

XX大学复审分析报告

案件编号：202511998XXXX

一、一通审查意见不合理处审视

(一) 事实错误

审查员将权利要求1中的将供体细胞用膜性结构荧光染料进行标记，将受体细胞用细胞质荧光染料进行标记，并将二者共培养；在活细胞成像条件下，观察荧光信号在上述鉴定的隧道纳米管结构内的动态运输过程这一特征，与对比文件1中的使用DiD标记的供体细胞与EGFP转染的受体细胞共培养进行了错误等同。

对比文件1中，受体细胞是通过EGFP转染来标记细胞质的。EGFP是一种在细胞质中持续稳定表达的荧光蛋白，它的作用是标记整个细胞，以便在活细胞成像中识别哪些是受体细胞。而本专利权利要求限定的是用细胞质荧光染料（如CMTPX）来标记受体细胞。更重要的是，本专利的创新点在于同步进行TNTs的鉴定和物质运输观察。本专利方法是先基于DIC和双焦平面法明确鉴定出TNTs结构，然后在同一视野下观察荧光信号在这个已鉴定的TNTs内运输。对比文件1的方法是先在普通共聚焦下做Z-stack（对固定细胞）或使用DIC（对活细胞）看到TNTs，然后换用另一个共培养实验或在同一个DIC视野下看到荧光信号。其并未将荧光信号在已通过不附着基底标准精准鉴定的TNTs内的运输作为一个整体、同步的操作流程。审查员混淆了在一大群细胞中观察到TNTs和荧光与精准锁定一个TNTs，并同步观察其特定位点上的运输这两个不同的技术操作和意图。

反驳要点：

- 指出对比文件1的受体细胞标记方式（EGFP转染）与本专利（细胞质荧光染料）在技术上不同，但更核心的是目的与用途不同。
- 强调本专利的同步性和精准性审查员未予考量。本专利方法的核心逻辑是：先用DIC加双焦平面法鉴定出某个TNTs，然后立即在同一显微镜视野下观察荧光信号在这个身份明确的TNTs内部动态运输。这是一个先鉴定，后观察或边鉴定边观察的一体化流程。而对比文件1的描述（为了进一

步明确MLO-Y4细胞间通过TNTs的物质运输，我们使用DIC进行了活细胞成像...我们发现DiD标记的供体细胞与EGFP标记的受体细胞之间存在TNTs...)表明其逻辑是我们使用DIC看到了可能是TNTs的结构，同时看到了荧光信号在移动，推测它们是TNTs。这是一种关联性观察，而非精准鉴定下的直接证据。审查员未区分观察结果关联和基于鉴定标准的精准定位观察。

(二) 窄化技术问题

审查员将本专利权利要求1相对于对比文件1的区别技术特征错误地定义为如何对隧道纳米管进行观察分析。

本发明的核心技术问题远不止于观察分析。本专利要解决的技术背景中明确提出：如何高效准确地在复杂的细胞网络中鉴别TNTs是一项重要挑战，总之需要标准化的方案对TNTs与树突进行快速区分。这个技术问题包含两个关键要素：第一，针对性：针对复杂形态细胞（如骨细胞）的TNTs鉴别（解决与树突混淆的特定难点）；第二，系统性及高效性：提供标准化的、快速的、可在固定和活细胞状态通用的方案。审查员将区别特征武断地窄化为观察分析，完全忽略了标准化、高效率 and 克服特定混淆难点这些核心特征，从而为后续用公知常识轻易否定创造性铺平了道路。这违反了《专利审查指南》第二部分第四章3.2.1.1中关于确定区别特征和发明实际解决的技术问题的规定，即应当根据区别特征所能达到的技术效果来确定。

反驳要点：

1. 重新定义本发明实际解决的技术问题：针对复杂形态细胞（如骨细胞），提供一套在固定与活细胞状态下均能高效、标准化地鉴定TNTs，并将其与形态相似的细胞树突进行精准区分的系统化方法与操作规程。
2. 基于这个重新定义的技术问题，阐述本发明的技术方案（Z轴滑动法、正交视图法、双焦平面法）是如何通过标准化操作来解决树突与悬浮TNTs混淆这一本领域公认的技术难题的。
3. 指出一个方法观察分析和提供一套标准化操作规程来解决一个特定技术难题，在技术贡献上是根本不同的。

(三) 事后诸葛亮

审查员认为采用正交视图法对细胞进行三维分析，是本领域的常用技术手段，从而否定权利要求1的创造性。

正交视图法是激光共聚焦显微镜自带的、非常普遍的图像分析功能，用于观察XZ和YZ切面。这是公知常识没错，但问题在于将该技术手段与本发明的特定目的（快速鉴定TNTs与树突）相结合，并形成一套标准化操作流程（正交视图法），这并非容易想到。对比文件1的作者是骨生物学领域的专家，他在论文的讨论部分明确承认了活细胞状态下无法严格鉴定TNTs，以及需要一套有效的鉴定方法来区分树突和TNTs。他既看到了这个难题，也使用了共聚焦显微镜，但却没有提出正交视图法作为标准鉴定流程。这恰恰说明，在看到本发明的具体方案后，反过来认为正交视图法是容易想到的，是典型的事后诸葛亮。审查员忽略了从知道一个工具（正交视图）到创造性地将这个工具与特定标准（不与基底接触）结合，并优化成一个可复现的操作方法（标记、分析、排除）之间存在巨大的认知和实践鸿沟。《审查指南》第二部分第七章第6.3节明确指出，在评价创造性时，不能将发明作为整体，而应该考虑发明所属技术领域的技术人员，在发明作为整体所要解决的技术问题的启示下，将现有技术进行组合的动机。本案中，最接近的现有技术（对比文件1）明确给出了无法严格鉴定的技术偏见了，没有动机去将公知常识中的正交视图作为克服该偏见的手段。

