

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PCT

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

**SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION**

Q.F

21. EXPEDIENTE No. 11-41150

54. TÍTULO METODOS PARA DETERMINAR LOS NIVELES DE TGF-B EN UNA COMPOSICION

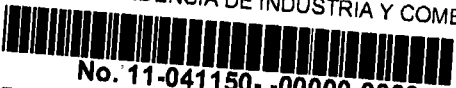
51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61K 39/00

71. SOLICITANTE MEAD JOHNSON NUTRITION COMPANY

DOMICILIO EVANSVILLE, ESTADO DE INDIANA, E.U.A.

74. APODERADO GERMAN CASTILLO GRAU
CODIGO No. 126-C

22. BOGOTÁ, D.C., _____

PETITORIO																		
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		Superintendencia de Industria y Comercio  No. 11-041150-00000-0000 Fecha: 2011-04-04 15:30:20 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 39																
FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTES PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL																		
SOLICITUD DE:																		
☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad ☒ Capítulo I ☐ Capítulo II																		
2 SOLICITANTE		IDENTIFICACIÓN																
Nombre: MEAD JOHNSON NUTRITION COMPANY. Dirección: 2400 W. Lloyd Expressway Evansville, Estado de Indiana, E.U.A. Nacionalidad o Domicilio: E.U.A. Lugar de Constitución: E.U.A. Teléfono: Fax: Cúal: Número: E- mail:		☐ C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro																
3 REPRESENTANTE O APODERADO		IDENTIFICACIÓN																
Nombre: GERMAN CASTILLO GRAU Dirección: Carrera 13 No. 37 - 43 Piso 12 Teléfono: 285 7460 Fax: 285 9267 E- mail: info@castillograu.com		☒ C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro Cúal: Número: 17.017.671 TP 2.978 de Bogotá del C.S.J																
4 INVENTOR (ES) (72)		Nombre: Gyan P. Rai; Francisco J. Rosales; Zenia E. Jouni; Rosaline Waworuntu Dirección: 9105 Halston Circle; 357B Holland Road; 1035 Johannes Court; 5731 Quakerbridge Drive Nacionalidad o Domicilio: Newburgh, Indiana, E.U.A.; Singapur; Evansville, Estado de Indiana, E.U.A.																
5 PCT (86) Solicitud Internacional No. PCT/US2009/061790 Fecha Octubre 23, 2009 Publicación Internacional No. WO 2010/048479 A1 Fecha Abril 29, 2010																		
6 Título (54) MÉTODOS PARA DETERMINAR LOS NIVELES DE TGF-β EN UNA COMPOSICION																		
7 Clasificación Internacional (51) A61K 39/00																		
8 Prioridad ☒ SI ☐ NO		<table border="1"><thead><tr><th>(33) País de Origen</th><th>(32) Fecha</th><th>(31) Número de Solicitud</th></tr></thead><tbody><tr><td>E.U.A.</td><td>Octubre 24, 2008</td><td>61/108,315</td></tr><tr><td>E.U.A.</td><td>Febrero 12, 2009</td><td>12/370,469</td></tr><tr><td> </td><td> </td><td> </td></tr><tr><td> </td><td> </td><td> </td></tr></tbody></table>		(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud	E.U.A.	Octubre 24, 2008	61/108,315	E.U.A.	Febrero 12, 2009	12/370,469						
(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud																
E.U.A.	Octubre 24, 2008	61/108,315																
E.U.A.	Febrero 12, 2009	12/370,469																
9 Comprobante de pago No. 30307 Fecha																		
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página																		



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
☒ Patente de Invención ☐ Patente modelo de utilidad ☐ PCT

(21) No. De solicitud	(51) int. Cl: A61K 39/00
(22) Fecha de solicitud	(71) Solicitante (s) MEAD JOHNSON NUTRITION COMPANY
(30) Prioridad	(72) Interventor (es)
(31) No. Prioridad 61/108,315; 12/370,469	Gyan P. Rai; Francisco J. Rosales; Zenia E. Jouni; Rosaline Waworuntu
(32) Fecha Octubre 24, 2008; Febrero 12, 2009	
(33) Pais E.U.A.	(74) Apoderado (s) GERMAN CASTILLO GRAU
(54) Título MÉTODOS PARA DETERMINAR LOS NIVELES DE TGF-β EN UNA COMPOSICION	
Las casillas identificadas con 85, 86 y 87 sólo aplican para PCT	
(85) Fecha limite inicio Fase Nacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud Fecha Octubre 23, 2009 No. de solicitud PCT PCT/US2009/061790	(87) Publicación internacional Fecha Fecha (Abril 29, 2010) No. Publicación WO 2010/048479 A1

Resumen reivindicación (es):

Se proporciona un método novedoso para determinar los niveles de TGF-β1 o TGF-β2 en una muestra de leche, una fuente de proteínas crudas o una composición nutricional. El método involucra, en algunos casos, reconstituir la muestra; en algunos casos, centrifugar la muestra; activar la muestra usando proporciones particulares muestra:ácido:base; diluir la muestra usando proporciones particulares de muestra: agente amortiguador; y determinar la concentración de TGF-β1 en la muestra usando una prueba de ELISA.

PI02-F09 (2009-11-18)

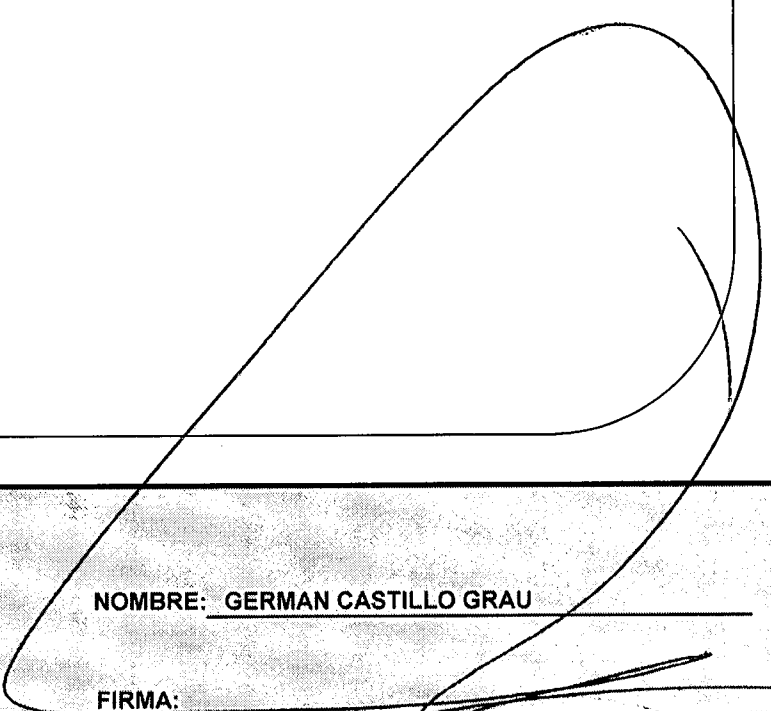
10 Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso. **Copia auténtica**
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción de examen preliminar internacional efectuado por la (IPEA)
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12x12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☐ Otros

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:

12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: GERMAN CASTILLO GRAU

FIRMA: 

C.C.

