

CAVELIER

ABOGADOS

WEB SITE: www.cavelier-abogados.com
E-MAIL: cavelier@colomsat.net.co

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTÁ 8, COLOMBIA

TELÉFONO: (57) (1) 347-3611
10-4995

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación: 00029093-00000003

Fecha: 30

Fecha: 2000-12-03 17:12:16

Título: LOS PATENTES D. 1 REGISTRO 444 RESPUESTA
Referencia: 2000 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Señora Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

Referencia : Expediente No. 00.029.093

Solicitante : BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA
GMBH

Asunto : Solicitud de patente para: "ESTUCHE DE
ENSAYO PARA EL DIAGNOSTICO DE
ENCEFALOPATIAS ESPONGIFORMES
TRANSMISIBLES".

Fecha de la solicitud : 19 de Abril de 2000

TRAMITE:02 - EVENTO:01 - ACTUACION:444

1. Yo, Emilio FERRERO, obrando como apoderado del solicitante en el asunto antes identificado, me refiero al auto número 1149, notificado por estado del 7 de Septiembre de 2000. Para atender a la providencia anterior solicité un plazo por medio de mi memorial número 00029093 00000003 radicado el 18 de Octubre de 2000.

2. Mediante el auto número 1149 se puso en conocimiento del solicitante el informe que contiene las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente. Atiendo a las observaciones de la manera siguiente:

2.1. Título del invento. Para atender a la observación hecha por su Despacho en relación al título, presento aquí nuevo título como sigue:

"ESTUCHE DE ENSAYO PARA EL DIAGNOSTICO DE
ENCEFALOPATIAS ESPONGIFORMES TRANSMISIBLES"

Adicionalmente presento nuevo formato de solicitud en donde aparece el nuevo título que presento.

126
124

2.2. Descripción Presento con este escrito una nueva descripción en la cual se han modificado las unidades de frecuencia de rotación, de acuerdo con lo requerido por ese Despacho.

2.3. En las reivindicaciones. Se informa a ese Despacho que el día 03 de mayo de 2000 se presentó nuevo capítulo reivindicatorio junto con el memorial No. 00029093 00000001. Este capítulo presentado se ha modificado nuevamente para atender las objeciones presentadas.

Presento con este escrito un nuevo pliego reivindicatorio en el cual se han realizado las siguientes modificaciones:

- Con el fin de atender los requerimientos de ese Despacho el nuevo capítulo reivindicatorio se ha limitado.
- La reivindicación 1 se ha restringido de tal forma que el estuche se caracteriza porque comprende anticuerpos u oligonucleótidos que son los elementos necesarios para la detección de la expresión modificada de una proteína. Además se hace notar que todos los elementos que caracterizan al estuche se mencionan en la descripción en la página 10, líneas 7 a 17 y página 10 línea 24 a página 11 línea 3. Se recuerda que la descripción es la que debe "divulgar la invención de manera suficientemente clara y completa para su comprensión y para que una persona capacitada en la materia técnica correspondiente pueda ejecutarla". (Decisión 486, artículo 28). Por lo tanto las reivindicaciones deben leerse en conjunto con las reivindicaciones para poder entender la invención. Como se aprecia en dicho párrafo se mencionan los elementos que debe contener el mencionado estuche. La anterior limitación y precisión, aclaran la anterior reivindicación 16, nueva reivindicación 1.
- La reivindicación 2 se ha modificado para especificar el grupo del cual se selecciona la proteína marcadora. Con lo anterior se precisan y aclaran las antiguas reivindicaciones 17 a 19, nuevas 2 a 4.
- Se eliminan las reivindicaciones 20 a 23. La reivindicación 26 y 27 a 31, nuevas 7 y 8 a 12 ya se encuentran definidas en razón a la limitación y aclaración de la reivindicación 1, que define de manera precisa el estuche que es el objeto de la invención.
- Para la reivindicación 25, nueva 10, los oligonucleótidos se encuentran ejemplificados en la página 19, líneas 1 a 3; página 29, línea 21 y 22; página 20, líneas 28 a última. Resulta posible para el experto en la

125
127

técnica encontrar oligonucleótidos similares que se encuentren dentro del alcance de la invención sin realizar experimentación innecesaria debido a la completa claridad de la descripción.

- Las reivindicaciones de uso se han modificado

Le solicito se sirva aceptar este nuevo capítulo reivindicatorio de 21 reivindicaciones en sustitución del presentado originalmente.

Finalmente, solicito a Usted muy comedidamente que si el examinador discrepa con respecto a alguna de las anteriores explicaciones, dichas eventuales discrepancias sean informadas junto con el examen de fondo y no constituyan impedimento substancial para el buen desarrollo de esta solicitud de patente.

2.4. Extracto. Adjunto a este memorial presento nuevo extracto, nueva tarjeta temática y nueva tarjeta de archivo de propietarios (Formas P-103, P-104 y P-105), los cuales están en conformidad con las modificaciones hechas al pliego reivindicatorio y al título.

2.5. Dibujos. Se dice por parte de su Despacho en el punto dos del examen de forma que las figuras 1 a 14 no están presentes. Sin embargo esta solicitud sólo posee 3 dibujos, lo cual se ratifica por el requerimiento del punto 4.

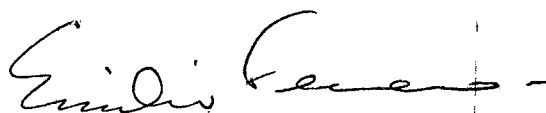
En respuesta a su requerimiento en el punto 4 sobre los dibujos formales me permito informar que el solicitante, por dificultades insalvables, ha decidido retirar las tres figuras de la solicitud.

2.6. Copia Certificada. Me permito informarle que la copia certificada de la solicitud de patente alemana número 199 18 141.1 del 21 de abril de 1999 junto con su respectiva traducción de su descripción, reivindicaciones y carátula, en la cual se basa la reivindicación de la prioridad, fue presentada junto con mi memorial 00029093 00000002 del día 14 de julio de 2000.

128
126

3. Puesto que se han atendido a cabalidad las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente, atentamente solicito que se continúe su tramitación.

Bogotá, -5 DIC. 2000
Señora Jefe,



EMILIO FERRERO

T.P.A. No. 31.929



COLO 04484-801-006-0
ASN- 61

DATOS DEL SOLICITANTE

(71) Nombres y Apellidos o Razón Social

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH

No. de identificación

Representante Legal (Persona Jurídica)

País de Domicilio

Alemania

Departamento o Estado

Dirección

Ingelheim am Rhein

Ciudad

D-55216

(74) DATOS DEL APODERADO

Nombre

EMILIO FERRERO

Dirección y Domicilio

Carrera 4 No. 72-35 Piso 4o.

Ciudad

Bogotá, Colombia

DATOS DEL INVENTOR

(72) Nombre del Inventor (es)

1- Dr. Mark Stephen ROGERS

2- Dr. Matthias GIESE

Identificación

Dirección

1- Oaklodge, IE-Glencree, Wicklow, Irlanda

2- Am Honigberg 2c, D-55545 Bad Kreuznach, Alemania.

Ciudad

DATOS DE LA PATENTE DE INVENCION

(54) Título de la Invención

**ESTUCHE DE ENSAYO PARA EL DIAGNOSTICO DE
ENCEFALOPATIAS ESPONGIFORMES TRANSMISIBLES**

PRIORIDAD REIVINDICADA

SI ☒

NO ☐

TIPO DE PRIORIDAD

ANDINA ☐

UNIONISTA ☒

(33) País

Fecha

No. Solicitud

DE.

