interacción con los analitos en tres dimensiones".¹⁶ Por ejemplo, como se muestra en los Ejemplos 8-10 y las Figs. 2-4, las matrices reivindicadas son adecuadas para calentar a 300°C durante 5 minutos para inducir una reacción de Maillard.

En contraste, muchas de las funciones percibidas de D3 y D4 son negadas por calentamiento a temperaturas tan altas. Por ejemplo, es bien sabido que las proteínas y los anticuerpos se desnaturalizan muy por debajo de 200°C, lo que se describe en la

¹⁵ D4 en el párrafo [0010].

¹⁶ Párrafo [0031] de la descripción de la presente solicitud.

solicitud como el extremo inferior de las temperaturas adecuadas para inducir una reacción de Maillard.¹⁷ Véase, por ejemplo,

- La Figura 1 en Shimizu et al¹⁸ (los anticuerpos IgG pierden prácticamente toda su capacidad de unión entre 80-90°C);

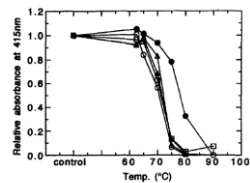


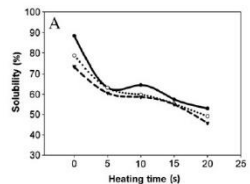
Fig. 1. Heat-stability of IgG antibodies in terms of the antigen binding activity measured by ELISA. Chicken (○), cow (□), goat (△), pig (▲) and rabbit (●) IgG antibodies were heated at respective temperatures for 30 min (at 62.5°C) or 15 min (at 65°C or higher). Antibody activity was expressed as a relative absorbance at ELISA.

- Tabla 3 en Johnstone et al¹⁹ (Incluso para un anticuerpo nativo, la constante de equilibrio de la unión de un anticuerpo disminuye hasta 2 magnitudes cuando la temperatura se eleva de 1°C a 37°C).

Monoclonal antibody (subclass)	Values for K_{eq} l/mol				
	1°C	10°C	17°C	25°C	37°C
11.1 (IgG2a)	1.37×10^8	4.90×10^7	2.25×10^7	1.77×10^7	5.96×10^6
14.2 (IgG1)	5.49×10^7	3.97×10^7	2.49×10^7	1.83×10^7	4.73×10^6
31.1 (IgG3)	3.62×10^8	3.11×10^8	3.85×10^8	2.60×10^8	3.24×10^8
29.5 (IgG1)	<i>a</i>	5.54×10^8	2.22×10^8	2.55×10^8	4.25×10^8

^aNot calculated.

- Dissanayake et al²⁰ (las dispersiones de proteína de suero de leche pierden una solubilidad del 50% cuando se calientan a 140°C durante solo 20s a pH 4 (línea continua), pH 5 (línea de puntos) o pH 6 (línea discontinua))



- Wolz et al²¹ (solución de suero de leche al 30% se despliega al 100% a 80°C).

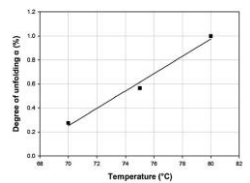


Fig. 6. Degree of unfolding as a function of temperature at a protein concentration of 30%.

¹⁷ Párrafo [0037] de la descripción de la presente solicitud.

¹⁸ Comp Biochem Physiol, 1993, 106B(2):255-261.

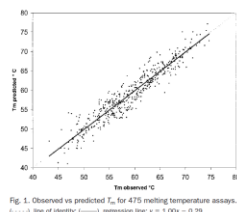
¹⁹ Molecular Immunology, 1990, 27(4):327-333.

²⁰ International Dairy Journal, 2013, 31:93-99.

²¹ International Dairy Journal, 2015, 49:95-101.