17.017.671 de
Bogotá

TP

2.978
de C.S.J.

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0030307

Bogotá D.C., Abril 04 de 2011 - 14:34:07

RECIBIDO DE : CASTILLO GRAU & ASOCIADOS LTDA.

NI 800.098.704

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	378743724	04/04/2011	6.900.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
			\$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-041150- -00000-0000

Fecha: 2011-04-04 15:30:20 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 39

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Abril 4 de 2011 - 14:34:08



SECRETARY OF STATE
STATE OF INDIANA

Todd Rokita
Secretary of State

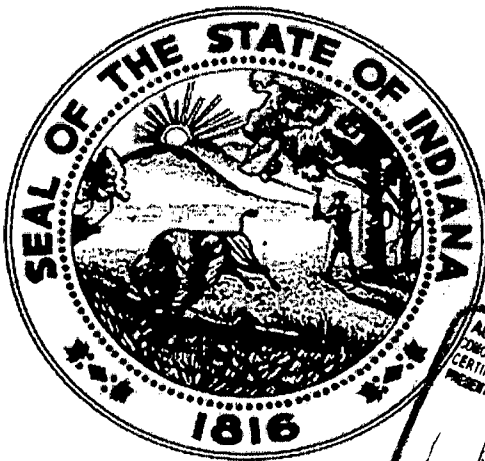
APOSTILLE

(Convention de la Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America
2. This public document has been signed by *Tammy J. Welcher*
3. acting in the capacity of notary public in & for *Vanderburgh* County
4. and bears the seal/stamp of notary public in & for the State of Indiana

CERTIFIED

5. at Indianapolis, Indiana
6. this the *fourth* day of *October, 2010*
7. by Secretary of State of Indiana
8. No. A2010 - 17527
9. Seal/Stamp:
10. Signature:



Todd Rokita

Todd Rokita
Indiana Secretary of State



Effective May 1, 2003 all apostilles from the Indiana Secretary of State will have an electronically printed seal.

Castillo Grau & Associates

Law Offices
P.O. Box 251473
Bogotá, Colombia

FOR PATENTS AND TRADEMARKS IN
COLOMBIA

PODER GENERAL

(1) MEAD JOHNSON NUTRITION
COMPANY

domiciliado en (2) 2400 W. Lloyd Expressway,
Evansville, Estado de Indiana, E.U.A.

nombra al Dr. Germán Castillo Grau y/o Adriana
Castillo Gibsone y/o Luis Felipe Castillo Gibsone

con oficinas en la Carrera 13 No. 37-43, Piso 12
en Bogotá, D.C., Colombia como sus
representantes con poder especial amplio y
suficiente, para recabar de las oficinas y
autoridades Colombianas, administrativas,
judiciales o de policía, en primera o segunda
instancia, la Obtención de Patentes de
Invención, Registro de Marcas, de Diseños
Industriales, de Nombres y Enseñas
Comerciales, lo mismo que traspasos,
extensiones, renovaciones, cambios de nombre
y domicilio, registro de licencias de explotación y
registro de licencias de uso referentes a tales
actuaciones, a cuyo efecto les faculta para dar
ante dichas autoridades todos los pasos
necesarios al objeto indicado, elevar solicitudes,
formular descripciones, enmiendas, protestas,
declaraciones, apelaciones y reclamos, solicitar
la aplicación de medidas cautelares, aceptar en
nuestro nombre y representación la Cesión de
derechos de invención y de patente de invención
que se nos haga por cualquier persona, abonar
todos los impuestos cuotas y pagos
determinados por la ley, recibir todos los
documentos y valores dando el descargo
respectivo, llenar cualesquiera otros requisitos,
desistir, y tomar en fin todas las medidas que
creyeran conducentes al resguardo de nuestros
intereses y en caso de presentarse oposición
para que intervengan como demandantes o
como demandados con todas las demás
facultades legales necesarias. Este poder
comprende además las facultades de recibir,
desistir, transigir, comprometer, sustituir, revocar
sustituciones, recibir notificaciones, nombrar
apoderados judiciales o extra-judiciales.

GENERAL POWER OF ATTORNEY

(1) MEAD JOHNSON NUTRITION
COMPANY

domiciled in (2) 2400 W. Lloyd Expressway,
Evansville, Indiana, U.S.A.

hereby appoint Dr. Germán Castillo Grau and/or
Adriana Castillo-Gibsone and/or Luis Felipe
Castillo-Gibsone

with offices at Carrera 13 No. 37-43, 12th Floor in
Bogotá, Colombia as our representatives with
special ample and sufficient power to obtain from
the offices and Colombian authorities,
administrative, judicial and police, in first or in
second instance, Patents of Invention,
registration of Trade or Service Marks, Industrial
Designs, of Commercial Names and Ensigns, as
well as assignments, extensions, renewals,
changes of names and addresses, registration of
licences of exploitation and licences of use
referring to said actions who are empowered to
take before said authorities all of the necessary
steps for the purposes indicated, to file
applications, to formulate descriptions,
corrections, protests, declarations, appeals and
claims, apply for precautionary measures, to
accept on our behalf and representation the
assignment of rights on invention and titles of
invention that may be given to us by any person,
to pay all taxes, quotas and payments
prescribed by law, to receive all the documents
and proceeds giving the respective
acquiescence or receipt, to fulfill any other
requisites to desist and take in fact any other
measures that may be deemed conducive to the
safeguard of our interests, and in case
oppositions are presented to intervene as
plaintiff or defendant, with all necessary legal
faculties. This power includes the faculties to
receive, desist, compromise, transact, substitute
it in all or in part, to revoke substitutions, to
receive notifications and to appoint judicial or
extra-judicial attorneys.

Dado y firmado en (4)

Given and signed in (4)
Evansville, Indiana, USA

Firma/Signature

Kofi B. Kwarteng

Kofi B. Kwarteng, Assistant General Counsel & Assistant Secretary

Corporate Seal to be Affixed Mead Johnson Nutrition Company

DECLARACION NOTARIAL
(Individual)

A losdías del mes dede 2010
compareció personalmente ante mí, Notario
Público el/la señor(a)

A quien(es) doy fe de conocer y me consta que
es(son) la(s) persona(s) descrita(s) y firmante(s)
del documento que precede, declarando ante mí
que otorga(n) el mismo para los fines y
propósitos que en él se expresan.

El Notario Público

.....
(Sociedades)

El infrascrito Notario certifica: que la(s) firma(s)
que antecede(n) y dice(n):

.....
es (son) auténtica(s); que el (los) signatario(s)
desempeña(n) el (los)

cargo(s) de

.....
de **MEAD JOHNSON NUTRITION
COMPANY**

que tiene(n) facultad para otorgar este poder; y
que dicha compañía está domiciliada en
Evansville, Estado de Indiana, E.U.A.

y actualmente existe y está organizada de
acuerdo a las leyes de

.....
Todos los hechos anteriores constan por

haber examinado los documentos respectivos.

de todo ello da fe.