21 de Abril de 1999

199 18 141.1

Convención de París

Para Publicar a los

☐ 6 meses

☐ 12 meses

☒ 18 meses a partir de la fecha de la presente solicitud

Colo: 04484-801-006-0

RCB/mrm-50

(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL

: A 61B 019/000

RESUMEN CON EL OBJETO Y LA FINALIDAD DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a un procedimiento para el diagnóstico preclínico y clínico de encefalopatías espongiformes transmisibles, caracterizado porque se determina la expresión modificada de una proteína marcadora. En formas de realización particulares, en el procedimiento conforme al invento la proteína marcadora medida es la proteína de priones PrP-sen o interferón gamma (IFNy) o el receptor de laminina (LR) o el precursor del receptor de laminina (LRP). El invento se refiere también a un estuche de ensayo con utilización de anticuerpos que son específicos para la proteína marcadora conforme al invento. El invento se refiere además a un estuche de ensayo con utilización de oligonucleótidos que son capaces de hibridarse en condiciones rigurosas con el ácido nucleico que codifica la proteína marcadora conforme al invento. El invento se refiere además a la utilización de anticuerpos u oligonucleótidos, que son específicos para las proteínas marcadoras antes mencionadas, en un procedimiento conforme al invento. El invento se refiere además a la utilización del estuche de ensayo para el diagnóstico de encefalopatías espongiformes transmisibles.

ANEXOS DE LA SOLICITUD

Certificado de Existencia y Representación Legal cuando el solicitante sea Persona Jurídica	☐
Los poderes debidamente otorgados, o mención de su protocolización ante la SIC	☐
Recibo de la tasa respectiva	☐
Recibo de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación	☐
Si se reivindica prioridad Andina:	
Copia de la primera solicitud	☐
Traducción oficial	☐
Si se reivindica prioridad Unionista:	
Copia certificada de la primera solicitud:	☐
Nota: Debe presentarse dentro de los tres (3) meses, contados a partir de la fecha de radicación de la solicitud posterior	
Traducción simple	☐
Capítulo descriptivo	☐
Dibujos, planos necesarios	☐
Capítulo reivindicatorio	☐
Tarjeta archivo propietarios según formato	☐
Tarjeta archivo temático según formato	☐
Extracto para publicación según formato	☐
Arte final 12 x 12 cms Y 6x6 cms	☐
Otros Documentos	☐

SOLICITO LA CONCESION DE LA PATENTE DE INVENCION Y DECLARO QUE LA INVENCION ES NUEVA Y DE MI PROPIEDAD

FIRMA

NOMBRE EMILIO FERRERO

CC. 438.019 de Usaquén

T.P.No. 31.929

**Estuche de ensayo para el diagnóstico de encefalopatías
espongiformes transmisibles**

El invento se refiere a un procedimiento para el diagnóstico de encefalopatías espongiformes transmisibles, así como a un estuche de ensayo para diagnóstico
5 mediando utilización de anticuerpos específicos para proteínas de priones y receptores de laminina. El invento se refiere además a la utilización del procedimiento o del estuche de ensayo para diagnosticar encefalopatías espongiformes transmi-
bles.

Ya hace más de 250 años se descubrió una enfermedad de corderos, que iba
10 acompañada por nerviosismo, prurito y ataxia y que finalmente terminaba con entumecimiento, parálisis y muerte. La enfermedad es conocida hoy en día como "*scrapie* (rascazón)" en países de lengua inglesa (puesto que los animales se frotan en postes y árboles, con el fin de reprimir el prurito), "*la trembrante* (la tembladera)" en Francia y "*Traberkrankheit* (enfermedad de trotones)" en Alemania. Estos nombres
15 reflejan la amplitud y diversidad de los síntomas. La rascazón fue investigada como el prototipo de un grupo de enfermedades, que atacan no solamente a los animales sino también a los seres humanos: las encefalopatías espongiformes transmisibles (del inglés *transmissible spongiform encephalopathies* = TSE). Las TSE's son enfermedades neurodegenerativas que evolucionan hasta la muerte (fatales), que
20 pueden atacar a un gran número de animales mamíferos.

La encefalopatía espongiforme bovina (BSE) es una enfermedad neurodegenerativa de animales bovinos y está relacionada con la rascazón en corderos y cabras y con la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob en seres humanos. Una glicoproteína asociada con membranas, codificada por el hospedante, de función desconocida, la
25 denominada proteína de priones PrP, desempeña un papel de importancia primordial en la patogénesis de estas enfermedades. Esta isoforma celular es expresada de modo especialmente fuerte en células neuronales, pero también se puede detectar con diversa frecuencia en células no neuronales. Esta proteína membranar es sensible (PrP-sen) a la digestión con enzimas (proteasas) específicas. Sin embargo, la forma
30 maligna soluble de la PrP (PrP-res), es resistente a proteasas y se acumula en los cerebros de animales infectados por BSE para formar placas amiloides. Esta forma de PrP-res está asociada exclusivamente con todas las enfermedades del tipo de TSE, inclusive la BSE, y puede ser extraída a partir de un tejido cerebral infectados con TSE/BSE.

131
129

Las desacostumbradas propiedades del patógeno de rascazón/BSE dieron lugar a especulaciones en una primera fase temprana de que el patógeno consiste exclusivamente en un ácido nucleico o en proteínas, o de que no contiene ni ácido nucleico ni proteínas y es un polisacárido o un fragmento de membrana. Los conceptos discutidos en máximo grado en el momento actual son la hipótesis de "sólo-proteína" y la hipótesis de virus/virino:

La hipótesis de "sólo-proteína" se basa en que el prión infeccioso PrP-res no contiene ningún ácido nucleico y es auto-replicante. Se especula sobre que una PrP-res se fija a una PrP-sen y convierte a ésta con ello en la forma maligna. La conformación de esta isoforma maligna está señalada por estructuras de hojas plegadas en beta, mientras que en la isoforma celular predominan las hélices alfa. La hipótesis de virus/virino se basa en que el agente infeccioso consta de un ácido nucleico vírico (posiblemente ácido ribonucleico = ARN) y en que la proteína de priones es una envoltura para el genoma del virus. El origen en un hospedante de la envoltura de priones explicaría la ausencia de reacciones inmunológicas e inflamatorias. La existencia de un ácido nucleico explicaría adicionalmente las aproximadamente 20 diferentes cepas de rascazón de ratones que se han descrito hasta el momento actual.

La isoforma celular PrP-sen está glicosilada en dos posiciones con asparagina, tiene un peso molecular de 33-35.000 Da y está anclada en la superficie externa de la membrana plasmática por un glicolípido del tipo de fosfatidil-inositol, que está fijado a su aminoácido terminal de carboxi. El máximo régimen de expresión de la PrP-sen se mide en el cerebro, pero el gen es expresado también en un tejido embrional no neuronal y de adultos. La función biológica de la proteína es hasta hoy en día todavía confusa. Se cree, entre otras cosas, que la PrP podría ser un receptor para factores de diferenciación neurotróficos. También esta proteína es puesta en relación con el ritmo de sueño y vigilia. Sin embargo, la PrP podría ser también un receptor para virus neurotróficos.

La isoforma celular normal de la proteína es degradada completamente por proteasas (PrP-sen). Por el contrario, la isoforma maligna (PrP-res) es degradada por proteasas para dar un fragmento de 27-30.000 Da, que todavía es completamente infeccioso (PrP-res). A la PrP-res le faltan los primeros 67 aminoácidos de la proteína PrP-sen madura. Un proceso posterior a la transcripción está conectado con la conversión de la PrP-sen en la PrP-res, y se sospecha que la única diferencia entre

la PrP-sen y la PrP-res es una diferencia en la estructura espacial tridimensional. Parece no existir ninguna diferencia bioquímica entre las formas normal y anormal de la proteína. Esto explica también que las dos isoformas no presenten ninguna diferencia antigénica. Además, la PrP-sen y la PrP-res tienen una secuencia común de aminoácidos. La PrP es codificada por una copia individual de un gen cromosomal y está conservada en alto grado en animales mamíferos. La secuencia completa que codifica la PrP está contenida en un único exón.

Al contrario que la PrP-sen, que es expresada en la superficie, la PrP-res se acumula en vesículas citoplasmáticas, de las que muchas son lisosomas secundarios. Las enfermedades del tipo de TSE se caracterizan por un largo tiempo de incubación, durante el cual no se observa ningún síntoma clínico. Le sigue una corta fase clínica, que conduce inevitablemente a la muerte.