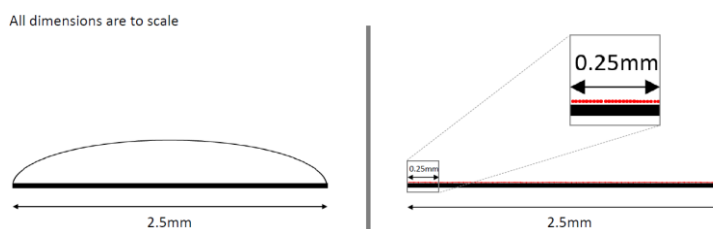
De manera similar, la captura basada en oligonucleótidos no puede mantener estas temperaturas, ya que prácticamente todos los oligos se fundirán a temperaturas de menos de 90°C.

- Véase, por ejemplo, Ahsen et al²²:



Por consiguiente, un efecto técnico asociado con las especies de captura de macromoléculas de polímeros sintéticos utilizadas en la presente solicitud, en comparación con los anticuerpos, haptenos, oligonucleótidos, carbohidratos, proteínas, con varios grupos funcionales descritos en D3, es que los primeros pueden soportar altas temperaturas y son adecuados para su uso en un método de detección de analitos que utiliza una reacción de Maillard o de caramelización, mientras que los últimos (matrices de D3) no lo son.

Además, el solicitante sostiene que las matrices reivindicadas tienen una capacidad de unión significativamente mayor que las matrices de la técnica anterior citada. Esto se debe a que la polimerización on-slide de monómeros que se aplican en forma líquida da como resultado macromoléculas que tienen una estructura tridimensional similar a un domo (lado izquierdo de la imagen de abajo); mientras que, en contraste, las partículas de captura descritas en D3 y D4 forman una monocapa en la superficie de la matriz debido a que son aplicadas sobre y capturadas por una película o capa intermedia, respectivamente (lado derecho de la imagen de abajo).



Esta diferencia en el área superficial es significativa. Por ejemplo, un punto típico en las matrices mostradas en las Figuras 2-4 de la presente solicitud tiene una capacidad de carga de al menos 1.3 uL de volumen de polímero. Por el contrario, incluso si se asume una eficiencia de empaquetamiento esférica perfecta, se espera que los puntos de D3 de tamaño similar (2,5 mm) tengan capacidades de carga que oscilen entre 0,0000018

²² Clin Chem. 2001 Nov;47(11):1956-61.

uL y 0,0018 uL (según los intervalos de tamaño de partícula preferidos descritos de 1 nm a 1.0 μm^{23} (o radios de 0.5 nm a 0.5 μm)), y se espera que los puntos de D4 tengan capacidades de carga máximas que van desde simplemente 0.005uL a 0.88uL (asumiendo una perfecta eficiencia de empaquetado de partículas esféricas). Esto se ilustra en la siguiente tabla con respecto a las partículas de D4, que varían de 3 μm a 500 μm de diámetro (o 1.5 μm a 250 μm de radio).²⁴ En el cuadro a continuación, se muestra un cálculo en el que se ha asumido una eficiencia de empaquetamiento perfecta de partículas esféricas en una superficie de punto de 2,5 mm de diámetro, y se ha calculado y combinado el número de partículas para determinar el volumen total de todas las esferas dentro de este punto.

radio de partícula (μm)	# de partículas	Vol de partículas (uL)
1.5	374127.7	0.005289
5	33671.49	0.01763
10	8417.872	0.035261
20	2104.468	0.070521
30	935.3191	0.105782
40	526.117	0.141043
50	336.7149	0.176304
60	233.8298	0.211564
70	171.7933	0.246825
80	131.5293	0.282086
90	103.9243	0.317346
100	84.17872	0.352607
110	69.56919	0.387868
120	58.45745	0.423128
130	49.80989	0.458389
140	42.94833	0.49365
150	37.41277	0.528911
160	32.88231	0.564171
170	29.12759	0.599432
180	25.98109	0.634693
190	23.31821	0.669953
200	21.04468	0.705214
210	19.08815	0.740475
220	17.3923	0.775735
230	15.9128	0.810996
240	14.61436	0.846257
250	13.4686	0.881518

Este volumen varía linealmente con el radio de la partícula y varía de 0.005uL a 0.88uL para el rango de diámetro máximo de esfera descrito en D4. Por lo tanto, los puntos en la matriz reivindicada pueden acomodar más volumen de polímero a través de un aumento en la altura causado por la polimerización on-slide del precursor líquido y, como

²³ Véase, por ejemplo, el párrafo [0030] de D3 “el tamaño de [partícula] preferido es de 0,001-500 μm , más preferiblemente de 0,01-10 μm , aún más preferiblemente de 0,5-5,0 μm , y lo más preferiblemente de aproximadamente 1,0 μm de diámetro (o aproximadamente 1 μm en el área total).”