Dado y firmado en



El Notario Público

(Con Apostilla)

NOTARIAL CERTIFICATE
(Individuals)

On this.....day of.....of..2010....
personally appeared before me, a Notary Public,
.....

to me known, and known to be the person(s)
described in and who executed the foregoing
document, and he(they) duly acknowledged to
me that he(they) executed same for the uses
and purposes therein expressed.

Notary Public

.....
(Corporations)

The undersigned Notary Public certifies: that
the preceding signature(s) reading . .

Kofi B. Kwarteng

.....
is (are) authentic; that the signor(s) at present
fill(s) the

post(s) of **Assistant General Counsel
and Assistant Secretary**

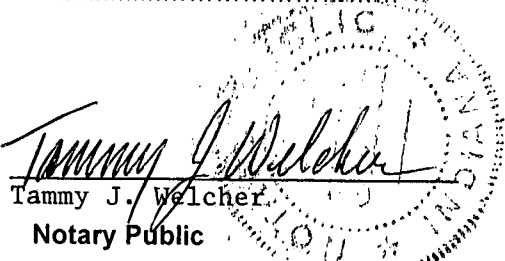
.....
of **MEAD JOHNSON NUTRITION
COMPANY**

and that he/she (they) is (are) empowered to
grant this power; and that said company is
domiciled in Evansville, Indiana, U.S.A.

and actually exists and is organized in
accordance with the laws of **Delaware, USA**

All the foregoing facts are known to the Notary
due to his/her having examined the respective
documents to which he/she, the Notary, attests.

Grantedandsigned
in.....**Evansville, Indiana USA**.....



**Tammy J. Welcher
Notary Public**

My Commission Expires: **August 15, 2015**
(With Apostille)

Resident of **Vanderburgh County, Indiana USA**

6

DESCRIPCIÓN

MÉTODOS PARA DETERMINAR LOS NIVELES DE TGF-B EN UNA COMPOSICIÓN

ANTECEDENTES

(1) Campo de la invención

[0001] La presente invención guarda relación en general con métodos de determinar el nivel del factor- β transformador del crecimiento (TGF- β) en una composición.

REVELACIÓN DE LA INVENCION

[0002] En una modalidad, la presente invención va dirigida a un método para determinar el nivel de TGF- β 1 en una muestra de leche, el cual método comprende:

- a. centrifugar la muestra durante cerca de 15 minutos a una fuerza centrífuga de cerca de 10.000 rpm;
- b. recoger el sobrenadante de la fase acuosa de la muestra y repetir la etapa (a) usando el sobrenadante de la etapa (a);
- c. recoger el sobrenadante de la fase acuosa de la muestra de la etapa (b) y repetir la etapa (a) usando el sobrenadante de la etapa (b);
- d. activar la muestra mediante la adición de un ácido y una base en una proporción muestra:ácido:base de cerca de 1:0,2:0,2;
- e. diluir la muestra usando una solución amortiguadora hasta una proporción de por lo menos cerca de 1:2 (muestra:amortiguador); y
- f. determinar la concentración de TGF- β 1 en la muestra que comprende las etapas de:
 - i. inmovilizar la muestra que tiene una cantidad desconocida de TGF- β 1 sobre un soporte sólido;
 - ii. añadir por lo menos un anticuerpo de detección para formar un complejo con el TGF- β 1;
 - iii. añadir por lo menos un sustrato enzimático para producir una señal visible; y

9

iv. detectar la señal visible para determinar la cantidad de TGF- β 1 en la muestra.

[0003] En una modalidad, la presente invención va dirigida a un método para determinar el nivel de TGF- β 2 en una muestra de leche, el cual método comprende:

- a. centrifugar la muestra durante cerca de 15 minutos a una fuerza centrífuga de cerca de 10.000 rpm;
- b. recoger el sobrenadante de la fase acuosa de la muestra y repetir la etapa (a) usando el sobrenadante de la etapa (a);
- c. recoger el sobrenadante de la fase acuosa de la muestra de la etapa (b) y repetir la etapa (a) usando el sobrenadante de la etapa (b);
- d. activar la muestra mediante la adición de un ácido y una base en una proporción muestra:ácido:base de cerca de 1:0,2:0,2; y
- e. determinar la concentración de TGF- β 2 en la muestra que comprende las etapas de:
 - i. inmovilizar la muestra que tiene una cantidad desconocida de TGF- β 2 sobre un soporte sólido;
 - ii. añadir por lo menos un anticuerpo de detección para formar un complejo con el TGF- β 2;
 - iii. añadir por lo menos un sustrato enzimático para producir una señal visible; y
 - iv. detectar la señal visible para determinar la cantidad de TGF- β 2 en la muestra.

[0004] En una modalidad, la presente invención va dirigida a un método para determinar el nivel de TGF- β 1 en una muestra de producto nutricional en polvo, el cual método comprende:

- a. reconstituir el producto nutricional hasta una concentración de entre cerca de 160 mg/mL y cerca de 170 mg/mL;
- b. evitar una etapa de centrifugación;
- c. activar la muestra mediante la adición de un ácido y una base en una proporción muestra:ácido:base de cerca de 1:0,2:0,2;

- 10
- d. diluir la muestra usando una solución amortiguadora hasta una proporción de por lo menos cerca de 1:4 (muestra:amortiguador);
 - e. determinar la concentración de TGF- β 1 en la muestra que comprende las etapas:
 - i. inmovilizar la muestra que tiene una cantidad desconocida de TGF- β 1 sobre un soporte sólido;
 - ii. añadir por lo menos un anticuerpo de detección para formar un complejo con el TGF- β 1;
 - iii. añadir por lo menos un sustrato enzimático para producir una señal visible; y
 - iv. detectar la señal visible para determinar la cantidad de TGF- β 1 en la muestra.

[0005] En una modalidad, la presente invención va dirigida a un método para determinar el nivel de TGF- β 2 en una muestra de producto nutricional en polvo, el cual método comprende:

- a. reconstituir el producto nutricional hasta una concentración de entre cerca de 160 mg/mL y cerca de 170 mg/mL;
- b. evitar una etapa de centrifugación;
- c. activar la muestra mediante la adición de un ácido y una base en una proporción muestra:ácido:base de cerca de 1:0,2:0,2;
- d. diluir la muestra usando una solución amortiguadora hasta una proporción de por lo menos cerca de 1:8 (muestra:amortiguador);
- e. determinar la concentración de TGF- β 2 en la muestra que comprende las etapas:
 - i. inmovilizar la muestra que tiene una cantidad desconocida de TGF- β 2 sobre un soporte sólido;
 - ii. añadir por lo menos un anticuerpo de detección para formar un complejo con el TGF- β 2;
 - iii. añadir por lo menos un sustrato enzimático para producir una señal visible; y
 - iv. detectar la señal visible para determinar la cantidad de TGF- β 2 en la muestra.