La rascazón y la BSE eran diagnosticadas hasta ahora usando métodos histopatológicos, clínicos y epidemiológicos, puesto que los animales infectados de un modo natural probablemente no reaccionan de modo serológico a la PrP-res y el diagnóstico por inoculación de animales de laboratorio puede necesitar hasta 18 meses. El diagnóstico clínico se efectúa *post mortem* por examen histopatológico del cerebro. El estado en cuanto a BSE es clasificado en: positivo para BSE, negativo para BSE y sospechoso de BSE. Los animales que se consideran como sospechosos de BSE presentan los mismos signos clínicos que los animales positivos para BSE. Sin embargo, en el momento del examen, la evidencia histopatológica de la BSE es (todavía) negativa en el momento de la investigación. No obstante, este estado "sospechoso de BSE" puede ser un estado "pre-positivo para BSE", aunque en algunos casos se haga un diagnóstico alternativo o el animal pueda no tener BSE.

Los complejos métodos de diagnóstico, que antes se han mencionado, implican la investigación con microscopio de, por ejemplo, vacuolos específicos para BSE en las neuronas y el neurópilo, astrocitosis, pérdida neuronal y la deposición de acumulaciones anormales de PrP-res, también conocidas como fibrillas asociadas con rascazón (SAF, de *Scrapie-associated fibrils*). Las SAF se pueden determinar *in situ* por inmuno-histoquímica de histo-borrones (*histoblots*) y en extractos tratados del cerebro atacado mediante transferencia de borrones Western (*Western blotting*), motas-borrones (*dot-blots*), o como acumulaciones típicas de fibrillas por coloración negativa en la microcopia electrónica de transmisión.

Otro enfoque para diagnosticar indirectamente la BSE consiste en analizar el

líquido cefalorraquídeo o cerebroespinal. Las enfermedades neurológicas van acompañadas por modificaciones cualitativas y cuantitativas en el metabolismo de proteínas dentro del sistema nervioso central (SNC o CNS de *central nervous system*) y éstos se reflejan en una composición modificada del líquido cerebroespinal (LCE = CSF de *cerebrospinal fluid*). Mediando utilización de la electroforesis en gel bidimensional es posible encontrar proteínas marcadoras que se correlacionen con la enfermedad. Posibles marcadores de este tipo (sólo una indicación indirecta de una BSE) fueron determinados por primera vez en una fase tardía del período de incubación de una BSE experimental. Sin embargo, a partir de experimentos comparativos con muestras obtenidas de pacientes de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob es sabido que este marcador se puede encontrar también en pacientes de la enfermedad de Alzheimer. La enfermedad de Alzheimer es considerada como una encefalopatía espongiforme no transmisible.

Incluso aunque se han desarrollado métodos más sencillos para su detección, es improbable que tales ensayos sean ventajosos para diagnosticar una BSE preclínica.

En el estado de la técnica se describen procedimientos para la preparación de polipéptidos sintéticos con determinantes antigénicos de la proteína de priones (WO 93/11155, WO 93/23432), anticuerpos específicos para la proteína de priones de rascazón nativa (WO 97/10505), así como métodos para la detección de la rascazón en corderos (WO97/37227). Korth y colaboradores (1997, Nature 390: 74-77) describen un anticuerpo monoclonal procedente de ratones, que es capaz de distinguir entre la isoforma celular (PrP^c) y la isoforma de rascazón (PrP^{sc}).

La misión del presente invento es poner a disposición un procedimiento para diagnosticar encefalopatías espongiformes transmisibles preclínicas o clínicas.

El problema planteado por esta misión se pudo resolver con el presente invento dentro del marco de la memoria descriptiva y de las reivindicaciones, mediante un procedimiento para diagnosticar encefalopatías espongiformes transmisibles preclínicas o clínicas.

Conforme al invento, el procedimiento está caracterizado porque

- a) se extrae una muestra de sangre de un mamífero vivo
- b) se concentran las células a partir de esta muestra de sangre, denominándose a estas células como células dianas
- c) se determina en las células dianas la expresión de una proteína marcadora

134
132

para encefalopatías espongiformes transmisibles

d) el resultado obtenido se compara con un valor testigo.

En una forma de realización particular del procedimiento conforme al invento, se homogeneizan las células dianas.

5 La fase preclínica de las encefalopatías espongiformes transmisibles es el largo período de tiempo de incubación después de una infección con la proteína de priones sin síntomas clínicos externos. El presente invento hace posible, en particular, diagnosticar encefalopatías espongiformes transmisibles durante esta fase sin
10 síntomas clínicos externos. Por consiguiente, el presente invento hace posible también efectuar un diagnóstico en mamíferos, en los que se sospechan encefalopatías espongiformes transmisibles, pero en los que sin embargo los hallazgos histopatológicos en el momento del ensayo son (todavía) negativos (sospechoso de TSE, véase también la descripción anterior para una BSE). La fase clínica es la breve
15 fase de síntomas clínicos que sigue a la fase preclínica y que hasta ahora ha conducido inevitablemente a la muerte de los mamíferos infectados debido a la ausencia de tratamientos de cualquier tipo. También durante esta fase, usando la enseñanza técnica del presente invento, se pueden diagnosticar encefalopatías espongiformes transmisibles. Entre las encefalopatías espongiformes transmisibles (TSE, de *transmissible spongiform encephalopathies*) se incluyen en particular la
20 enfermedad de rascazón de los corderos, la encefalopatía espongiforme bovina (BSE, de *bovine spongiform encephalopathy*) de animales bovinos así como la enfermedad de Kuru-Kuru y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob en seres humanos.

(25 El concepto de determinar la expresión de una proteína marcadora significa que la mencionada proteína marcadora aumenta o disminuye demostrablemente frente a un valor testigo. El concepto "demostrablemente" significa, por ejemplo, que la proteína marcadora es expresada en un grado mayor o menor en 50 hasta 100 % con respecto al valor testigo, o es aumentada o disminuida de modo estadísticamente significativo. Un valor testigo o un patrón se puede determinar por ejemplo usando
30 células de mamíferos no infectados y se usa para la calibración del procedimiento conforme al invento. Son conocidos por los expertos en la materia procedimientos para hacerlo.

Las proteínas marcadoras pueden ser cualesquiera de las proteínas conocidas por un experto en la materia, que se hayan aumentado o disminuido demostrablemente en el caso de encefalopatías espongiformes transmisibles preclínicas o clínicas. Se

da este caso, por ejemplo, cuando la proteína marcadora no es detectable en el testigo y puede ser identificada inequívocamente con los métodos seguidamente mencionados en mamíferos infectados o en mamíferos que sean sospechosos de tener una encefalopatía espongiforme transmisible.

5 En una forma especial de realización, el procedimiento conforme al invento está caracterizado porque la proteína marcadora es la proteína de priones PrP^{sen}. La proteína de priones PrP^{sen} conforme al invento es la isoforma celular de la proteína de priones, que es designada frecuentemente también como PrP^c. La PrP^{sen} (sen = sensible) es degradada totalmente por proteasas.

10 En otra forma especial de realización, el procedimiento está caracterizado porque la proteína marcadora es el interferón gamma (IFN γ). En todavía otra forma especial de realización, el procedimiento está caracterizado porque la proteína marcadora es interferón gamma (IFN γ) bovino. El IFN γ (p.ej. compárese Vilcek, J. y Oliveira, I.C. Int. Arch. Allergy Immunol., 1994, 104:311-316) así como el IFN γ bovino (Keefe R.G. y colaboradores, Vet. Immunol. Immunopathol., 1997, 56: 39-51)

15 son conocidos por los expertos en la materia.

 En otra forma especial de realización, el procedimiento está caracterizado porque la proteína marcadora es el receptor de laminina (LR, de Laminin-Receptor) o el precursor del receptor de laminina (LRP de *Laminin-Receptor-Precursor*). El receptor de laminina (p.ej. compárese Grosso, L.E., y colaboradores Biochemistry, 1991, 30: 3.346-3.350) y el precursor del receptor de laminina (p.ej. compárese Castronovo, V. y colaboradores J. Biol. Chem., 1991, 266: 20.440-20.446) son conocidos en el sector de la técnica. En otra forma de realización incluso más especial, el procedimiento está caracterizado porque la proteína marcadora es el

20 receptor de laminina (LR) bovino o el precursor del receptor de laminina (LRP) bovino.

25 Las mencionadas proteínas marcadoras se pueden detectar usando - cualesquiera procedimientos que sean conocido por un técnico experto con conocimientos medios.