反驳要点：

1. 引用对比文件1原文因此，在对细胞间TNTs进行活细胞成像时，对TNTs进行严格的鉴定非常困难。证明对比文件1本身已经承认了本领域的一个技术难题，并且其作者没有解决。

2. 指出正交视图作为一个分析工具是公知的，但在面对区分树突与TNTs这个特定问题时，本领域技术人员普遍且合理地认为在固定态下通过人工观察Z-stack或三维重建即可，在活细胞态下则无法严格鉴定，这是对对比文件1给出的技术偏见。

3. 本发明的贡献在于正视并解决了这个偏见，通过系统性地规定在固定态下，必须用Z轴滑动或正交视图对每个候选结构进行双重核查（排除基底接触）和在活细胞态下，用双焦平面逻辑进行实时判别，提供了一套可操作、可复现的标准化解决方案。将公知工具与特定难题相结合的创造性思维，正是本发明的核心价值。

（四）论证不充分

1. 对权利要求5（双焦平面法）的评述

审查意见认为：双焦平面判定，是本领域常用的判定方法。因此为了判定隧道纳米管是否附着于培养面底部，使用双焦平面对照判定逻辑，是本领域技术人员容易想到并获得的。

双焦平面判定这个说法非常笼统。它指的是什么？是显微镜对焦时的自然现象（对焦清晰，离焦模糊）？本专利的双焦平面对照判定逻辑是一个具体的、具有操作指导意义的发明点。它不是简单的判断，而是建立了一个逻辑框架：焦平面在底部，则A清晰、B模糊；焦平面在TNTs层，则A模糊、B清晰。这种基于成像特性的逻辑推理替代Z轴扫描是解决活细胞鉴定难题的关键。审查员用一个笼统的术语双焦平面判定一笔带过，完全忽视了其技术内涵和创造性。这属于典型的无理由、无证据的容易想到论证。

反驳要点：

1. 明确指出审查员对双焦平面对照判定逻辑的理解过于肤浅。深入解释该逻辑是如何利用DIC的景深特性，弥补了传统共聚焦Z轴扫描在活细胞成像中的不足（光毒性、耗时、会破坏TNTs），从而出人意料地实现了实时、无损的活细胞TNTs鉴定。这是一种基于现有工具（DIC）的创造性应用，而非简单的判定。

2. 对权利要求8（溶酶体共享型跨细胞自噬的表征）的评述

审查意见认为：对隧道纳米管介导的溶酶体共享从而实行跨细胞自噬进行表征，也是本领域技术人员容易想到的。

溶酶体共享型跨细胞自噬是一个全新的、由本发明首次提出并验证的生物学机制，它不仅仅是一套表征方法。将该机制本身（即共享溶酶体以恢复自噬流）及其对应的整套研究方法（流式分选、Western Blot、透射电镜）评价为本领域技术人员容易想到的，是极其武断的。对比文件1根本没有涉及溶酶体、自噬、跨细胞自噬等任何概念。审查员没有提供任何证据（比如另一篇现有技术）来证明这个复杂的、系统的生物学发现和验证方法是公知常识。这种因为别人有一，所以你想到的二三都是容易的论证逻辑是完全站不住脚的。

反驳要点：

1. 强调溶酶体共享型跨细胞自噬是一个由本申请首次完整揭示和验证的全新生物学通路和机制。这不只是一个表征方法，而是一个基于大量实验数据（图7至图11）的重大科学发现。其创造性不仅在于验证方法本身，

更在于发现了这个需要被验证的对象。因此，认为描述这个新机制的表征方法是容易想到的是荒谬的。需要审查员提供具体证据，证明在对比文件1或其他现有技术中，已经有任何关于跨细胞自噬或溶酶体共享拯救应激细胞自噬流的教导或启示。

一通中审查员的审查意见存在多个严重的不合理之处，核心在于未能正确理解本发明的创新本质和技术贡献。本发明的贡献不在于使用了共聚焦、DIC或正交视图这些公知工具，而在于创造性地将这些工具与TNTs鉴定的特定技术难点相结合，形成了一套系统、高效、跨状态（固定与活细胞）的标准操作规程，并基于此首次揭示了一个全新的生物学机制。审查员的论证充满了事实错误、窄化技术问题、事后诸葛亮和论证不充分的陷阱，为本专利的复审提供了极为有力的反击点。

二、第一次答复审视

（一）修改和陈述做得好的地方

1. 策略性缩小保护范围

将原权利要求1、2、4合并，形成新的独立权利要求1。这使得技术方案更加具体，聚焦于正交视图法、活细胞双焦平面对照判定、溶酶体共享型跨细胞自噬表征等与对比文件1产生区别的技术特征，有利于争辩创造性。

2. 澄清技术问题

在创造性陈述中，明确指出本发明要解决的技术问题是建立一种标准化、高成功率且能精准区分复杂形态细胞中悬浮的TNTs与贴壁细胞树突的鉴定方法，而非简单地如何观察。这精准地框定了本发明的改进点。