[0006] En una modalidad, la presente invención va dirigida a un método para determinar el nivel de TGF- β 1 en una muestra de fuente de proteínas crudas en polvo, el cual método comprende:

- a. reconstituir una fuente de proteínas crudas hasta una concentración de entre cerca de 95 mg/mL y cerca de 105 mg/mL;
- b. evitar una etapa de centrifugación;
- c. activar la muestra mediante la adición de un ácido y una base en una proporción muestra:ácido:base de cerca de 1:0,2:0,225;
- d. diluir la muestra usando una solución amortiguadora hasta una proporción de por lo menos cerca de 1:2 (muestra:amortiguador);
- e. determinar la concentración de TGF- β 1 en la muestra que comprende las etapas:
 - i. inmovilizar la muestra que tiene una cantidad desconocida de TGF- β 1 sobre un soporte sólido;
 - ii. añadir por lo menos un anticuerpo de detección para formar un complejo con el TGF- β 1;
 - iii. añadir por lo menos un sustrato enzimático para producir una señal visible; y
 - iv. detectar la señal visible para determinar la cantidad de TGF- β 1 en la muestra.

[0007] En una modalidad, la presente invención va dirigida a un método para determinar el nivel de TGF- β 2 en una muestra de fuente de proteínas crudas en polvo, el cual método comprende:

- a. reconstituir una fuente de proteínas crudas hasta una concentración de entre cerca de 95 mg/mL y cerca de 105 mg/mL;
- b. evitar una etapa de centrifugación;
- c. activar la muestra mediante la adición de un ácido y una base en una proporción muestra:ácido:base de cerca de 1:0,2:0,2;
- d. diluir la muestra usando una solución amortiguadora hasta una proporción de por lo menos cerca de 1:9 muestra:amortiguador; y
- e. determinar la concentración de TGF- β 2 en la muestra que comprende las etapas de:
 - i. inmovilizar la muestra que tiene una cantidad desconocida de TGF- β 2 sobre un soporte sólido;

- ii. añadir por lo menos un anticuerpo de detección para formar un complejo con el TGF- β 2;
- iii. añadir por lo menos un sustrato enzimático para producir una señal visible; y
- iv. detectar la señal visible para determinar la cantidad de TGF- β 2 en la muestra.

[0008] Todavía en otra modalidad, la invención va dirigida a un kit para medir TGF- β en leche, productos nutricionales o fuentes de proteínas crudas, el cual kit comprende: un conjugado de TGF- β ; un estándar de TGF- β ; un diluyente; un amortiguador de lavado; por lo menos un reactivo de color; y una solución de detención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0009] La Figura 1 ilustra la curva estándar.

MEJOR MANERA DE REALIZAR LA INVENCION

[00010] Ahora se hará referencia en detalle a las modalidades de la invención, uno o más ejemplos de las cuales aparecen más adelante. Cada ejemplo se da a manera de explicación de la invención, no como limitación de la misma. En efecto, será aparente para la persona medianamente versada en la técnica que se pueden hacer numerosas modificaciones y variaciones a la presente invención sin apartarse del espíritu o el alcance de la invención. Por ejemplo, las características ilustradas o descritas como parte de una modalidad, se puede usar en otra modalidad para dar todavía otra modalidad.

[00011] Así las cosas, se pretende que la presente invención cubra aquellas modificaciones y variaciones que caigan dentro del alcance de las reivindicaciones anexas y sus equivalentes. Otros objetos, características y aspectos de la presente invención se revelan o resultan evidentes a partir de siguiente descripción detallada. La persona medianamente versada en la materia técnica correspondiente entenderá que el presente discusión es una descripción de modalidades ejemplares únicamente y no tiene por objeto limitar los aspectos más amplios de la presente invención.

[00012] Como quedó dicho arriba, la presente invención guarda relación en general con métodos para determinar los niveles de TGF- β en varias muestras. Las referencias relacionadas con tales métodos pueden incluir la patente estadounidense No. 6.194.208.

3

[00013] El factor beta transformador del crecimiento (TGF- β) es el nombre general con que se designa una familia de polipéptidos, cuyos miembros tienen actividades regulatorias multifuncionales. Tres isoformas de mamíferos reguladas de forma diferente (denominadas TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3) desempeñan importantes papeles en multitud de procesos en el embrión en desarrollo, el bebé, el niño y el adulto. El TGF- β es una citocina homodimérica de 25 kDa de peso molecular de la que se sabe que intermedia funciones pleotrópicas tanto dentro del sistema inmunológico como sistémicamente. El TGF- β se expresa en varios tipos celulares en la mucosa intestinal que incluyen linfocitos, células epiteliales, macrófagos y células del estroma así como por células T, neutrófilos, macrófagos, células epiteliales, fibroblastos, plaquetas, osteoblastos, osteoclastos y otros. Además, el TGF- β se encuentra presente en la leche materna humana y puede tener influencia sobre múltiples aspectos de la salud y el desarrollo del bebé.

[00014] El TGF- β se sintetiza en la forma de grandes proteínas precursoras que están compuestas por de un pro-dominio amino-terminal, que comprende una secuencia de señales, un complejo asociado con la latencia y una subunidad carboxi-terminal madura. Los TGF- β biológicamente activos son homodímeros que están compuestas por dos subunidades maduras idénticas enlazadas por puentes disulfuro. Liberación del homodímero del TGF- β del complejo asociado con la latencia es necesaria para que el TGF- β pueda ejercer su actividad biológica sobre las células diana. La naturaleza del complejo asociado con la latencia y los mecanismos responsables de la liberación del TGF- β son claves para entender la actividad biológica del TGF- β *in vivo*. En el intestino humano, esto se puede lograr gracias a la acción de enzimas proteolíticas, extremos de pH, calor, calcio, y/o degradación mecánica.

[00015] Con base en los numerosos beneficios proporcionados por el TGF- β , suele ser importante que el factor de crecimiento se encuentra presente en diversos productos nutricionales o sea suplementado en ellos. Por ejemplo, ciertas fuentes de proteínas en productos nutricionales pueden proporcionar una fuente de TGF- β . Como alternativa, si el producto nutricional mismo no contiene TGF- β , el factor de crecimiento se puede suplementar en el producto. Sin embargo, como se anotó arriba, la liberación de TGF- β se produce en su forma inactiva. El TGF- β presente en las fuentes de proteínas de los productos nutricionales o que se añade a esos productos nutricionales, también se encuentra en su forma inactiva. Luego es activado en el intestino humano por enzimas, extremos de pH, y/o degradación mecánica.

14

[00016] Con base en los numerosos beneficios proporcionados por el TGF- β , suele ser importante que el factor de crecimiento se encuentra presente en, diversos productos nutricionales líquidos o sea suplementado en ellos. Sin embargo, hasta la presente invención, no había habido un método efectivo para determinar los niveles de TGF- β en una muestra de leche, producto nutricional o fuente de proteínas crudas, como un concentrado de proteínas del suero. En parte, esto puede ser debido a alta variabilidad en y entre estudios que informan tener concentraciones de TGF- β en estas composiciones. Más aún, es relativamente poco lo que se sabe de los factores que afectan a estos niveles informados en la leche, productos nutricionales o fuentes de proteínas crudas.

[00017] Así las cosas, el problema técnico que se pretende resolver por la presente invención es proporcionar un método exacto y reproducible para determinar los niveles de TGF- β , que incluya tanto a TGF- β 1 como a TGF- β 2, en una composición. De conformidad con la presente invención, los inventores han descubierto un método novedoso para determinar los niveles de TGF- β en una muestra de leche, producto nutricional o fuente de proteínas crudas.