 En una forma preferida de realización, la proteína marcadora se determina por

30 un ensayo inmunitario. Un ensayo inmunitario utiliza anticuerpos monoclonales o antisueros policlonales que son específicos para la proteína marcadora, que están disponibles en el estado de la técnica. Por ejemplo, para la proteína marcadora PrP^{sen} se pueden emplear el anticuerpo monoclonal 13 o también el anticuerpo monoclonal 142 (Harmeyer S. y colaboradores, J Gen Virol 1998, véase la Figura 1). Los

ensayos inmunitarios incluyen los procedimientos de detección conocidos por un experto en la materia tales como el ensayo ELISA (en inglés: *enzyme-linked immunosorbent assay* = análisis de inmuno-sorbente enlazado a enzima) o el denominado ensayo de *sandwich*-ELISA, = ELISA en emparedado, *Dot-Blots*, *immunoblots* (borrone inunes), ensayos radioinmunológicos (*radioimmunoassay*, RIA), el ensayo de Ouchterlony basado en la difusión, o análisis de inmunofluorescencia con proyectiles (*rocket immunofluorescent assays*). Otro ensayo inmunitario es el denominado borrón de Western (también designado como proceso de transferencia de Western o emborronamiento de Western). La misión de un borrón de Western es transferir proteínas o polipéptidos que se han separado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida a un filtro de nitrocelulosa u otro soporte apropiado, y al mismo tiempo mantener las posiciones relativas de las proteínas o los polipéptidos que se han obtenido a partir de la electroforesis en gel. El borrón de Western es luego incubado con un anticuerpo que se fija específicamente a la proteína o al polipéptido que se toma en consideración. Estos procedimientos de detección pueden ser utilizados por un técnico con experiencia intermedia para la realización del invento aquí descrito. Se enumeran a continuación citas bibliográficas, en las que un experto en la materia podrá encontrar los procedimientos de detección antes mencionados así como otros: *An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam. Países Bajos (1986); Bullock y colaboradores, *Techniques in Immunocytochemistry*, Academic Press, Orlando, FL (Florida) Volumen 1 (1982), Volumen 2 (1983), Volumen 3 (1985); Tijssen, *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Países Bajos (1985).

En otra forma de realización, muy especial, las células dianas se incuban con anticuerpos que son específicos para la proteína marcadora, y se determina el complejo de antígeno y anticuerpo que se ha formado.

En una forma especialmente preferida de realización del procedimiento conforme al invento, se determina por métodos de biología molecular la expresión modificada de la proteína marcadora para encefalopatías espongiformes transmisibles. El concepto de procedimientos de biología molecular significa procedimientos de detección que incluyen, por ejemplo, la reacción en cadena de polimerasa (PCR) o pueden ser borrones de transferencia de Northern o Southern, que un experto en la materia puede encontrar en las obras clásicas de referencia (p.ej. Sambrook y

colaboradores (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, y Bertram, S. y Gassen, H.G. Gentechnische Methoden, Editorial G. Fischer, Stuttgart, Nueva York, 1991).

5 En otra forma preferida de realización del procedimiento conforme al invento, la proteína marcadora para encefalopatías espongiformes transmisibles se determina por una reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR, de *Reverse Transcriptase-Polymerase-Chain Reaction*). En esta forma especial de la
10 reacción en cadena de polimerasa (PCR) se aísla antes de nada el ARN total, éste se transcribe inversamente usando la enzima "transcriptasa inversa" en el ADNc con el que se lleva a cabo luego la reacción PCR. Este procedimiento de detección es conocido por los expertos en la materia y se ha publicado en obras clásicas de referencia (p.ej. Sambrook y colaboradores (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, y Bertram, S. y Gassen, H.G. Gentechnische Methoden, Editorial G. Fischer, Stuttgart, Nueva York, 1991).

Ejemplos de "mamíferos vivos" son conocidos por un experto en la materia de conocimientos intermedios e incluyen, por ejemplo, seres humanos así como corderos, cabras, cerdos, bovinos, corzos, conejos, hámster, ratas y ratones.

20 En una forma especial de realización, el procedimiento está caracterizado porque el mamífero vivo es un miembro de todas las familias de bóvidos, de modo sumamente preferido una vaca o un cordero. Aunque la solicitud se refiere en especial a procedimientos para diagnosticar encefalopatías espongiformes transmisibles en animales bovinos, la enseñanza técnica es aplicable igualmente a
25 cualquier animal que pueda ser atacado y afligido por el patógeno de las mencionadas encefalopatías, y es incluido por lo tanto en el presente invento.

Las células contenidas en la muestra de sangre abarcan todas las células sanguíneas que proceden de una célula tronco hematopoyética, p.ej. linfocitos, trombocitos, plaquetas o eritrocitos.

30 En otra forma especial de realización, el procedimiento está caracterizado porque las células dianas son leucocitos. El término leucocitos incluye, por ejemplo, leucocitos polimorfonucleares y mononucleares, células cebadas, células B o linfocitos B, células T o linfocitos T y células asesinas naturales (células NK = *natural killer*).

En una forma muy especial de realización, el procedimiento está caracterizado porque las células dianas son leucocitos mononucleares. El término de leucocitos mononucleares se refiere en particular a monocitos y macrófagos, células dendríticas y células de Langerhans.

5 En otra forma especial de realización, el procedimiento está caracterizado porque las células dianas son leucocitos polimorfonucleares. Los leucocitos polimorfonucleares incluyen los granulocitos eosinófilos, neutrófilos y basófilos.

10 El invento se refiere además a un estuche de ensayo para diagnóstico con el fin de detectar encefalopatías espongiformes, que contiene todos los elementos necesarios para la detección de la expresión modificada de una proteína marcadora para encefalopatías espongiformes transmisibles usando un procedimiento conforme al invento.

15 El invento se refiere además, en particular, a un estuche de ensayo para diagnóstico, que contiene anticuerpos específicos para una proteína marcadora para encefalopatías espongiformes transmisibles.

El invento se refiere además, en particular, a un estuche de ensayo para diagnóstico para diagnóstico, caracterizado porque los anticuerpos conformes al invento son policlonales.

20 El invento se refiere además, en particular, a un estuche de ensayo para diagnóstico, caracterizado porque los anticuerpos conformes al invento son monoclonales.

25 El invento incluye también un estuche de ensayo para diagnóstico conforme al invento, que está caracterizado porque contiene todos los elementos necesarios para detectar expresión modificada de la proteína marcadora PrP-sen con un procedimiento conforme al invento.

El invento incluye también un estuche de ensayo para diagnóstico conforme al invento, que está caracterizado porque contiene todos los elementos necesarios para detectar la expresión modificada de la proteína marcadora, IFN γ , con un procedimiento conforme al invento.

30 El invento incluye también un estuche de ensayo para diagnóstico conforme al invento, que está caracterizado porque contiene todos los elementos necesarios para detectar la expresión modificada de la proteína marcadora, IFN γ bovino, con un procedimiento conforme al invento.

El invento incluye también un estuche de ensayo para diagnóstico conforme

137
137

al invento, que está caracterizado porque contiene todos los elementos necesarios para detectar la expresión modificada de la proteína marcadora, receptor de laminina (LR), o de la proteína marcadora, precursor del receptor de laminina (LRP), con un procedimiento conforme al invento.

5 El invento se refiere además, en particular, a un estuche de ensayo para diagnóstico que es apropiado para la realización de un ensayo inmunitario *in situ*.

Un estuche de ensayo para diagnóstico es una colección de todos los componentes para un procedimiento de diagnóstico conforme al invento. Algunos ejemplos (que no constituyen una lista exhaustiva) de otros elementos con el fin de
10 realizar un procedimiento conforme al invento, incluyen recipientes tales como placas de 96 pocillos o placas de microtitulación, tubos de ensayo, otros apropiados recipientes, superficies y substratos, membranas tales como filtros de nitrocelulosa, reactivos para lavar y tampones. Un estuche de ensayo para diagnóstico puede contener también reactivos que pueden detectar anticuerpos fijados, tales como por
15 ejemplo anticuerpos secundarios marcados, cromóforos, enzimas (p.ej. conjugadas con anticuerpos) y sus substratos u otras sustancias que son capaces de fijar anticuerpos.