3. 初步对比分析

对正交视图法和Z轴滑动法进行了表格化对比，论证了正交视图法提供三维空间直接证据的优势，试图反驳审查员提出的常用技术手段的观点。

（二）忽略或薄弱的地方

以下列出影响专利授权前景的关键缺陷，按严重程度评级。

1. 创造性论证逻辑链断裂，核心区别技术特征未被挑战

审查员认为正交视图法对细胞进行三维分析，是本领域的常用技术手段，并认定该区别特征（正交视图法）所要解决的技术问题是如何对隧道纳米管进行观察分析。申请人虽然试图重新定义技术问题（解决树突混淆），但未能有效反驳或挑战审查员关于正交视图法是常用技术手段这一核心论证。

审查员的逻辑是D1已公开了三维成像采用正交视图法是常规选择由此获得的技术方案是显而易见的。申请人的答复仅证明正交视图法能解决混淆问题，但未提供任何证据或理由证明本领域技术人员在面对D1（已公开三维成像并关注不接触底部）时，不会毫无疑问地、常规地、自然地想到使用正交视图（一种标准的共聚焦图像分析工具）来进一步确认距离关系。答复中所谓的主动选择和强化的分析手段缺乏说服力，因为在D1的教导下，使用正交视图是自然而然的分析步骤，而非需要克服技术偏见。

后果是审查员极大概率不会接受该论点，并会坚持认为正交视图法是本领域公知常识，从而否定独立权利要求1的创造性。

2. 双焦平面对照判定逻辑的创造性陈述苍白无力

审查员认为这是本领域常用的判定方法。申请人仅在解释该逻辑是什么，而没有论证其相对于D1的非显而易见性。

对比文件1公开了使用DIC活细胞成像和三维成像显示不与培养皿底部接触。在活细胞成像时，通过调整焦平面观察物体是否在底面上，这是DIC显微镜最基本的操作原理，是任何一个实验人员看到虚焦实焦都能立刻理解的。申请人未能证明该方法克服了任何技术偏见或取得了预料不到的技术效果。

后果导致该特征极大概率同样被判为常用技术手段。

3. 应对审查员两步法逻辑的漏洞

审查员在评述从属权利要求2、3、5、6、7、8时，均采用了对比文件1还公开了...是本领域常用技术手段的套路，并将其其他技术特征纳入对比文件1。申请人答复中将所有特征合并到独立权利要求，但并未系统性地、逐一地、有证据地反驳审查员关于D1已公开或公知常识的认定。

虽然申请人声称参数组合是协同作用的整体，但未提供任何对比实验数据（如不同固定液浓度对TNTs保存率的影响、不同层距对检测灵敏度的影响）来证明本申请所选范围构成了非显而易见的技术方案，并产生了预料不到的技术

效果。审查员会反驳称：双固定液方案是本领域保护脆弱结构的常规做法（如电镜制样），层距0.2至0.4微米是共聚焦成像的常规设置，优化这些参数是常规实验。

DiD替代LysoTracker方面，审查员指出DiD是常用膜染料。申请人仅承认该特征存在，未论证在TNTs研究背景下，选择DiD（因其长链饱和尾链特性优先导向溶酶体）来替代传统溶酶体染料并非显而易见的构思，也未提供证据证明D1或其他文献给出了这样的教导或启示。

跨细胞自噬表征方面，审查员指出使用流式分选、WB、TEM分析是常规手段。申请人未反驳该认定，也未论述本申请所揭示的溶酶体共享型跨细胞自噬这一生物学新机制本身对方法创造性产生的积极影响。审查员会认为这只是对新发现的常规表征，方法本身是常规的。

4. 修改后权利要求1存在缺少必要技术特征和疑似修改超范围的风险

新的权利要求1作为一个方法权利要求，包含了固定状态和活细胞状态两套完全不同的技术方案的完整步骤。将其写入一个权利要求中，表述冗长，且可能存在缺陷。

疑似缺少必要技术特征方面，原权利要求1中根据Z轴滑动法或正交视图法是并列方案，修改后删除了Z轴滑动法，但保留了活细胞方法的完整步骤。活细胞方法的完整步骤（接种、DIC成像、双焦平面对照判定）被写入，但固定方法中只保留了正交视图法，而将详细的参数放入从属权利要求2。这可能会被审查员质疑：为什么活细胞的方法步骤必须写入独立权利要求（成为必要特征），而固定方法的详细步骤则可以放在从属？这可能导致审查员认为活细胞方法的全部步骤并非必要，从而要求简化，或质疑独立权利要求1的保护范围不清楚。

修改超范围风险方面，原始权利要求1中并未限定活细胞状态下如何具体进行双焦平面判定（该内容来自原始权利要求5）。原权利要求1只是笼统地说基于微分干涉对比系统进行活细胞成像，对...是否附着于培养皿底部进行判定。现在将一个从属权利要求的全部内容（双焦平面判定逻辑）写入独立权利要求，虽然技术上未超范围，但改变了保护范围的界定方式。审查员可能不质疑超范围，但会质疑其不清楚。

5. 应用权利要求的创造性论证缺失

对权利要求4（原权利要求9）和5（原权利要求10）的创造性陈述完全空白。仅提到权利要求2至7包含独立权利要求1的全部技术特征，因而也具备创造

性。这是一种危险的假设，因为审查意见明确指出，该应用本身也是容易想到的。

后果导致审查员会直接出具最终驳回，理由仍是：方法权利要求不具备创造性，因此使用该方法的药物应用也不具备创造性。申请人并没有想办法将应用权利要求与溶酶体共享型跨细胞自噬新机制紧密结合，论证该方法的特异性应用价值。