²⁴ D4, párrafo [0020].

se señaló en la solicitud, los analitos interactúan con las macromoléculas reivindicadas en tres dimensiones:

“[0031] Las una o varias macromoléculas pueden incluir cualquier macromolécula y en particular macromoléculas que pueden proporcionar uno o varios sitios de unión neutros ... los polímeros con o sin grupos funcionales libres se pueden unir con uno o varios analitos en base no sólo a la naturaleza de los grupos funcionales (de estar presentes), sino también en base a la forma de los polímeros y su interacción con los analitos en tres dimensiones.”

Es importante destacar que este aumento de la capacidad de enlace permite la detección de una señal visual *in situ* en la matriz a través del pardeamiento desarrollado por calor, mientras que los métodos descritos en D3 y D4 se basan en el uso de otras plataformas de detección y/o pasos de amplificación para permitir la detección, por ejemplo, inmunoensayos²⁵, ensayos basados en PCR²⁶ MALDI-TOF o imágenes de fluorescencia²⁷, etc.

Además, a diferencia de los métodos de unión a base de anticuerpos e hibridación utilizados en D3, que se espera que se disocien a altas temperaturas, se espera que la unión del analito a las matrices reivindicadas sea estable a altas temperaturas (y es, como se muestra en las Figuras 2-4, de hecho, estable) debido en parte a las macromoléculas que se unen a los analitos en función de la forma de los polímeros reivindicados y su interacción con los analitos en tres dimensiones.²⁸

Por lo tanto, una persona normalmente versada en la materia entendería por al menos las razones anteriores, que la presente invención supera las limitaciones de parcialidad de analito de las matrices de la técnica anterior y su dependencia de los agentes de detección posteriores a la captura, tales como anticuerpos, sondas de nucleótidos, etc., debido a la idoneidad de la matriz reivindicada para su uso en una reacción de Maillard o de caramelización para inducir el pardeamiento detectable de cualquier analito unido a los sitios de unión neutros comprendidos en las macromoléculas.

En consecuencia, me permito señalar que los documentos D3 y D4 no afectan el nivel inventivo de la presente solicitud y la objeción a este respecto se ve superada, toda vez que no existe motivación alguna para que una persona del oficio normalmente versada en la materia derive de manera obvia la presente invención a partir de dichas anterioridades, demostrándose así que las reivindicaciones 1 a 16 del nuevo capítulo

²⁵ D3, párrafo [0109]

²⁶ D3, párrafo [0115]

²⁷ D3, párrafos [0112], [0115]

²⁸ Párrafo [0031] de la descripción de la presente solicitud.

reivindicatorio cumplen con el requisito de nivel inventivo según los lineamientos del Artículo 18 de la Decisión 486/00.

7. Conclusiones

Finalmente, a la luz de las modificaciones al capítulo reivindicatorio y los argumentos presentados, es posible concluir lo siguiente:

7.1. La presente solicitud es clara, concisa y está debidamente soportada por la descripción, cumpliendo así con los requerimientos del Artículo 30 de la Decisión 486/00.

7.2. La presente solicitud es patentable sobre los documentos D3 y D4, de acuerdo con los requerimientos del Artículo 18 de la Decisión 486/00.

Por tanto, atentamente me permito solicitar a ese Despacho otorgar el privilegio de patente solicitado a la solicitud en estudio, toda vez que cumple a cabalidad con los requerimientos de la Decisión 486/00.