El invento se refiere además a un estuche de ensayo para diagnóstico destinado a detectar encefalopatías espongiformes transmisibles, que contiene
20 oligonucleótidos, capaces de hibridarse en condiciones rigurosas con el ácido nucleico que codifica una proteína marcadora para encefalopatías espongiformes transmisibles, así como los demás elementos necesarios para ejecutar un procedimiento conforme al invento.

El invento se refiere además a un estuche de ensayo para diagnóstico conforme al invento, que está caracterizado porque contiene todos los elementos
25 necesarios para llevar a cabo una reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). Dicho estuche puede contener, pero no se limita además de a tubos de ensayo o placas de 96 pocillos o placas de microtitulación, otros apropiados recipientes, superficies y substratos, membranas tales como filtros de nitrocelulosa,
30 reactivos para lavar y tampones de reacción /que pueden variar en el pH y las concentraciones de magnesio), agua estéril, un aceite mineral, BSA (*bovine serum albumin* = albúmina de suero bovino), $MgCl_2$, $(NH_4)_2SO_4$, DMSO (dimetil-sulfóxido), mercaptoetanol, nucleótidos (dNTPs), enzimas, tales como polimerasa de *Taq* y la transcriptasa inversa y, como la matriz de ADN, la secuencia de ADN de la proteína

marcadora o partes de ella, oligonucleótidos específicos para una proteína marcadora conforme al invento, una plantilla de control o testigo, DEPC-agua, DiAAs, RNAsa y compuestos adicionales conocidos por un profesional experto.

5 Los oligonucleótidos conformes al invento son cortas moléculas de ácidos nucleicos con una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 100 nucleótidos, que se fijan en condiciones rigurosas con la secuencia de ácido nucleico que es complementaria con una proteína marcadora. Por condiciones rigurosas un experto en la materia entiende condiciones que seleccionan una homología de más de 85 %, preferiblemente más de 90 % (compárense Sambrook y colaboradores 10 (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, y Bertram, S. y Gassen, H.G. Gentechnische Methoden, Editorial G. Fischer, Stuttgart, Nueva York, 1991).

El invento se refiere además a un estuche de ensayo para diagnóstico conforme al invento, que contiene oligonucleótidos, que son capaces de hibridarse 15 en condiciones rigurosas con el ácido nucleico que codifica la PrP-sen.

El invento se refiere además a un estuche de ensayo para diagnóstico conforme al invento, que contiene oligonucleótidos, que son capaces de hibridarse en condiciones rigurosas con el ácido nucleico que codifica el IFN γ .

20 El invento se refiere además a un estuche de ensayo para diagnóstico conforme al invento, que contiene oligonucleótidos, que son capaces de hibridarse en condiciones rigurosas con el ácido nucleico que codifica el IFN γ bovino.

El invento se refiere además a un estuche de ensayo para diagnóstico conforme al invento, que contiene oligonucleótidos, que son capaces de hibridarse en condiciones rigurosas con el ácido nucleico que codifica el receptor de laminina (LR) o el precursor del receptor de laminina (LRP). 25

En otra forma de realización, el presente invento se refiere al uso de un anticuerpo que es específico para PrP-sen en un procedimiento conforme al invento.

En otra forma de realización, el presente invento se refiere al uso de un anticuerpo que es específico para IFN γ en un procedimiento conforme al invento.

30 En otra forma de realización, el presente invento se refiere al uso de un anticuerpo que es específico para IFN γ bovino en un procedimiento conforme al invento.

En otra forma de realización preferida, el presente invento se refiere al uso de un anticuerpo que es específico para el receptor de laminina (LR) o el precursor del

receptor de laminina (LRP) en un procedimiento conforme al invento.

En otra forma de realización preferida, el presente invento se refiere al uso de oligonucleótidos que son capaces de hibridarse en condiciones rigurosas con el ácido nucleico que codifica IFN γ en un procedimiento conforme al invento.

5 En otra forma de realización preferida, el presente invento se refiere al uso de oligonucleótidos que son capaces de hibridarse en condiciones rigurosas con el ácido nucleico que codifica IFN γ bovino en un procedimiento conforme al invento.

10 En otra forma de realización preferida, el presente invento se refiere al uso de oligonucleótidos que son capaces de hibridarse en condiciones rigurosas con el ácido nucleico que codifica el receptor de laminina (LR) o el precursor del receptor de laminina (LRP) en un procedimiento conforme al invento.

15 Otra forma de realización preferida es el uso del estuche de ensayo para diagnóstico conforme al invento para detectar encefalopatías espongiformes transmisibles en el diagnóstico de encefalopatías espongiformes humanas y animales o para medidas de control epidemiológicas de BSE o rascazón endémica.

140
142

5 Ejemplo 1: Diagnóstico de BSE mediante la expresión aumentada de proteínas
marcadoras específicas en leucocitos aislados

El siguiente Ejemplo describe el diagnóstico de una BSE en animales bovinos por determinación de la expresión aumentada de las proteínas marcadoras PrP^{sc} o IFN γ o del (precursor del) receptor de laminina (LR(P)) en leucocitos mononucleares (MN) o polimorfonucleares (PMN) aislados.

10

Aislamiento de leucocitos mononucleares (MN) y polimorfonucleares (PMN)
procedentes de sangre entera de bovino

Estas células especiales de la sangre se aíslan por dos etapas de centrifugación, siendo la última una centrifugación en gradiente de densidad con el fin de
15 obtener el denominado "buffy coat" = (revestimiento anteado), seguido por la lisis de los eritrocitos.

Etapas 1: Muestras de sangre

Las muestras de sangre (en un volumen de aproximadamente 400 ml) se
20 extraen de los animales y se colocan directamente en un recipiente especial. Este recipiente ya está provisto de una mezcla de glucosa y citrato: glucosa 68 mM, citrato de tri-sodio 37,4 mM, ácido cítrico 17,4 mM, ajustado a pH 7,3, como anticoagulante. La sangre y el anticoagulante están en una relación de 6:1. Las
25 muestras de sangre se envían inmediatamente al laboratorio para el aislamiento de las células.

Etapas 2: Concentración de los leucocitos

1ª centrifugación

Exactamente 40 ml de sangre entera de un animal bovino, tratada con un
30 anticoagulante, se colocan en un tubo de ensayo para centrifugación de 50 ml de capacidad, estéril y cerrable herméticamente, y se centrifuga a 2.400 rpm durante 20 minutos a la temperatura ambiente en una centrifuga rotatoria sin freno. La centrifugación debería prolongarse durante 5 minutos por cada hora (hasta 3 horas) en que se hayan almacenado las muestras de sangre después de su recogida.

Esta primera centrifugación conduce a la formación de tres bandas separadas:

Banda superior - suero

Banda central - leucocitos (los denominados "anteados")

Banda inferior - eritrocitos

5

Medio para centrifugación por densidad:

Con el fin de aislar los leucocitos se puede usar un medio comercial clásico. Los autores del invento hemos utilizado NYCOMED Lymphoprep®, con una densidad de 1,077 g/ml.

10

El suero es cuidadosamente retirado y congelado profundamente a -20°C para análisis ulterior. La capa de leucocitos es retirada y colocada en un nuevo tubo de ensayo para centrifugación.

2ª centrifugación

15

Exactamente 15 ml de los leucocitos procedentes de la primera centrifugación se extienden sobre 35 ml de NYCOMED Lymphoprep®, con una densidad de 1,077 g/ml en un tubo de ensayo para centrifugación de 50 ml de capacidad, estéril y cerrable herméticamente.

Centrifugación: 2.400 rpm / 20 min - a (TA) en una centrifuga sin freno.

20

La centrifugación se debería prolongar en cada caso durante 5 minutos por cada hora (hasta 3 horas) en la que se hayan almacenado las muestras de sangre después de su recogida.