三、第二次审查意见审视

本次二次审查意见的核心是创造性（专利法第22条第3款）。审查员的核心逻辑是，本申请权利要求1的技术方案相对于对比文件1（强金彪的硕士论文）与公知常识的结合是显而易见的。具体而言，审查员将本申请相对于对比文件1的三个主要区别技术特征——正交视图法、双焦平面对照法和基于溶酶体标记的跨细胞自噬表征体系——均认定为本领域的常用技术手段或本领域技术人员容易想到的。

（一）强有力观点

审查员将本申请的核心技术贡献，尤其是溶酶体共享型跨细胞自噬的表征方法，认定为已知技术手段的组合。

这是审查意见中逻辑链条最完整、杀伤力最大的观点。审查员承认本申请权利要求1包含了对比文件1未公开的溶酶体标记、巴弗洛霉素A1处理、流式分选、WB、电镜这一整套流程。但他通过引用一份外部公知常识证据（《蛋白质技术在病毒学研究中的应用》），指出巴弗洛霉素A1抑制溶酶体是已知手段，进而论证整个表征方法是本领域技术人员容易想到的。这个逻辑如果被接受，将直接剥夺本申请在生物学功能验证层面最具创新性的部分，使其沦为对现有技术的简单组合。

应对思路：

1. 审查员错误地将一个系统的、功能导向的、解决特定问题的技术方案，拆解成若干个孤立的、已知的工具（如巴弗洛霉素A1）和方法（如WB）。反驳的关键在于强调，将这些已知工具和方法有机组合成一个全新的、用于直接证实跨细胞自噬这一特定生物学功能的完整体系，本身就是一个非显而易见的创造性步骤。

2. 对比文件1仅停留在观察到TNTs内有囊泡运输这一层面，其技术动机是证实TNTs具有物质运输功能。而本申请的技术动机是表征一种全新的、由TNTs介导的生物学功能——溶酶体共享型跨细胞自噬。这是一个本质的区别。对比文件1和公知常识均未给出为了表征TNTs介导的跨细胞自噬，需要将溶酶体标记与自噬通路抑制剂（巴弗洛霉素A1）结合，并通过功能蛋白和超微结构分析来验证的任何启示。这个技术动机的缺失是反驳审查员容易想到结论的基石。

3. 该组合方案的技术效果不仅仅是观察到溶酶体，而是首次在TNTs领域，系统地表征并量化了溶酶体共享这一行为，并证明了其与跨细胞自噬这一细胞存活或死亡通路之间的因果关系。这个效果是全新的、预料不到的，绝非简单重复现有技术所能获得。需要结合说明书中图4至图12及其对应的实施例3至6，突出这一技术效果如何解决了TNTs如何挽救受损细胞这一科学问题。

（二）错误观点

审查意见中存在多处明显的事实和逻辑错误，这些是答复中最有力的反击武器。

错误1：事实错误——对对比文件1活细胞成像内容的误读

审查员在分析区别技术特征②时，将对比文件1中我们使用DIC进行了活细胞成像这一操作，与对隧道纳米管的关键鉴定要点即是否附着于培养皿底部进行判定划等号。

反驳要点：

原文引用（对比文件1第3.1.1节，第11页）：对比文件1明确指出，其在固定细胞中通过Z轴扫描和三维重建来鉴定TNTs是否符合不与培养皿底部接触的标准。

原文引用（对比文件1第3.3节，第19至20页）：对比文件1在描述活细胞成像时，其目的是为了进一步明确MLO-Y4细胞间通过TNTs的物质运输，并且它自己承认在对细胞间TNTs进行活细胞成像时，对TNTs进行严格的鉴定非常困难以及尽管DIC并不能严格地鉴定TNTs（对比文件1第25页）。

审查员的陈述严重误读对比文件1的原文。对比文件1明确将鉴定TNTs和观察TNTs中的物质运输在技术方法和适用场景上做了区分。DIC在对比

文件1中是一个观察工具，而非鉴定工具，更不是用于判定是否附着于培养皿底部的特定逻辑。本申请首次将DIC的双焦平面对照系统性地用作鉴定TNTs的判定逻辑，这是根本性的不同。审查员将其混为一谈，构成明显的事实错误。

错误2：逻辑错误（推理断裂）——正交视图法为常用技术手段

审查员认为采用正交视图法对细胞进行三维分析，是本领域的常用技术手段，从而推断将其用于TNTs鉴定是本领域技术人员容易想到的。

反驳要点：

审查员偷换了对细胞进行三维分析和对TNTs进行正交视图法鉴定这两个概念。正交视图法（查看XZ和YZ平面）确实是三维成像软件（如Imaris）的一项基础功能，用于浏览图像。但是，将其系统地、标准化地用作一种特定的鉴定标准，而非简单的辅助观察工具，这完全是另一回事。

从存在一个工具（正交视图功能）推导出将该工具用于解决一个特定技术问题（在复杂细胞形态中准确区分TNTs和树突）是显而易见的，这是一个逻辑断裂。这个推理成立的前提是，现有技术已经认识到区分TNTs和树突是一个难题，并且提示了正交视图法是解决该难题的有效手段。然而，对比文件1全文描述的是如何通过Z轴滑动法（看结构何时出现，而非在哪个空间位置）来确认悬浮，这是一个序列或时间证据。而正交视图法是空间证据。两者解决的问题和证据类型不同，后者在TNTs鉴定领域的应用没有任何现有技术教导或启示。审查员将有工具与被教导使用工具解决特定问题混淆了。