8. Anexos

8.1. Nuevo capítulo reivindicatorio que comprende 16 reivindicaciones.

Señor Director,


CAROLINA DAZA MONTALVO
C.C. 66.783.790 de Palmira Valle
TP-141563 CSJ
notificaciones@clarkemodet.com.co

P-11423

Nuevo capítulo reivindicatorio

Diciembre 14, 2018

REIVINDICACIONES

1. Una matriz detectable, que comprende

un sustrato seleccionado del grupo que consiste en vidrio, plástico, metal, materiales compuestos, acrílicos o sustratos biológicamente activos, que comprende una pluralidad de superficies de unión neutras, cada superficie comprende:

un revestimiento de sustrato de silano o siloxano para fijar directamente macromoléculas a la superficie del sustrato; y una macromolécula fijada al revestimiento del sustrato;

en donde cada macromolécula ha sido fijada al revestimiento del sustrato mediante la polimerización de un grupo funcional en el silano o siloxano en la columna vertebral de la macromolécula; y

en donde cada macromolécula comprende un polímero de monómeros seleccionados del grupo que consiste en acrilamida; acrilato de 2-carboxietilo; ácido acrílico; N-[tris(hidroximetil)metil]acrilamida; acrilatos de hidroxipropilo, isómeros; acrilato de 4-hidroxibutilo; N-hidroxietilacrilamida; N,N-dimetilacrilamida; N-(1,1-dimetil-3-oxobutil)acrilamida; N-isopropilacrilamida; 2-metacriloxietil fenil uretano; acrilato de 2-cianoetil; etilenglicol fenil éter acrilato; N-ter-octilacrilamida; 1-(acriloiloxi)-3-(metacriloiloxi)-2-propanol; bis-acrilamida; triacrilato de trimetilolpropano, y combinaciones de los mismos; y en donde las macromoléculas comprenden una pluralidad de superficies de unión neutras para unir una pluralidad de analitos.

2. La matriz detectable de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el revestimiento comprende un acrilosiloxano.

3. La matriz detectable de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el revestimiento del sustrato comprende 3-metacriloxipropiltrimetoxisilano, 3-acriloxipropiltrimetoxisilano, N-(3-acriloxi-2-hidroxipropil-3-aminopropiltriethoxisilano, o 3-metacriloxipropildimetilclorosilano.

4. La matriz detectable de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 3, en donde el sustrato comprende de 2-864 macromoléculas químicamente distintas, y en donde cada macromolécula químicamente distinta se fija a una superficie diferente de la pluralidad de superficies del sustrato.

5. La matriz detectable de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el sustrato comprende 2 macromoléculas químicamente distintas, y en donde cada macromolécula

químicamente distinta se fija a una superficie diferente de la pluralidad de superficies del sustrato.

6. La matriz detectable de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el sustrato comprende 12 macromoléculas químicamente distintas, y en donde cada macromolécula químicamente distinta se fija a una superficie diferente de la pluralidad de superficies del sustrato.

7. La matriz detectable de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el sustrato comprende 72 macromoléculas químicamente distintas, y en donde cada macromolécula químicamente distinta se fija a una superficie diferente de la pluralidad de superficies del sustrato.

8. La matriz detectable de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el sustrato comprende 96 macromoléculas químicamente distintas, y en donde cada macromolécula químicamente distinta se fija a una superficie diferente de la pluralidad de superficies del sustrato.

9. La matriz detectable de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que también comprende un analito ligado a una macromolécula fijada al revestimiento del sustrato.

10. La matriz detectable de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende además un analito seleccionado del grupo que consiste en moléculas pequeñas, proteínas, péptidos, nucleótidos, nucleósidos, bacterias, virus, células fúngicas, células animales o células de levadura ligadas a una macromolécula fijada al revestimiento del sustrato.