Esta 2ª centrifugación conduce a la formación de cuatro bandas separadas. De arriba hacia abajo

25

1ª banda - suero (residual)

2ª banda - leucocitos mononucleares (monocitos y linfocitos = anteados)

3ª banda - interfase de medio

4ª banda - leucocitos polimorfonucleares y eritrocitos (residuales)

30

Etapas 3: Separación de los leucocitos mononucleares (MN)

La banda 2 contiene monocitos y linfocitos, y es succionada cuidadosamente mediante una pipeta estéril de Pasteur y transferida a un tubo de ensayo para centrifugación estéril, de 50 ml de capacidad. Las células se lavan dos veces con el mismo volumen de PBS (solución tamponada con fosfato - *phosphate-buffered*

saline) estéril y se centrifugan a 2.000 rpm / durante 15 min / a 10°C. Las células sedimentadas se vuelven a suspender en HBSS (*Hanks balanced salt solution* =solución salina equilibrada de Hanks con NaHCO₃, sin rojo de fenol). La vitalidad y el número de células se determinan usando azul de Trypan.

5

Etapla 4: Separación de los leucocitos polimorfonucleares (PMN)

Después de que hubo sido separada con pipeta la banda 2, se retiran también por succión las bandas 1 y 3. La mezcla de PMN y eritrocitos se diluye luego a tres veces con un tampón estéril para lisis de eritrocitos (ELB, de *Erythrocyte Lysing Buffer*, a base de KHCO₃ 8,9 mM, NH₄Cl 154,9 mM y EDTA 0,01 mM), se mezcla cuidadosamente y se incuba durante 10 min a TA.

10

Centrifugación: 2.400 rpm / 10 min / 10°C

El material sobrenadante se desecha y el sedimento se vuelve a suspender en 20 ml de tampón ELB, se mezcla, se incuba y se centrifuga de nuevo.

15

Centrifugación: 2.400 rpm / 10 min / 10°C

El material sobrenadante se desecha y el sedimento se lava con 20 ml de HBSS (como antes, pero con la adición de MgCl₂ 1 mM).

Centrifugación: 2.400 rpm / 8 min / 10°C

El material sobrenadante se desecha y las células se vuelven a suspender en HBSS. La vitalidad y el número de células se determinan con azul de Trypan.

20

Resultados: Números de células

Tipo de células	Número de células/ml de sangre	Vitalidad
1. MN	2,25 x 10 ⁵	≥ 93 %
2. PMN	4,03 x 10 ⁵	≥ 98 %

25

Las siguientes mediciones se realizaron con los leucocitos MN y PMN aislados de animales infectados con BSE:

30

- I. Expresión aumentada de la isoforma celular de la proteína de priones, PrP^{sc}
- II. Expresión aumentada de la proteína interferón-gamma, IFN γ
- III. Expresión aumentada del (precursor del) receptor de laminina, LR(P)

143
145

I. Expresión aumentada de la isoforma celular PrP^{sc}

El régimen de expresión de PrP^{sc} en leucocitos aislados procedentes de animales testigos y de animales infectados con BSE se mide mediante un análisis por borrarón de Western (Harmeyer S. y colaboradores, J. Gen Virol 1998, 79, 937-945).

5 Se usa un revelado cromógeno.

Disgregación de las células:

10 Los leucocitos aislados se homogenizan en una solución de sarcosilo al 2% (Sigma, St Louis, EE.UU.) durante 10 min / 4°C. La preparación homogeneizada así obtenida se sedimenta a continuación a 14.000 rpm / 40 min/ 4°C. El material sobrenadante se filtra con succión y se almacena a -20°C.

Se determinó la concentración de proteína de la preparación homogeneizada y todas las muestras se normalizaron a un patrón de 6 mg/ml de proteína. Se cargaron exactamente 60 µg del material homogeneizado dentro de cada pocillo.

15 Para la detección se emplea o bien el anticuerpo monoclonal 13 o el anticuerpo monoclonal 142. Los anticuerpos se describen detalladamente en la publicación antes mencionada. La dilución del anticuerpo es en cada caso de 1:10.

El anticuerpo secundario usado en este lo constituyeron anticuerpos conjugados con AP en una dilución de 1:3.000.

20 *Resultados:*

Se mostró que la expresión de proteína de PrP^{sc} está aumentada manifiestamente en leucocitos tanto MN como también PMN de animales infectados con BSE en comparación con animales testigos sanos (véase también el borrarón de Western de la Figura 1 con muestras de otros animales bovinos).

25

30

Caso nº/ muestra	Estado en cuanto a BSE	Expresión aumentada de PrP ^{sc}
4372	positivo	si
4471	positivo	si
4401	sospechoso	si
	Negativo	
Testigo	negativo	no
	negativo	

V14
146

II. Expresión aumentada de IFN γ

La expresión aumentada es medida de dos maneras:

- medición de la proteína mediante ELISA
- medición del ARNm específico mediante RT-PCR

5

1. Medición de IFN γ mediante ELISA

Se usa un ELISA comercial producido por CSL Veterinary Ltd, Melbourne, Australia.

10

Resultados:

Estado de BSE	Número de los animales	IFN γ (pg/ml)
Positivo para BSE	9	314,0 $\pm$ 78,2
Sospechoso de BSE	9	504,0 $\pm$ 109,7
Negativo para BSE	13	0,0 $\pm$ 0,0

15

2. Medición del ARNm de IFN γ usando una RT-PCR

El aislamiento del ARN (procedente de la fracción total de leucocitos) y la subsiguiente RT-PCR se llevan a cabo de acuerdo con métodos clásicos (Yi-Jun Shi y Jing-Zhlong Liu, Genet. Anal. Tech. Appl., 1992, 9, 149-150; Izraeli S. y colaboradores, Nucl. Acid. Res. 1991, 21, 6051; Michel U. y colaboradores, Anal. Biochem. 1997, 249, 246-247) con las modificaciones descritas seguidamente.

20

Aislamiento del ARN:

Para aislar el ARN total se usa el Sistema Promega (nº de catálogo G3191).

25

ADNc (reacción con RT)

Muestras aisladas de ARN se transcriben inversamente usando el Sistema de Transcripción Inversa = "*Reverse Transcription System*" de Promega (nº de catálogo A3500).

Reacción de PCR:

30

Con el fin de determinar el ARNm específico se emplea una doble reacción en cadena de polimerasa ("*nested PCR*" = PCR anidada").

Los cebadores de IFN γ usados para esto fueron:

145
147

FW1 (IFNF1) 5'GGAGTATTTTAAATGCAAGTAGCCC 3'
FW2 (IFNF2) 5'GTAGCTAAGGGTGGGCCTCT 3'
RV (IFNR1) 5'GCTCTCCGGGCCTCGAAAGAGATT 3'

El producto de PCR que es de esperar debería tener una longitud de 357 pares de bases (pb).

Resultados:

5 El ELISA del IFN γ es confirmado inequívocamente por esta RT-PCR, es decir que en los animales infectados con BSE el IFN γ ha sido aumentado claramente.

La Figura 2 representa la RT-PCR de un ARNm de los leucocitos totales en sangre entera con las muestras de los animales bovinos 4372 y 441.

10

III. Expresión aumentada del (precursor del) receptor de laminina, LR(P)

La expresión se midió a través de una RT-PCR. Esta reacción incluye también la detección de LRP así como también de LR.

15

La secuencia bovina de LRP o LR no ha sido todavía descrita. Sin embargo, está proteína está altamente conservada en mamíferos. Se compararon por lo tanto los datos publicados de secuencias de la LR humana así como también de la murina. Basándose en este análisis de los datos se estableció la siguiente secuencia de cebadores:

20

Cebadores

Hacia adelante 5' AAGAGGACCTGGGAGAAGCT 3'

Hacia atrás 5' CCTTCTCAGCAGCAGCCCTGC 3'

Producto esperado: 517 pb

25

Aislamiento del ARN

Como se ha descrito en el punto II.2

ADNc (reacción con RT)

Como se ha descrito en el punto II.2

30

Reacción PCR
Reacción sencilla correspondiente a los métodos clásicos

Resultados:

5

10

Caso nº/ muestra	Estado de BSE	Expresión aumentada de LRP/LR
4471	positivo	si
58193	positivo	si
5621	sospechoso	(si)
5054	sospechoso	si
Testigo (462)	negativo	no

Estos resultados se representan en la Figura 3.

15

IV. Clonación y expresión del (Precursor del) Receptor de Laminina, LR(P), para generar anticuerpos específicos contra LR.