[00018] Como quedó dicho arriba, el método de la invención se puede usar para determinar los niveles de TGF- β en fuentes de leche. En esta modalidad, la leche puede ser leche humana, leche bovina, leche de cabra, leche de oveja o cualquier otra leche obtenida de un mamífero.

[00019] En otra modalidad, el método de la invención se puede usar para determinar los niveles de TGF- β en un producto nutricional. El producto nutricional puede ser un sucedáneo de la leche materna para bebé. En algunas modalidades, el producto nutricional puede ser un sucedáneo de la leche materna para bebé. El término "sucedáneo de la leche materna para bebé" se aplica a una composición en forma líquida o en polvo cuya finalidad de uso, cuando sea necesario, es sustituir a la leche humana (sustituto de la leche materna) para satisfacer los requerimientos nutricionales normales de bebés. En una modalidad separada, el producto nutricional puede ser un enriquecedor de la leche humana, es decir, una composición que se le añade a la leche humana con el fin de reforzar su valor nutricional. Como enriquecedor de la leche humana, la composición inventiva puede estar en forma de polvo o líquido. En otra modalidad, el producto nutricional de la invención puede ser un sucedáneo de la leche materna para seguimiento. El término "sucedáneo de la leche materna para seguimiento" tal como se usa en este contexto se refiere a alimentos cuya finalidad es usarse como parte líquida de la dieta de ablactación para el bebé del 6º mes de vida en adelante y para los niños pequeños.

Todavía en otra modalidad, el producto nutricional de la invención puede ser una composición nutricional para niños. Los términos “niño” o “niños”, tal como se usan en este contexto, significan personas por encima de los 3 años de edad y antes de la adolescencia. Todavía en otra modalidad, el producto nutricional de la invención puede ser una leche para la etapa de crecimiento. El término “leche para la etapa de crecimiento” se refiere a una amplia categoría de bebidas enriquecidas a base de leche cuya finalidad de uso es formar parte de una dieta diversa con el fin de apoyar el crecimiento y el desarrollo normales de niños de 1 a 6 años de edad.

[00020] En algunas modalidades, la composición es un producto acidificado. Tal como se usa en este contexto, el término “producto acidificado” se refiere a una composición nutricional que tiene un pH de equilibrio final de 4,6 o menos y una actividad de agua más de 0,85. Todavía en otra modalidad, el producto nutricional puede ser un alimento medicinal. El término “alimento medicinal” se define como un alimento que es formulado para ser consumido o administrado por vía enteral bajo la supervisión de un médico y que tiene por objeto el manejo nutricional específico de una enfermedad o padecimiento para los cuales se establecen requisitos nutricionales distintivos, con base en principios científicos reconocidos, mediante evaluación médica. En general, para que un alimento se considere medicinal, un producto tiene, como mínimo, que cumplir los siguientes criterios: El producto tiene que ser un alimento para alimentación oral o por sonda; el producto tiene que estar etiquetado para el manejo nutricional de un trastorno médico específico, enfermedad o padecimiento para el cual existen requisitos nutricionales distintivos; y el producto tiene que tener como finalidad de uso estar bajo supervisión médica.

[00021] Todavía en otra modalidad, el método de la invención se puede usar para determinar los niveles de TGF- β en una fuente de proteínas crudas, como concentrado de proteínas del suero, leche descremada en polvo o proteínas de la caseína.

[00022] La composición de la invención se puede proporcionar en cualquier forma conocida del estado de la técnica, como polvo, gel, suspensión, pasta, sólido, líquido, concentrado líquido o producto listo para usar.

[00023] Los kits de análisis de inmunosorbencia ligado a enzimas (“ELISA”) se suelen usar para medir los niveles de TGF- β 1 o TGF- β 2 en sobrenadantes de cultivo celular, suero, plasma y/u orina. Los kits de ELISA de R&D Systems, Quantikine 1 (Cat. No. DB100B) para TGF- β 1 y Quantikine 2 (Cat. No. DB250) para TGF- β 2, se suelen usar para estos propósitos. En la actualidad, empero, no hay kits de ELISA disponibles comercialmente

para la medición exacta de TGF- β 1 o TGF- β 2 en leche, productos nutricionales o fuentes de proteínas crudas.

[00024] En términos generales, el ELISA es una prueba inmunoquímica rápida que involucra una enzima (una proteína que cataliza una reacción bioquímica) y un anticuerpo o antígeno (moléculas inmunológicas). En la presente invención, el anticuerpo que se usa será específico para el TGF- β (el antígeno). El método de ELISA involucra el uso de un anticuerpo que está adherido a una superficie sólida. Este anticuerpo tiene afinidad por (se pegará) la sustancia de interés, por ejemplo, el TGF- β presente en una composición. Una mezcla de TGF- β purificado enlazado (acoplado) a una enzima y la muestra de la prueba se añaden al sistema de prueba. Entre etapa y etapa la placa típicamente se lava con una solución de detergente suave para eliminar proteínas o anticuerpos que no estén específicamente ligados. Si no hay TGF- β presente en la muestra de la prueba, entonces solamente el TGF- β con enzima ligada se enlazará. Cuanto mayor sea la cantidad de TGF- β presente en la muestra de la prueba, menos TGF- β ligado a la enzima se enlazará. Entonces se añade la sustancia sobre la cual actúa la enzima y la cantidad de producto se mide de alguna forma, como un cambio en el color de la solución.

[00025] Las pruebas de ELISA en general son altamente sensibles y específicas y se comparan favorablemente con las pruebas de radioinmunoanálisis. Tienen la ventaja adicional de no necesitar radioisótopos ni un contador de radiación.

[00026] En algunas modalidades de la presente invención, la prueba de ELISA puede usar la técnica cuantitativa de inmunoanálisis con sándwich de enzimas, entendida por la persona medianamente versada en la técnica. En términos generales, un anticuerpo monoclonal específico para TGF- β 1 o TGF- β 2 puede cubrir previamente una microplaca. En la presente invención, este anticuerpo monoclonal puede ser un anticuerpo monoclonal purificado de ratón anti-TGF- β . Cualquier sitio de enlace remanente puede ser bloqueado. Entonces se pueden pipetear los estándares, controles y muestras dentro de los pozos de la microplaca. En algunas modalidades de la invención, el estándar utilizado es un estándar TGF- β porcino o un estándar de TGF- β humano recombinante.

[00027] El estándar, el control y las muestras entonces se incuban con un anticuerpo de detección marcado con biotina, el cual se liga a un epítopo diferente del TGF- β , completando el sándwich. En una modalidad, el anticuerpo de detección puede ser IgG biotinilada purificada de cabra con afinidad.

12

[00028] Entre etapa y etapa, la placa se lava con una solución de detergente suave para eliminar proteínas o anticuerpos que son estén ligados específicamente. Entonces se detecta la cantidad de anticuerpo de detección ligado a TGF- β mediante un reactivo de detección luego de la incubación con un sustrato enzimático adecuado. En una modalidad, el reactivo de detección puede ser peroxidasa de estreptavidina-rábano picante. Una señal visible que se correlaciona con la cantidad de TGF- β en la muestras se mide con un lector de microplacas. Cuanto mayor sea la señal, mayor será la concentración de TGF- β a lo largo del intervalo de la curva estándar.