错误3：逻辑错误（概念偷换）——双焦平面法等同于调节焦点位置

审查员将本申请独创的双焦平面对照判定逻辑贬低为通用的通过调节焦点的位置并观察细胞的清晰度以确定细胞所处深度的方法。

反驳要点：

偷换核心特征：本发明的核心不在于能调节焦点，而在于系统性对照。具体而言，是将底部焦平面（清晰贴壁结构）和上部焦平面（清晰悬浮结构）这两个特定平面的清晰或虚焦状态进行实时、动态的对照，从而形成一种快速、可靠的判定逻辑。这是双焦平面对照判定逻辑，而非常规的单点对焦。审查员的描述抹杀了这个对照体系的创造性贡献。

忽略解决的问题：本申请用此方法解决了活细胞成像时TNTs与树突难以区分的难题。该难题源于TNTs脆弱、动态、难以进行三维成像的特点。现有技术（包括对比文件1）要么放弃在活细胞中严格鉴定，要么依赖静态的三维成像。本发明的这套双焦平面对照逻辑提供了一种非侵入性、实时、高效的解决方案。审查员的论证完全忽略了本申请针对这个特定技术问题所提供的、不同于现有技术思路的创造性解决方案。

（三）薄弱观点

审查意见中的一些论证缺乏充分的事实或逻辑支撑，是进一步反驳时可以乘胜追击的薄弱环节。

1. 正交视图法是常用技术手段，但未提供任何证据

审查员使用常用技术手段或公知常识来驳回创造性时，负有举证责任或至少应给出令人信服的理由。在本案中，审查员除了断言之外，没有提供任何一篇对比文件或技术手册来证明在TNTs鉴定中使用正交视图法作为鉴定标准是本领域的公知常识或常用手段。特别是，对比文件1作为最接近的现有技术，其使用的是Z轴滑动法，而非正交视图法，这恰恰反证了正交视图法并非该领域的默认或常规选择。这个论断是论证的核心，却几乎没有任何证据支撑，是明显的薄弱点。

攻击策略：

在意见陈述中，可以明确指出：审查员认为正交视图法是常用技术手段，但并未提供任何支持该论点的证据。事实恰恰相反，最接近的现有技术对比文件1明确采用了不同的技术路线（Z轴滑动法），这证明本申请的正交视图法并非显而易见的常规选择。如审查员认为其为公知常识，请提供明确证据。

2. 溶酶体表征体系是容易想到的，但忽略了其系统性和针对性

审查员虽然引用了《蛋白质技术在病毒学研究中的应用》作为证据，证明巴弗洛霉素A1用于自噬研究是已知的。但这份证据本身与TNTs领域毫无关联。它最多能证明巴弗洛霉素A1是研究自噬的工具，但完全无法证明将巴弗洛霉素A1与TNTs介导的溶酶体转移结合起来，用于表征跨细胞自噬是容易想到的。审查员的论证逻辑是因为A已知，B已知，所以A加B已知，这忽略了A加B组合的

特定技术背景和所要达到的全新功能。这个结论的得出是仓促且缺乏说服力的。

攻击策略：

强调该表征体系是一个有机整体，每个步骤都为回答溶酶体是否通过TNTs被共享并引发功能性跨细胞自噬这一核心科学问题而设计。引用文献仅表明巴弗洛霉素A1用于自噬研究，但未给出其在TNTs介导的物质运输研究中的应用启示。本申请是其首次将这一工具用于证实一个全新的生物学过程，这本身就构成了发明点。

四、第二次答复审视

首先需要明确指出，这份答复的策略性、说服力和对技术要点的把握，相较于第一次答复有了显著的提升。申请人对权利要求进行了大幅修改，将保护范围精准地收窄至溶酶体运输鉴定及跨细胞自噬表征这一核心创新点，并调整了权利要求4和5的用途限定，这是非常关键且成功的。

（一）修改和陈述做得好的地方

1. 关键的权利要求修改策略

精准限缩保护范围：将原权利要求1从宽泛的隧道纳米管及其运输物质的鉴定方法修改为具有明确功能指向的隧道纳米管介导的溶酶体运输鉴定及溶酶体共享型跨细胞自噬表征方法。这个标题和独立权利要求的前序部分直接点明了本申请与对比文件1的核心区别：对比文件1只做了一般性囊泡运输的观察，而本申请聚焦于特定的生物学功能（溶酶体运输和跨细胞自噬），技术问题和技术方案都发生了实质性变化。

明确界定技术问题：通过对权利要求的修改，将实际解决的技术问题从审查员认定的如何对TNTs进行观察分析，转变为如何在具有复杂树突形态的细胞中准确识别非贴壁TNTs，并在此基础上建立一套针对TNTs介导的溶酶体共享型跨细胞自噬的连续表征方法。这使得审查员的判断依据发生了根本性的动摇。

删除易被克服的附加特征：删除了原从属权利要求3（Z轴滑动法），将论证重心完全放在更难被公知常识挑战的正交视图法和双焦平面对照判定逻辑上。

调整权利要求的类型和内容：将权利要求4从在制备与细胞丢失相关疾病用药物中的应用修改为在评估或筛选与细胞丢失相关疾病的候选药物中的应用，这更准确地反映了本发明的技术贡献——提供了一种研究方法平台，而非直接提供药物、治疗或诊断方法，从而规避了专利法第25条可能涉及的诊断治疗方法的客体问题。