Desarrollo de cebadores hacia LR:

20

Los cebadores hacia LR bovina se diseñan para amplificar el gen entero de LR (Nº de acceso al Genebank: S 374431). Los cebadores se diseñaron a partir del gen de la proteína c10 bovina (Nº de acceso al Genebank: M 64923).

En los cebadores para LR seguidamente definidos, sus sitios de restricción aparecen en una casilla. Basándose en estos sitios de restricción es posible una clonación directa en el seno de E.coli.

25

Los cebadores diseñados para LR se usarán para amplificar la LR procedente del ARN celular total aislado a partir de sangre bovina entera.

La secuencia para los tres cebadores se puede ver seguidamente:

LRPF1 5' ATTTCTCGAGTGTCCGGAGCCCTTGATGTCC 3'

LRPR1 5' ATTGAATTCCCTACGACCACTCGGTGGTGGT 3'

LRPR2 5' ATTTTCTAGAAACGACCACTCGGTGGTTCC 3'

147
#9

Sitios de restricción: El cebador LRPF1 puede ser cortado por Xho, el cebador LRPR1 puede ser cortado por Eco R1, mientras que el cebador LRPR2 puede ser cortado por Xba 1.

5 *RT-PCR y clonación del gen de LR bovino*

Los cebadores para LR se suspenden de nuevo en agua estéril hasta una concentración final de 50 ng/ml.

El ARN de leucocitos bovinos se aísla a partir de fracciones de los leucocitos totales de sangre bovina entera.

10 5 μ g de ARN se tratan con DNAsa (Gibco BRL) y se lleva a cabo una transcripción inversa usando un Estuche de Reverse Transcription Kit (Promega, N° de catálogo; A3500). Las Reacciones en Cadena de Polimerasa (PCR) se llevan a cabo usando LRPF1, LRPR1 y LRPR2.

PCR: 35 ciclos, temperatura de reanillado 50°C.

15 Los fragmentos amplificados obtenidos después de la PCR se hacen pasar por gel de agarosa al 1 % para determinar su tamaño de fragmentos. Las bandas resultantes se purifican en gel, se comprueban de nuevo en cuanto a su tamaño y los fragmentos se retiran desde la agarosa y se vuelven a suspender en 10 μ l de agua estéril.

20 Los fragmentos amplificados se ligan dentro del vector pGEM-T (Boehringer Mannheim *Ligation Kit*).

Todos los clones se secuencian y se ha demostrado que son del gen de LR.

25 Se ha llevado a cabo la subclonación dentro de los vectores de expresión pBAD_{gIII} y pTrcHis (ambos obtenidos de Invitrogen Ltd.) y los clones se están examinando actualmente en cuanto a la presencia de insertos.

Diseño de péptidos para el desarrollo de anticuerpos para LR:

Se diseñan cuatro péptidos para utilizarlos en el desarrollo de anticuerpos para el Receptor de Laminina (LR).

30 Estos péptidos se diseñan usando la proteína c10 bovina N° de acceso al Genbank: M 64923; proteína Id. AAA62713.1)

Un programa de ordenador (Antheptot) que predice la estructura, y los sitios hidrófobos, hidrófilos y antigénicos de una proteína se usa para diseñar los péptidos.

Los parámetros principales que se concentran para la selección de dos de los

15048

péptidos son hidrófilos y antigénicos, otros dos péptidos se escogen debido a su situación en las regiones terminales de C y N de la proteína.

5 Péptido 1141 MSGALDVLMKEEDVLKFLAGC
(Terminal de Amino) Correspondiente a los residuos de aminoácidos 1-20 desde el extremo terminal de amino de la proteína.
Punto Isoeléctrico (pI) de 4,32.

10 Péptido 1142 RLLVVTDPRAHQPLTEASYGC
(Antigénico) Correspondiente a los residuos de aminoácidos 120 - 140 seleccionados a partir de una región antigénica de la proteína.
Punto Isoeléctrico (pI) de 5,38.

15 Péptido 1143 KKEEQAAEKAVTKKEEFQGEWGC
(Hidrófilo y antigénico) Correspondiente a los residuos de aminoácidos 212-231 seleccionados a partir de una región hidrófila y antigénica de la proteína.
Punto Isoeléctrico (pI) de 4,48.

20 Péptido 1144 FTAAQPEVADWSEGVQVPSVGGC
(Terminal de Carboxi) Correspondiente a los residuos de aminoácidos 238-257 seleccionados a partir de la región terminal de carboxi de la proteína.
Punto Isoeléctrico (pI) de 3,58.

25 Cada péptido es conjugado con Imject[®] Proteína Portadora de Ovalbúmina Activada por Maleimida (Pierce Warner Ltd.) de la siguiente manera.

Los péptidos se disuelven hasta una concentración final de 10 mg/ml en Na₂HPO₄ 100mM (de pH 7,2).

Se disuelve Imject[®] Proteína Portadora de Ovalbúmina Activada por Maleimida hasta una concentración final de 10 mg/ml en agua estéril.

30 El péptido y la Ovalbúmina se dejan conjugar durante 2 horas a la temperatura ambiente.

Después de la conjugación la solución de proteína conjugada se dializará en un volumen 500 veces mayor de PBS (pH 7,4) y almacenará a -20°C hasta que se requiera.

Producción de anticuerpos policlonales y monoclonales

La producción anticuerpos policlonales y monoclonales se lleva a cabo de una manera similar a como lo describen p.ej., Harmeyer S. y colaboradores, J Gen Virol, 1998.

5 Expresado brevemente:

En el día 0: Se toman muestras de sangre pre-inmunes antes de la inyección para el examen de anticuerpos anti-LR.

10 En el día 0: Se inyectan por vía subcutánea 0,5 ml de péptido conjugado suspendido en Adyuvante Completo de Freund (Sigma-Aldrich, N° de catálogo: F-5881).

En el día 14: La primera inyección fomentadora de 0,5 ml de péptido conjugado suspendido en Adyuvante Completo de Freund (Sigma-Aldrich, N° de catálogo: F-5506)

15 En el día 21: La segunda inyección fomentadora de 1,0 ml de péptido conjugado en la ausencia de adyuvante.

En el día 31: Se toman muestras de Sangre de Ensayo para el control de los anticuerpos producidos.

Sistema ELISA para la medición de proteínas-marcadoras

20 La tecnología ELISA es especialmente apropiada para la medición de proteínas-marcadoras de BSE. En este caso especial serán separadas las células de la sangre que lleven estas marcadoras sobre la superficie celular.

Procedimiento de separación de las células

25 La subdivisión de sub-clases de leucocitos MN y PMN (células dianas) se conseguirá usando un agotamiento con glóbulos inmuno-magnéticos ((Dynabeads®). Los glóbulos serán revestidos con anticuerpos específicos para tipos de células de leucocitos bovinos.

30 Expresado brevemente:

- Se añaden a la muestra de sangre Dynabeads específicos para células.
- Se capturan inmunitariamente las células dianas.
- Se separan magnéticamente las células dianas.
- Se lavan y concentran células dianas puras.

150
152

Medición por ELISA de proteínas-marcadoras

Se escoge un sistema ELISA, basándose en el aislamiento de células dianas usando anticuerpos específicos para la captura específica de células dianas:

- Se revisten placas de microtitulación con anticuerpos de captura primarios específicos para marcadoras superficiales de células dianas.
- Se incuba con células que expresan marcadoras superficiales de células dianas. Se efectúa una fijación a un anticuerpo de captura primario.
- Después de la captura de células, se incuba con un un anticuerpo secundario biotinilado dirigido contra la proteína-marcadora de BSE.
- Se incuba con la proteína de detección conjugada con una enzima. Se añade un substrato y se mide por un lector de ELISA.