11. Un método de producción de una matriz detectable, que comprende

- recubrir un sustrato con un silano o un siloxano, y
- de modo independiente, fijar una macromolécula o una mezcla de precursores de macromoléculas a cada una de una pluralidad de superficies en ubicaciones diferentes en el sustrato mediante la polimerización de un grupo funcional en el sustrato de silano o siloxano en la columna vertebral de la macromolécula; en donde cada macromolécula o precursor de macromolécula comprende un monómero o una combinación de monómeros, seleccionados del grupo que consiste en acrilamida; acrilato de 2-carboxietilo; ácido acrílico; N-[tris(hidroximetil)metil]acrilamida; acrilatos de hidroxipropilo, isómeros; acrilato de 4-hidroxibutilo; N-hidroxietilacrilamida; N,N,-dimetilacrilamida; N-(1,1-dimetil-3-oxobutil)acrilamida; N-isopropilacrilamida; 2-metacriloxietilfenil uretano; acrilato de 2-cianoetil; etilenglicol fenil éter acrilato; N-ter-

octilacrilamida; 1-(acrililoiloxi)-3-(metacrililoiloxi)-2-propanol; bis-acrilamida; triacrilato de trimetilolpropano.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, que también comprende la polimerización de un precursor en la superficie del sustrato.

13. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-12, que también comprende iniciar la polimerización del precursor por aplicación al precursor de: (i) radiación electromagnética seleccionada del grupo que consiste en microondas, luz ultravioleta, luz visible y calor; (ii) sonido; o (iii) un iniciador químico.

14. Un método de detección libre de rótulos de un analito no rotulado en la matriz detectable de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende:

- poner en contacto el analito no rotulado con la matriz detectable para fijar el analito a una superficie de unión neutra en la matriz detectable;
- calentar la matriz detectable con un analito no rotulado fijado a una temperatura de 120 °C a 300 °C durante 1 a 5 minutos;
- determinar mediante una técnica analítica colorimétrica el color de cada una de la pluralidad de superficies de unión neutras.

15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el analito no rotulado es seleccionado de (i) una muestra corporal de un sujeto, (ii) una muestra *in vitro*, (iii) una muestra ambiental, (iv) un componente de uno de los anteriores, o una combinación de (i) a (iv).

16. El método de acuerdo con la reivindicación 14 o 15, en donde el analito no rotulado comprende un componente de sangre, suero, plasma, orina, heces, saliva, bilis, fluido espinal, fluido intersticial, jugo gástrico, lágrimas, o leche.

P-11423

Nuevo capítulo reivindicatorio

Diciembre 14, 2018

REIVINDICACIONES

1. Una matriz detectable, que comprende
un sustrato seleccionado del grupo que consiste en vidrio, plástico, metal, materiales compuestos, acrílicos o sustratos biológicamente activos, que comprende una pluralidad de superficies de unión neutras, cada superficie comprende:
un revestimiento de sustrato de silano o siloxano para fijar directamente macromoléculas a la superficie del sustrato; y una macromolécula fijada al revestimiento del sustrato;
en donde cada macromolécula ha sido fijada al revestimiento del sustrato mediante la polimerización de un grupo funcional en el silano o siloxano en la columna vertebral de la macromolécula; y
en donde cada macromolécula comprende un polímero de monómeros seleccionados del grupo que consiste en acrilamida; acrilato de 2-carboxietilo; ácido acrílico; N-[tris(hidroximetil)metil]acrilamida; acrilatos de hidroxipropilo, isómeros; acrilato de 4-hidroxibutilo; N-hidroxietilacrilamida; N,N-dimetilacrilamida; N-(1,1-dimetil-3-oxobutil)acrilamida; N-isopropilacrilamida; 2-metacriloxietil fenil uretano; acrilato de 2-cianoetil; etilenglicol fenil éter acrilato; N-ter-octilacrilamida; 1-(acriloiloxi)-3-(metacriloiloxi)-2-propanol; bis-acrilamida; triacrilato de trimetilolpropano, y combinaciones de los mismos; y en donde las macromoléculas comprenden una pluralidad de superficies de unión neutras para unir una pluralidad de analitos.
2. La matriz detectable de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el revestimiento comprende un acrilosiloxano.
3. La matriz detectable de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el revestimiento del sustrato comprende 3-metacriloxipropiltrimetoxisilano, 3-acriloxipropiltrimetoxisilano, N-(3-acriloxi-2-hidroxipropil-3-aminopropiltriethoxisilano, o 3-metacriloxipropildimetilclorosilano.
4. La matriz detectable de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 3, en donde el sustrato comprende de 2-864 macromoléculas químicamente distintas, y en donde cada macromolécula químicamente distinta se fija a una superficie diferente de la pluralidad de superficies del sustrato.