2. 创造性争辩的有效策略

技术问题的重新定义：这是本次答复最具说服力的部分。答复明确指出，审查员认定的如何对TNTs进行观察分析过于宽泛和笼统。本申请实际要解决的是更复杂、更具体的复杂形态细胞中TNTs与树突的区分以及特定功能的表征问题。抓住了这个根本，后面的论证才能稳固。

强调技术方案的整体性而非零散的技术手段：答复反复强调，权利要求1的创造性不在于正交视图法、双焦平面或溶酶体标记这些单独的已知手段，而在于将这些手段按照特定的逻辑组织起来，形成一套解决上述特定技术问题的连续、系统的方法体系。这个论证精准地反驳了审查员将各区别特征拆解后认定为公知常识的审查逻辑。

有效反驳了事后诸葛亮式的分析：答复指出，即便各单项工具分别已知，现有技术也并未给出将其按照本申请权利要求1所述方式组织起来以解决上述特定技术问题的明确动机和技术启示。这是创造性审查中非常关键的论点，强调技术方案的非显而易见性，而非零散要素的可获得性。

论证的层次感强：将结构鉴定和功能表征两个层面分开论述，先证明确实能准确识别出TNTs（结构），再证明能对其特定的生物学功能（溶酶体共享和自噬）进行表征和验证（功能），逻辑递进，环环相扣。

3. 对审查员意见的回应

正面回应公知常识：对于审查员指出的溶酶体标记、巴弗洛霉素A1、WB、电镜等属于公知常识，答复并未否认这些工具本身，而是巧妙地将问题的焦点转移到了将这些工具应用于跨细胞、TNTs介导的溶酶体共享这一特定场景的非显而易见性。这避免了在已知工具层面上的无谓纠缠。

直接否定审查员的结论：答复明确指出对比文件1并未给出这样的技术启示，态度明确，论证有力。

本次答复在战略层面非常成功，通过精准限缩和有利的逻辑论证，极大地强化了本申请与审查员所举证的最接近的现有技术及其公知常识之间的界限。

申请人不再是防御性地解释，而是在进攻性地、系统地构建本发明的技术贡献为什么是非显而易见的。

(二) 忽略或薄弱的地方

尽管整体表现优秀，但仍有一些可以优化或存在风险的地方。

1. 权利要求2修改超范围风险

新修改的权利要求2中，对固定液二次固定的描述为再用含有3.8%至4.2% (w/v) 多聚甲醛的固定液进行固定10至20分钟。请核对原始说明书（实施例1），原文为然后使用4% (w/v) 多聚甲醛固定液室温固定15分钟。虽然修改（3.8%至4.2%和10至20分钟）在数值范围上可能与说明书的公开内容一致，但审查员可能质疑：说明书只给出了一个具体点（4%，15分钟），而没有给出范围。将点值扩展为范围，存在一定的修改超范围风险。建议依据说明书原文，直接限定为4%多聚甲醛固定液固定15分钟，以规避风险。

2. 权利要求3中的方法步骤不完整

权利要求3关于三维培养的步骤，引用原说明书实施例4。其中，在提到将标记有DiD的细胞重悬于 α -MEM中时，原说明书有密度为0.5乘以10的4次方细胞每毫升的具体限定。虽然不写出密度不一定会被认定为不清楚，但为了更好的支持，可以考虑加入。同样，体内骨细胞鉴定部分，在然后将动物组织切片与DiD染色液进行避光孵育前，原说明书有室温下与100微摩尔DiD染色液避光孵育1周的明确条件。现有修改为避光孵育，过于宽泛，可能被质疑缺乏说明书支持。建议将关键的浓度、时间等参数补充进权利要求3，使其得到说明书的直接支持。

3. 对对比文件1中活细胞成像的挖掘不够深入

审查员在通知书中明确提到对比文件1公开了使用DIC进行了活细胞成像。答复中承认了这一点，但未有效区分对比文件1中的DIC是用于什么目的（观察一般性囊泡运输），以及是否公开了双焦平面的判定逻辑。答复可以更主动地界定对比文件1公开的技术内容，指出其DIC应用仅仅是演示现象，而非作为一种与固定状态鉴定方法衔接互补、用于解决复杂树突与TNTs混淆这一特定技术问题的判定方法。

4. 对审查员引用的公知常识文献缺乏正面挑战

审查员引用了《蛋白质技术在病毒学研究中的应用》一书来佐证巴弗洛霉素A1是公知常识。申请人的答复只是说现有技术未给出启示，但没有正面反驳这本书是否公开了在跨细胞、TNTs介导的溶酶体共享体系中使用巴弗洛霉素A1。如果该书仅仅是在细胞水平的自噬研究中提到该试剂，则其相关性是有限的。建议在答复中强调，该书公开的是单细胞内的自噬研究，而非本申请所涉及的复杂的跨细胞体系，从而削弱其作为公知常识证据的效力。

5. 对技术效果的说理可以更充分

答复中提到了解决了误判风险、提供了更直接的核验方式，但可以更具体地量化或对比效果。例如，可以强调，对于树突丰富的骨细胞，使用正交视图法相比Z轴滑动法，能将哪些容易误判的情况（如弯曲贴壁的树突）排除，错误率降低多少。虽然目前可能没有直接数据，但可以用逻辑推理。更有效的做法是在答复中承诺或暗示提供补充实验数据。

五、驳回复审策略制定

（一）驳回决定核心逻辑与新增关键点

驳回决定的核心逻辑建立在第二次审查意见通知书的基础上，其论点可概括为：申请人虽进行了多次修改和争辩，但修改后的权利要求1所限定的全部技术特征，在对比文件1中均有公开或属于本领域的常规技术手段，因此整体方案不具备创造性。