[00029] Una modalidad de la prueba de ELISA de la presente invención se estipula en el diagrama de flujo que aparece a continuación.

DIAGRAMA DE FLUJO DE ELISA:

Recubrir la placa 100 μ L/pozo con 2 μ g/mL Anti-TGF- β 2 monoclonal purificado de ratón
(Para 1 placa: 40 μ L mAb en 9960 μ L de amortiguador CBC)



Incubar O/N a 4°C



Lavar la placa veces



Bloquear la placa con Amortiguador de bloqueo SEA, 270 μ L/pozo
Incubar a TA durante 1 hora



Lavar la placa 3 veces



Añadir 100 μ L/pozo estándar y muestra, diluir con PBS
Incubar a TA durante 1,5 horas bajo agitación ($\pm$ 500 rpm)



Lavar la placa veces



Añadir 100 μ L/pozo; 75 ng/mL PAb biotinilado anti-TGF- β 2
(para 1 placa: 15 μ L en 10 mL PBS)
Incubar a TA durante 2 horas bajo agitación



Lavar la placa 3 veces



Añadir 100 μ L/pozo de solución HRP (PIERCE)
(Para 1 placa: 1 gota de Reactivo A y 1 gota de Reactivo B en 10 mL de PBS)
Incubar a TA durante 1 hora bajo agitación
En este momento, equilibrar la placa con la solución TMB-Ultra



Lavar la placa 3 veces



Añadir 100 μ L/pozo de TMB-Ultra, esperar $\pm$ 5 min.
Detener la reacción con 100 μ L/pozo de 1 N H₂SO₄
Leer a A₄₅₀/A₆₅₂

[00030] El método del sándwich no tiene que ser el único método de ELISUA empleado en la presente invención. Se puede usar cualquier técnica de determinación de ELISA, como la aquí modificada, en el método de la invención.

[00031] Antes de la prueba de ELISA, las muestras en polvo se pueden reconstituir. Por ejemplo, un suplemento nutricional en polvo como un sucedáneo de la leche materna para bebé o una fuente de proteínas crudas como un concentrado de proteínas del suero, se pueden reconstituir para obtener una forma líquida. Se descubrió en la presente invención que las muestras que contienen una fuente de proteínas crudas, como un concentrado de proteínas del suero, se pueden reconstituir de forma diferente de los productos nutricionales, como los sucedáneos de la leche materna para bebé. Así pues, en la presente invención, un producto nutricional, como un sucedáneo de la leche materna para bebé, se pueden reconstituir hasta una concentración de entre cerca de 160 mg/mL y cerca de 170 mg/mL. En otra modalidad, el producto nutricional se puede reconstituir hasta cerca de 166 mg/mL. En una modalidad particular, la reconstitución del producto nutricional comprende disolver cerca de 0,5 g del producto nutricional en polvo en cerca de 3 mL de agua.

[00032] Sin embargo, en lo que respecta a las fuentes de proteínas crudas, como el concentrado de proteínas del suero o la leche descremada en polvo, la muestra se puede reconstituir hasta una concentración de entre cerca de 95 mg/mL y cerca de 105 mg/mL. En una modalidad particular, la muestra se puede reconstituir hasta cerca de 100 mg/mL. Esto se puede lograr por medio de la disolución de cerca de 0,5 g de polvo en cerca de 5 mL de agua. Esta concentración de reconstitución se requiere para la fuente de proteínas crudas con el fin de que la muestra pase de una suspensión a una solución.

[00033] Para preparar una muestra para la prueba de ELISA, la muestra típicamente ha sido centrifugada con el fin de desgrasar la muestra y recoger el sobrenadante de la fase acuosa (es decir, la fracción del suero) para el examen. En la presente invención, los inventores han descubierto que leche humana puede ser centrifugada aproximadamente veces durante cerca de 15 minutos a 10.000 rpm. Este método elimina de forma eficaz la capa de lípidos de la leche. Con todo, para los productos nutricionales como los sucedáneos de la leche materna para bebé o las fuentes de proteínas crudas como los concentrados de proteínas del suero, los inventores han descubierto que se debe evitar la etapa de centrifugación. En efecto, se descubrió que la etapa de centrifugación reduce la concentración de TGF- β 1 o TGF- β 2 en la muestras entre cerca de 5% y cerca de 30%. Aunque no es el deseo quedar ligados a esta o cualquier otra teoría, se piensa que esas pérdidas se pueden atribuir a deslipidación y unión a la caseína. En este orden de ideas, para preparar un producto nutricional o una fuente de proteínas crudas para la prueba de

ELISA para determinar TGF- β 1 o TGF- β 2, la etapa de centrifugación se debe evitar por completo.

[00034] Para activar el TGF- β 1 o el TGF- β 2 latentes a la forma inmunorreactiva que puede ser medida con el método de la invención, el TGF- β 1 o TGF- β 2 tiene que ser activado con ácido y neutralizado. Aunque el procedimiento de activación de acidificación y neutralización es el mismo para todas las muestras, los inventores han descubierto que la proporción muestra:ácido:base es diferente para las muestras de leche, los productos nutricionales y las fuentes de proteínas crudas. Además, la proporción muestra:ácido:base también difiere dependiendo de si lo que se está analizando es el TGF- β 1 o el TGF- β 2.

[00035] En una modalidad, la activación del TGF- β 1 o el TGF- β 2 en una muestra de leche se puede lograr mediante la adición de un ácido y una base en una proporción muestra:ácido:base de cerca de 1:0,2:0,2. En otra modalidad, la activación del TGF- β 1 o el TGF- β 2 en una muestra de una composición nutricional se puede lograr mediante la adición de un ácido y una base en una proporción muestra:ácido:base de cerca de 1:0,2:0,2.

[00036] En una modalidad separada, la activación del TGF- β 1 en una muestra que comprende una fuente de proteínas crudas se puede lograr mediante la adición de un ácido y una base en una proporción muestra:ácido:base de cerca de 1:0,2:0,225. En otra modalidad, la activación del TGF- β 2 en una muestra que comprende una fuente de proteínas crudas se puede lograr mediante la adición de un ácido y una base en una proporción muestra:ácido:base de cerca de 1:0,2:0,2.

[00037] A manera de ejemplo del procedimiento de activación mismo, sin pretender ser limitantes, se puede pesar una muestra de 1 g de una composición nutricional o fuente de proteínas crudas e introducirla en un tubo de ensayo de 50 mL. La muestra se puede reconstituir con 5 mL de agua o salina con amortiguador de fosfato (PBS). La mezcla se puede agitar suavemente con una varilla plástica. A esta mezcla se le puede añadir HCl 1N en una cantidad que permita alcanzar un pH de cerca de 2 y cerca de 3. La mezcla se puede agitar de nuevo con una varilla plástica. La mezcla entonces se puede incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación, se pueden añadir NaOH 1N a la mezcla para obtener un pH de entre cerca de 7 y cerca de 8. La mezcla se puede volver a mezclar con una varilla plástica. Si la mezcla no ha sido constituida hasta su concentración final, se puede transferir a un matraz volumétrico de 10 mL y llevarla a su concentración final de reconstitución con agua o PBS.