5. La matriz detectable de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el sustrato comprende 2 macromoléculas químicamente distintas, y en donde cada macromolécula químicamente distinta se fija a una superficie diferente de la pluralidad de superficies del sustrato.

6. La matriz detectable de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el sustrato comprende 12 macromoléculas químicamente distintas, y en donde cada macromolécula químicamente distinta se fija a una superficie diferente de la pluralidad de superficies del sustrato.

7. La matriz detectable de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el sustrato comprende 72 macromoléculas químicamente distintas, y en donde cada macromolécula químicamente distinta se fija a una superficie diferente de la pluralidad de superficies del sustrato.

8. La matriz detectable de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el sustrato comprende 96 macromoléculas químicamente distintas, y en donde cada macromolécula químicamente distinta se fija a una superficie diferente de la pluralidad de superficies del sustrato.

9. La matriz detectable de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que también comprende un analito ligado a una macromolécula fijada al revestimiento del sustrato.

10. La matriz detectable de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende además un analito seleccionado del grupo que consiste en moléculas pequeñas, proteínas, péptidos, nucleótidos, nucleósidos, bacterias, virus, células fúngicas, células animales o células de levadura ligadas a una macromolécula fijada al revestimiento del sustrato.

11. Un método de producción de una matriz detectable, que comprende

- recubrir un sustrato con un silano o un siloxano, y
- de modo independiente, fijar una macromolécula o una mezcla de precursores de macromoléculas a cada una de una pluralidad de superficies en ubicaciones diferentes en el sustrato mediante la polimerización de un grupo funcional en el sustrato de silano o siloxano en la columna vertebral de la macromolécula; en donde cada macromolécula o precursor de macromolécula comprende un monómero o una combinación de monómeros, seleccionados del grupo que consiste en acrilamida; acrilato de 2-carboxietilo; ácido acrílico; N-[tris(hidroximetil)metil]acrilamida; acrilatos de hidroxipropilo, isómeros; acrilato

de 4-hidroxibutilo; N-hidroxietilacrilamida; N,N-dimetilacrilamida; N-(1,1-dimetil-3-oxobutil)acrilamida; N-isopropilacrilamida; 2-metacriloxietilfenil uretano; acrilato de 2-cianoetil; etilenglicol fenil éter acrilato; N-ter-octilacrilamida; 1-(acrilóiloxi)-3-(metacrilóiloxi)-2-propanol; bis-acrilamida; triacrilato de trimetilolpropano.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, que también comprende la polimerización de un precursor en la superficie del sustrato.

13. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-12, que también comprende iniciar la polimerización del precursor por aplicación al precursor de: (i) radiación electromagnética seleccionada del grupo que consiste en microondas, luz ultravioleta, luz visible y calor; (ii) sonido; o (iii) un iniciador químico.

14. Un método de detección libre de rótulos de un analito no rotulado en la matriz detectable de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende:

- poner en contacto el analito no rotulado con la matriz detectable para fijar el analito a una superficie de unión neutra en la matriz detectable;
- calentar la matriz detectable con un analito no rotulado fijado a una temperatura de 120 °C a 300 °C durante 1 a 5 minutos;
- determinar mediante una técnica analítica colorimétrica el color de cada una de la pluralidad de superficies de unión neutras.

15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el analito no rotulado es seleccionado de (i) una muestra corporal de un sujeto, (ii) una muestra *in vitro*, (iii) una muestra ambiental, (iv) un componente de uno de los anteriores, o una combinación de (i) a (iv).

16. El método de acuerdo con la reivindicación 14 o 15, en donde el analito no rotulado comprende un componente de sangre, suero, plasma, orina, heces, saliva, bilis, fluido espinal, fluido intersticial, jugo gástrico, lágrimas, o leche.