与第二次审查意见相比，驳回决定并未新增实质性的技术论点，而是对第二次审查意见中的论点进行了强化和固化。其核心关键点在于：

将正交视图法与双焦平面对照判定逻辑均认定为常规技术手段：审查员认为，正交视图（XZ和YZ切面观察）是三维成像后分析数据的常规操作，而调焦观察悬浮或贴壁结构也是显微镜使用的基本常识。因此，将这些方法用于TNTs鉴定是本领域技术人员容易想到的。

将溶酶体共享型跨细胞自噬表征拆解为已知工具的简单组合：审查员认为，溶酶体标记、巴弗洛霉素A1处理、流式分选、Western Blot和透射电镜各自都是本领域公知的成熟技术。将它们组合用于观察TNTs介导的运输和功能，并未带来预料不到的技术效果，也缺乏克服技术偏见的证据。

坚持技术问题窄化的认定：驳回决定将本申请实际解决的技术问题仍然限定在如何对隧道纳米管进行观察分析这一宽泛且常规的层面，拒绝了申请人提出的解决复杂形态细胞中TNTs与树突精确区分难题以及建立TNTs介导的溶酶体共享型跨细胞自噬连续表征方法这一更具体、更深入的技术问题认定。

（二）审查过程中的关键失误与遗漏

回顾整个审查过程，申请人在答复中作出了努力，但存在几个可以优化甚至关键性的失误，这些是复审中必须纠正和弥补的：

初期战略性失误，过早且过多地加入非核心细节：在第一次答复时，将权利要求1、2、4合并，并删除了Z轴滑动法。这导致权利要求保护范围严重缩水，且将大量参数细节（如固定液浓度、染色时间等）带入独立权利要求。审查员可以轻易地认为这些参数是常规选择从而否定创造性。这是最致命的战略失误。

技术问题争辩不够穿透，尽管在第二次答复中，申请人将技术问题调整为如何在具有复杂树突形态的细胞中准确识别非贴壁TNTs，并建立TNTs介导的溶酶体共享型跨细胞自噬的连续表征方法，但论证仍显薄弱。复审时需要提供更深入、更具说服力的证据，证明：为什么在对比文件1公开了Z轴滑动法后，本领域技术人员没有动机去尝试正交视图法来解决技术问题；为什么将已知工具（溶酶体标记等）组合起来形成连续表征方法并非显而易见，而是需要克服技术偏见或进行创造性劳动。

未充分利用对比文件1自身的局限性，申请人反驳的核心之一是指出对比文件1的Z轴滑动法的不足（可能误判）。但复审中应更尖锐地证明，对比文件1的作者本人也未能意识到这个问题，或者其方法本身就存在局限性。需要引用对比文件1原文，证明其方法无法解决复杂树突混淆这一核心问题。

说明书数据利用不足，申请人的答复中，对于方法的技术效果（如成功率、准确率等）缺乏量化的数据支撑。审查员非常重视预料不到的技术效果。如果能从说明书中挖掘出正交视图法相较于Z轴滑动法在特定细胞中鉴定准确率显著提升的数据，将极具说服力。说明书图1至图3展示的成功案例，需要被论证为是系统化方法（而非偶然）的结果。

（三）复审策略

基于以上诊断，制定如下多层次、高优先级的复审策略。

1. 策略一：权利要求修改 (P0)

核心修改原则：缩限范围以聚焦核心创新，而非无谓地加入细节参数，从而与对比文件1形成清晰的技术路径差异。

1.1 修改后的独立权利要求1 (建议方案)

一种基于正交视图和双焦平面对照的细胞间隧道纳米管介导的溶酶体运输及跨细胞自噬的表征方法，其特征在于，包括以下步骤：

A. 固定态下基于正交视图法的TNTs鉴定步骤，包括：对固定和F-肌动蛋白染色后的待测细胞进行三维成像；在得到的三维图像中，标记连接至少两个细胞且F-肌动蛋白染色阳性的细胞间连接；其特征在于，随后根据正交视图法，通过同时观察该连接结构的XZ切面和YZ切面，仅将在XZ和YZ两个正交切面中均不与培养皿底部接触的细胞间连接鉴定为隧道纳米管。

B. 活细胞态下基于双焦平面对照判定的TNTs鉴定及溶酶体运输观察步骤，包括：将活细胞状态下的待测细胞接种于培养皿上，基于微分干涉对比系统进行活细胞成像；其特征在于，对隧道纳米管是否附着于培养皿底部的判定采用双焦平面对照判定逻辑：当焦平面位于培养皿底部时，贴壁的树突清晰而TNTs虚焦；当焦平面位于培养皿底部上方TNTs所在层面时，TNTs清晰而树突虚焦，从而鉴定出非贴壁的TNTs；将供体细胞用溶酶体特异性荧光染料标记，受体细胞用细胞质荧光染料标记，共培养后，在活细胞成像下观察溶酶体荧光信号通过所述鉴定的TNTs动态运输。

C. 溶酶体共享型跨细胞自噬的表征步骤，包括：在所述共培养体系中，于共培养结束前加入或不加入自噬抑制剂巴弗洛霉素A1，然后进行流式分选，获得接收了供体细胞来源溶酶体信号的受体细胞；对分选后的受体细胞进行自噬相关蛋白的免疫印迹分析和透射电镜分析，以表征TNTs介导的溶酶体共享型跨细胞自噬。