21

[00038] En otro ejemplo, una muestra líquida de leche, producto nutricional o fuente de proteínas crudas puede ser activada transfiriendo 1 mL de la muestra líquida dentro de un tubo de ensayo lo-bind de 2 mL. Se puede añadir HCl concentrado a la muestra para llevarla hasta un pH entre cerca de 2 y cerca de 3. La muestra se puede mezclar en vórtice y luego incubarla a cerca de temperatura ambiente durante cerca de 15 minutos. Entonces se puede neutralizar la muestra con NaOH 50% para alcanzar un pH final entre cerca de 7 y cerca de 8. La muestra se puede mezclar de nuevo en el vórtice. Se pueden utilizar otros ácidos o bases para la etapa de activación.

[00039] En una modalidad, se pueden usar tubos de ensayo y matraces de polipropileno en la invención porque el TGF- β activo es altamente hidrofóbico y se puede pegar a los aparatos de vidrio. El ácido y la base que se usan en el método de la invención pueden ser cualesquiera de los conocidos del estado de la técnica. En una modalidad, el ácido puede ser HCl y la base puede ser NaOH.

[00040] En la presente invención, la muestra se diluye usando una solución amortiguadora. Se puede usar cualquier solución amortiguadora conocida del estado de la técnica en esta modalidad. Se suministran dos soluciones amortiguadoras en el kit Quantikine® (Cat. No. DB100B) para la cuantificación del TGF- β 1. Las soluciones amortiguadoras comprenden RD1-21, una solución amortiguada de proteínas con preservativos y RD1-73, una solución amortiguada de proteínas con preservativos. Los inventores descubrieron de forma inesperada que el RD1-73 y no el RD1-21, demostró linealidad con una pendiente máxima para la cuantificación precisa del TGF- β 1 y un amplio intervalo de concentraciones para maximizar el número de diluciones de la muestra. Este efecto se observó con muestras de leche, productos nutricionales y fuentes de proteínas crudas. De suerte que, en una modalidad, la solución amortiguadora empleada para la dilución puede ser RD1-73.

[00041] En lo que respecta al TGF- β 2, si se usa el kit Quantikine® (Cat. No. DB250) para la cuantificación del TGF- β 2, se puede usar el diluyente RD1-17 de la prueba.

[00042] Además, los inventores de la presente invención han descubierto que la proporción de dilución inicial de la muestras depende de si lo que se está midiendo es el TGF- β 1 o el TGF- β 2. Así mismo, la dilución inicial depende de si la muestra es leche, un producto nutricional o una fuente de proteínas crudas.

[00043] Por ejemplo, en una modalidad, la dilución inicial de las muestras de leche puede ser muestra:diluyente entre cerca de 1:2 y cerca de 1:5 para las mediciones de TGF- β 1. En

N

otra modalidad, la dilución inicial de las muestras de leche puede ser muestra:diluyente entre cerca de 1:2 y cerca de 1:3 para las mediciones de TGF- β 1. Todavía en otra modalidad, la dilución inicial de las muestras de leche puede ser muestra:diluyente por lo menos cerca de 1:2 para las mediciones de TGF- β 1. En una modalidad particular, la dilución inicial de las muestras de leche puede ser muestra:diluyente cerca de 1:2 para las mediciones de TGF- β 1.

[00044] En una modalidad, no se necesita la dilución para las mediciones del TGF- β 2 en una fuente de leche. En otra modalidad, la dilución inicial de las muestras de leche puede ser muestra:diluyente por lo menos cerca de 1:2 para las mediciones de TGF- β 2.

[00045] En otra modalidad, la dilución inicial de las muestras de un producto nutricional puede ser muestra:diluyente entre cerca de 1:3 y cerca de 1:5 para las mediciones de TGF- β 1. Todavía en otra modalidad, la dilución inicial de las muestras de un producto nutricional puede ser muestra:diluyente cerca de 1:4 para las mediciones de TGF- β 1. Todavía en otra modalidad, la dilución inicial de las muestras de un producto nutricional puede ser muestra:diluyente por lo menos cerca de 1:4 para las mediciones de TGF- β 1.

[00046] En otra modalidad, la dilución inicial de las muestras de un producto nutricional puede ser muestra:diluyente entre cerca de 1:5 y cerca de 1:10 para las mediciones de TGF- β 2. En otra modalidad, la dilución inicial de las muestras de un producto nutricional puede ser muestra:diluyente entre cerca de 1:7 y cerca de 1:9 para las mediciones de TGF- β 2. Todavía en otra modalidad, la dilución inicial de las muestras de un producto nutricional puede ser muestra:diluyente cerca de 1:8 para las mediciones de TGF- β 2. Todavía en otra modalidad, la dilución inicial de las muestras de un producto nutricional puede ser muestra:diluyente por lo menos cerca de 1:8 para las mediciones de TGF- β 2,

[00047] En otra modalidad, la dilución inicial de las muestras de una fuente de proteínas crudas puede ser muestra:diluyente entre cerca de 1:1 y cerca de 1:3 para las mediciones de TGF- β 1. Todavía en otra modalidad, la dilución inicial de las muestras de una fuente de proteínas crudas puede ser muestra:diluyente cerca de 1:2 para las mediciones de TGF- β 1. Todavía en otra modalidad, la dilución inicial de las muestras de una fuente de proteínas crudas puede ser muestra:diluyente por lo menos cerca de 1:2 para las mediciones de TGF- β 1.

[00048] En otra modalidad, la dilución inicial de las muestras de una fuente de proteínas crudas puede ser muestra:diluyente entre cerca de 1:5 y cerca de 1:10 para las mediciones

de TGF- β 2. En otra modalidad, la dilución inicial de las muestras de una fuente de proteínas crudas puede ser muestra:diluyente entre cerca de 1:8 y cerca de 1:10 para las mediciones de TGF- β 2. Todavía en otra modalidad, la dilución inicial de las muestras de una fuente de proteínas crudas puede ser muestra:diluyente cerca de 1:9 para las mediciones de TGF- β 2. Todavía en otra modalidad, la dilución inicial de las muestras de una fuente de proteínas crudas puede ser muestra:diluyente por lo menos cerca de 1:9 para las mediciones de TGF- β 2.

[00049] Con la proporción de dilución adecuada, se puede añadir el diluyente a un pozo de determinación. El estándar, el control o la muestra activada se pueden añadir entonces a cada pozo. La microplaca se puede golpear suavemente para lograr la mezcla, se cubre con una banda adhesiva y se incuba durante aproximadamente dos horas a temperatura ambiente.

[00050] Cada pozo puede ser succionado y lavado, repitiendo el proceso tres veces para un total de cuatro lavados. Los pozos pueden ser lavados llenando cada pozo con un amortiguador usando un frasco de chorro, dispensador múltiple o autolavador. Después del último lavado, cualquier amortiguador remanente puede ser removido por succión o decantación. Entonces se puede invertir la placa y secarla contra toallas de papel limpias.

[00051] En una modalidad, un conjugado de TGF- β 1 o TGF- β 2 se puede añadir entonces a cada pozo que contiene una muestra de TGF- β 1 o TGF- β 2, respectivamente. Entonces se pueden cubrir los pozos con una nueva banda adhesiva y se incuban durante cerca de dos horas a temperatura ambiente. Las etapas de succión/lavado arriba anotadas se pueden repetir.