REIVINDICACIONES

1. Estuche de ensayo para diagnóstico con el fin de detectar encefalopatías espongiformes transmisibles, caracterizado porque contiene todos los elementos necesarios para la detección de la expresión modificada de una proteína marcadora para encefalopatías espongiformes transmisibles, en donde estos elementos son útiles para al menos una de las siguientes etapas
 - a) tomar una muestra de sangre de un mamífero vivo,
 - b) concentrar células objetivo desde esta muestra de sangre,
 - c) determinar la expresión de una proteína marcadora para encefalopatías espongiformes transmisibles en las células objetivo,
 - d) comparar el valor obtenido con el valor de control.
2. Estuche de ensayo para diagnóstico de acuerdo a la reivindicación 1, caracterizado porque éste contiene anticuerpos específicos para una proteína marcadora para encefalopatías espongiformes transmisibles.
3. Estuche de ensayo para diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque los anticuerpos son policlonales.
4. Estuche de ensayo para diagnóstico de acuerdo a la reivindicación 2, caracterizado porque los anticuerpos son monoclonales.
5. Estuche de ensayo para diagnóstico de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque éste contiene todos los elementos necesarios para detectar la expresión alterada de la proteína marcadora PrP^{sen}.
6. Estuche de ensayo para diagnóstico de acuerdo con una de la reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque éste contiene todos los elementos necesarios para detectar la expresión modificada de la proteína marcadora IFN γ .

152
154

7. Estuche de ensayo para diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado porque la proteína marcadora es IFN γ de bobino.

8. Estuche de ensayo para diagnóstico de acuerdo con una de a reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque éste contiene todos los elementos necesarios para detectar la expresión modificada de la proteína marcadora receptor de laminina (LR) o de la proteína marcadora precursor del receptor de laminina (LRP).

9. Estuche de ensayo para diagnóstico de acuerdo a una reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque el estuche de ensayo es adecuado para llevar a cabo un ensayo inmunitario in situ.

10. Estuche de ensayo para diagnóstico de acuerdo a la reivindicación 1, caracterizado porque éste contiene oligonucleóticos que son capaces de hibridarse en condiciones rigurosas con el ácido nucleico que codifica una proteína marcadora para encefalopatías espongiformes transmisibles.

11. Estuche de ensayo para diagnóstico de acuerdo a la reivindicación 10, caracterizado porque el estuche de ensayo contiene todos los elementos necesarios para llevar a cabo una reacción en cadena de primerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).

12. Estuche de ensayo para diagnóstico de acuerdo a la reivindicación 10 U 10 caracterizado porque la proteína marcadora es PrP^{sen}.

13. Estuche de ensayo para diagnóstico de acuerdo una de las reivindicaciones 10 a 11, caracterizado porque la proteína marcadora es IFN γ .

14. Estuche de ensayo para diagnóstico de acuerdo a la reivindicación 13 caracterizado porque la proteína marcadora es IFN γ .

153
155

15. Estuche de ensayo para diagnóstico de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, caracterizado porque la proteína marcadora es el receptor de laminina (LR) o el precursor de receptor de laminina (LRP).
16. Estuche de ensayo para diagnóstico de acuerdo a la reivindicación 15, caracterizado porque la proteína marcadora es bovina.
17. Utilización de un anticuerpo que es específico para PrP-sen para la elaboración de un estuche de ensayo para diagnóstico de acuerdo a la reivindicación 5.
18. Utilización de un anticuerpo, que es específico para IFN γ para la elaboración de un estuche de ensayo para diagnóstico de acuerdo a la reivindicación 6.
19. Utilización de un anticuerpo, que es específico a IFN γ bovino para la elaboración de un estuche de ensayo para diagnóstico de acuerdo a la reivindicación 7.
20. Utilización de un anticuerpo, que es específico para el receptor de laminina (LR) o el precursor del receptor de laminina (LRP), para la elaboración de un estuche de ensayo para diagnóstico de acuerdo a la reivindicación 8.
21. Utilización de oligonucleótidos que son capaces de hibridarse en condiciones rigurosas con el ácido nucléico que codifica el PrP-sen, para la elaboración de un estuche de ensayo para diagnóstico de acuerdo a la reivindicación 12.
22. Utilización de oligonucleótidos que son capaces de hibridarse en condiciones rigurosas con el ácido nucléico que codifica el IFN γ , para la elaboración de un estuche de ensayo para el diagnóstico de acuerdo a la reivindicación 13.
23. Uso de oligonucleótidos que son capaces de hibridarse en condiciones rigurosas con el ácido nucléico que codifica el IFN γ bovino, para la elaboración de un estuche de ensayo para el diagnóstico de acuerdo a la reivindicación 14.

154
156

24. Utilización de oligonucleótidos que son capaces de hibridarse bajo condiciones rigurosas con el ácido nucleico que codifica el receptor de laminina (LR) o el precursor del receptor de laminina (LR), para la elaboración de un estuche de ensayo para diagnóstico de acuerdo a la reivindicación 15.

25. El uso de un estuche de ensayo para diagnóstico de acuerdo a cualquiera de la reivindicaciones 1 a 16 para la detección de encefalopatías espongiforme transmisibles para diagnosticar encefalopatías en humanos y en animales para tomar medidas de control epidemiológico BSE o rascasón endémica.

COLO 04484-801-006-0

RCB/erh-52

2do. EXAMEN DE FORMA PATENTE DE INVENCION

Folio 160

Radicación no 00-29093

Concepto Técnico no 518

Clasificación Internacional de Patentes A61 B 019/000

Practicado el examen de acuerdo a lo establecido en el Art. 38 de la Decisión 486 se determinó que esta solicitud de **Patente de Invención**:

- SI ☒ NO ☐ Contiene un resumen de la invención (Art.26-e).
- SI ☒ NO ☐ Contiene el título o nombre de la invención (Art.27-d).
- SI ☒ NO ☐ Contiene la descripción de la invención (Art.26-b).
- SI ☐ NO ☐ NO ES APLICABLE ☒ Contiene los dibujos necesarios para comprender la invención (Art.26-d)
- SI ☒ NO ☐ Contiene una o más reivindicaciones. (Art.26-c).
- SI ☒ NO ☐ NO ES APLICABLE ☐ Han sido desarrollados los productos y/o procedimientos a partir de recursos genéticos o de sus productos derivados de los que cualquiera de los Países Miembros es país de origen. (Art. 26- h).
- SI ☐ NO ☐ NO ES APLICABLE ☒ Los productos y/o procedimientos han sido obtenidos o desarrollados a partir de los conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas, afroamericanas, o locales de los países miembros, de acuerdo a lo establecido en la Decisión 391 y sus modificaciones y reglamentaciones vigentes.(Art.26-i).
- SI ☒ NO ☐ La invención se refiere a un producto relativo a un material biológico. (Art.26-J).
- SI ☒ NO ☐ La prioridad coincide con la materia reivindicada.
- SI ☒ NO ☐ **CUMPLE LOS REQUISITOS TÉCNICOS**

OBSERVACIONES Y OTROS: SI ☒ NO ☐ ver hoja(s) anexa(s)

El título de la invención ha sido modificado folio 125. Se anexa nuevo capítulo descriptivo folios 130-152 y nuevo capítulo reivindicatorio, con modificaciones en las reivindicaciones 1, 2-4, 7-12, 26-31, 10, se eliminan las reivindicaciones 20-23, que reemplazan los originalmente presentados. Se anexan nuevas tarjetas de Archivo de Proprietarios y EXAMINADOR TÉCNICO Temático, folios 157, 158 y nuevo Extracto para publicación folio 159. Se retiran las figuras de la solicitud folio 127.

Bogotá D. C., Marzo 20/02



156

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Folio 161

2020
Bogotá, D.C.

2002-416-06-27

Doctor(a)
EMILIO FERRERO
Apoderado(a)

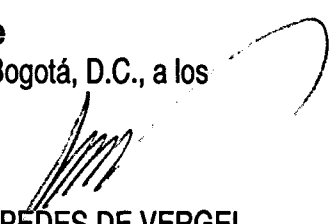
REFERENCIA:	Radicación No.	00-29093
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	416
	Oficio No.	686
	Folios	001

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en los artículos 26 y 27 de la Decisión 486 de la Comisión de la comunidad andina, y en las demás disposiciones vigentes sobre la materia, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial, conforme lo establece el artículo 40 de la misma Decisión.

Cúmplase

Dado en Bogotá, D.C., a los

2002


ALIX CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

Bogotá, D.C., *Enero/2003* El extracto de esta solicitud fue publicado en el número *517* de la Gaceta de Propiedad Industrial, de fecha *27/06/2002*. El término hábil señalado por la ley expiró el *24 Sept-2002* y SI NOX se presentaron oposiciones por parte de terceros.

202038

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Computador: 382 0840
Fax: 382 2695
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co