1.2 修改依据

正交视图法：说明书第0020段及权利要求4（原第4条）。

双焦平面对照判定逻辑：说明书第0025段及权利要求5（原第5条）。

溶酶体运输与跨细胞自噬表征：说明书第0027至第0029段及权利要求6和8（原第6、8条）及实施例3至6。

删除所有具体参数：将权利要求2（原权利要求2）的全部具体参数删除，保留为从属权利要求。这避免了在独立权利要求中引入非必要步骤，使核心创新点（两正交切面加双焦平面对照加溶酶体功能表征的组合）更加突出。

2. 策略二：事实错误反击（P0）

核心是证明审查员在认定技术启示时存在事实错误。需要逐字引用对比文件1原文，证明其并未给出任何将正交视图系统地用于TNTs鉴定，以解决树突混淆问题的教导或启示。

2.1 论证路径

引用对比文件1原文，对比文件1第X页第Y行描述进行Z轴扫描，发现其未附着于培养皿底部。这里的方法本质是Z轴滑动法或自下而上扫描。

指出审查员的错误类比，审查员认为正交视图法是常规三维分析手段。但复审时应指出，常规使用（例如观察细胞核与细胞膜的相对位置）与特定用途（作为排除贴壁倾斜伪影、专门用于区分复杂树突与TNTs的唯一判定标准）之间存在本质区别。

证明本申请的特殊背景，强调对比文件1研究的MLO-Y4骨细胞是具有复杂形态的细胞，其树突网络与TNTs极易混淆。对比文件1的作者并未意识到其Z轴扫描方法在此类细胞中的误判风险，也未提出任何解决方案。其论文或研究的目的仅仅是证实TNTs存在，而非提供一套标准化、高准确率的区分方法。

3. 策略三：组合动机缺失论证（P0）

核心论点：复审委员会应重新评估本申请的整体性。本申请并非正交视图法加双焦平面对照加溶酶体标记加自噬检测的简单相加，而是一个为回答特定科学问题（TNTs是否介导了跨细胞溶酶体共享以维持细胞存活）而设计的、逻辑闭环的、非显而易见的系统解决方案。

3.1 论证路径

问题驱动：本申请要解决的最终问题是揭示复杂形态细胞中TNTs是否介导了一种维持存活的救援机制。

方案链：要回答这个问题，必须依次解决三个子问题：第一，如何准确发现TNTs（正交视图法）；第二，如何实时观察货物（溶酶体）运输（双焦平面对照加溶酶体标记）；第三，如何确凿证明运输的溶酶体在受体细胞中发挥了特定生物学功能（自噬表征）。

非显而易见的整体性：对比文件1仅解决了子问题一的粗糙版本（识别存在）和子问题二的简单版本（看到运输）。现有技术中没有文献将这三个具有关联性和递进性的子问题整合成一个完整的方法链，以系统地回答TNTs是否介导了溶酶体共享以实现跨细胞自噬这一科学命题。

克服技术偏见：可以主张本申请克服了一种技术偏见，即对于骨细胞等复杂形态细胞，要区分TNTs和树突是不可能的，或现有方法不可靠。本申请通过系统化方法首次实现了这一区分并验证了其功能，这本身就是一项进步。

4. 策略四：技术问题重新认定 (P1)

目标：挑战审查员将技术问题窄化为如何对隧道纳米管进行观察分析。

4.1 论证

基于策略二的论证，本申请实际解决的技术问题是：如何建立一套针对复杂形态细胞（如骨细胞）的、能够准确区分TNTs与树突并同时验证其介导的溶酶体共享型跨细胞自噬功能的系统化鉴定与表征方法。

在复审理由书的理由部分，开宗明义地阐明这一更准确的技术问题。所有后续的创造性争辩都应围绕这一重新界定的问题展开。这是改变审查员认知框架的关键一步。

5. 策略五：说明书支撑防御 (P1)

5.1 区分技术效果与原理解释

在复审理由中，明确区分观察到了什么效果和为什么会有效果。本申请的核心价值在于技术效果（能够准确鉴定TNTs并验证其特定功能），而非对原理的完整解释。

5.2 放弃无支撑的数据

无需再争辩具体参数（如1比50至1比150鬼笔环肽稀释倍数）的非显而易见性，因为这些已经在修改中被删除。

5.3 识别可用的说明书数据和效果

图1至图3：展示该方法在骨细胞、原代细胞等多种复杂形态细胞中成功、清晰地鉴定出TNTs，并有效与树突区分。应强调这些图示是该法系统性工作流程的结果，而非偶然。

图4至图6：展示溶酶体通过TNTs运输的证据。

图7至图12及实施例：展示流式分选、WB、TEM对跨细胞自噬的表征结果，证明了该功能链条的完整性。应强调这些实验的严谨性（如使用巴弗洛霉素A1对照）。

5.4 论证预料不到的技术效果

通过提供一套完整、可靠的方法，使得过去无法进行的研究（如定量分析TNTs介导的溶酶体转移和功能）变得可行。这种从无法到可行的质的飞跃，是本申请最有力的技术效果证据。

6. 策略六：产品权利要求独立论证（P1）

6.1 适用对象

修改后的权利要求4（应用权利要求）。

6.2 论证路径

该权利要求保护的是一种方法的应用，而非方法本身。其创造性应基于该方法作为一个整体的用途。只要证明前序的方法（权利要求1至3）相对于对比文件1具备创造性，并且该方法的用途已在说明书中被证实（如用于研究骨质疏松症中的细胞存活），那么该应用权利要求自然也应具备创造性。