[00052] Entonces se puede añadir una solución de sustrato (reactivo de color) a cada pozo y se incuba durante cerca de 30 minutos a temperatura ambiente en un lugar oscuro. Entonces se puede añadir una solución ácida de detención, como H_2SO_4 , a cada pozo, golpeando suavemente para lograr una mezcla homogénea.

[00053] La densidad óptica de cada pozo puede ser determinada al cabo de cerca de 30 minutos usando un lector de microplacas a 450 nm. Si se dispone de corrección de longitud de onda, se puede fijar en 540 nm o 570 nm. Si no se dispone de corrección de longitud de onda, las lecturas hechas a 540 nm o 570 nm se deben restar de las lecturas hechas a 450 nm.

[00054] El usuario entonces puede duplicar y promediar las lecturas para cada estándar, control y muestra y restar la densidad óptica estándar promedio cero. Se puede crear una curva estándar reduciendo los datos con un software de computador capaz de generar una curva de adaptación logística de cuatro parámetros. Como alternativa, se puede construir una curva estándar trazando la absorbancia media para cada estándar sobre el eje de y contra la concentración sobre el eje de x y dibujando la curva de mejor adaptación a través de los puntos de la gráfica. Los datos se pueden linearizar trazando el log de las concentraciones de TGF-β1 frente al log de la O.D. y se puede determinar la línea mejor adaptada por análisis de regresión. Si las muestras se diluyeron en la etapa de activación, las concentraciones medidas se deben multiplicar por el factor de dilución final.

[00055] Se han evaluado los parámetros de referencia 89/518 de NIBSC/OMS (bovina natural) y 90/696 (humana recombinante) usando el método de la invención. La dosis respuesta de los métodos del TGF-β1 y TGF-β2 corre en paralelo con la curva estándar del Quantikine®. Se han determinado las siguientes ecuaciones para la conversión de los valores de la muestra obtenidos el kit Quantikine® TGF-β2 equivalente a unidades NIBSC.

[00056] Valor equivalente NIBSC (89/518) valor equivalente (U/mL) = 0,0551 × valor Quantikine® TGF-β2 (pg/mL).

[00057] Valor equivalente NIBSC (90/696) (U/mL) = 0,0272 × valor Quantikine® TGF-β2 (pg/mL).

[00058] Los métodos de la invención son beneficiosos porque minimizan el efecto de desplazamiento de matriz observado en los sucedáneos de la leche materna para bebé durante las pruebas de recuperación analítica. Según esto, la presente invención supera los desplazamientos de la matriz que contribuyen una subestimación o sobreestimación de la concentración verdadera de TGF-β1 o TGF-β2 en muestras de leche, productos nutricionales o fuentes de proteínas crudas.

[00059] La presente invención además incluye un kit para determinar la bioactividad de TGF-β1 o TGF-β2 en leche humana, productos nutricionales o fuentes de proteínas crudas. El kit puede incluir el amortiguador RD1-73 y/o el diluyente de determinación RD1-17 y un estándar porcino de TGF-β. El kit opcionalmente puede incluir además uno de más de un conjugado de TGF-β, una microplaca de TGF-β, un diluyente de calibrador, un reactivo de color, y/o un amortiguador de concentrado lavado. El kit trae instrucciones para preparar las muestras de conformidad con el método aquí descrito.

23

[00060] Los siguientes ejemplos describen varias modalidades de la presente invención. Otras modalidades que caen dentro del alcance de las reivindicaciones aquí consignadas serán aparentes para la persona medianamente versada en la técnica a partir de la consideración de la especificación o la práctica de la invención tal como aquí se revela. Se pretende que la especificación, junto con los ejemplos, se considere como meramente ejemplar, estando el espíritu y el alcance de la invención indicados por las reivindicaciones que siguen a los ejemplos. En los ejemplos, todos los porcentajes se dan con base en el peso a menos que se indique lo contrario.

Ejemplo 1

[00061] Este ejemplo ilustra una modalidad de la presente invención.

[00062] Equipos y reactivos

[00063] Tubos:

[00064] a. tubos de polipropileno de 50 mL

[00065] b. matraces volumétricos de 10 mL

[00066] c. tubos de centrifuga de 2 mL: (Tubos de proteína LoBind de 2,0 mL - Eppendorf 022431102)

[00067] Microplacas y accesorios:

[00068] a. Placas de 96 pozos NUNC 441653 NUNC-Immuno MaxiSorp StarWell

[00069] b. Cinta de sellado de 96 pozos Pierce 15036

[00070] c. Reservorio de reactivos Pierce 15075

[00071] Lector de microplacas y accesorios:

[00072] a. Lavador de microplacas Bio-Tek ELx405

[00073] b. Lector de microplacas Bio-Tek SIAFR Synergy™ HT Multi-Detección

[00074] c. Software de análisis de datos Gen5 Bio-Tek 594718

[00075] d. Agitador de microplaca The Jitterbug Model 130000 (Boekel Scientific).

[00076] Pipetas: Canal único:

[00077] a. 0,5-10 µL Eppendorf 022471902, Puntas Eppendorf 2249152-1

[00078] b. 20-200 µL Eppendorf 022472054, Puntas Eppendorf 2249154-7

[00079] c. 100-1000 µL Eppendorf 022472101, Puntas Eppendorf 2249155-5

[00080] d. 0,5-5 mL Eppendorf 022472151, Puntas Eppendorf 2249198-9

[00081] Multicanal:

[00082] a. 20-300 µL Eppendorf 022461460, Puntas Eppendorf 2249154-7

[00083] b. 50-1200 µL Eppendorf 022461478, Puntas Eppendorf 2249196-2

[00084] Amortiguadores:

[00085] a. BupH Salina con amortiguador de fosfato (PBS) Pierce 28372

[00086] b. BupH amortiguador de carbonato-bicarbonato Pierce 28382

- [00087] c. Surfact Amp 20 Pierce 28320
- [00088] Estándares de antígeno:
- [00089] a. TGF- β 2 humano recombinante estándar (R&D Systems 302-B2)
- [00090] Amortiguador de bloqueo: SEA Block Pierce 37527
- [00091] Anticuerpos:
- [00092] a. Anti-TGF- β 2; IgG monoclonal purificada de ratón 2B (R&D Systems MAB612)
- [00093] b. Anti-TGF- β 2; IgG purificada de cabra con afinidad por TGF- β 2 biotinilado (R&D Systems BAF302)
- [00094] Kit de detección ELISA:
- [00095] a. peroxidase ABC ultra-sensible Immunopure (Pierce 32050)
- [00096] b. Reactivo 1-etapa ultra-TMB-ELISA (Pierce 34028)
- [00097] Solución de detención:
- [00098] a. H₂SO₄ 1M
- [00099] Agua nanopura
- [000100] Preparación del amortiguador:
- [000101] Amortiguador CBC
- [000102] a. One paquete de Amortiguador de carbonato-bicarbonato Pierce BupH se disolvió en 500 mL de agua.
- [000103] b. La solución se almacenó a temperatura ambiente.
- [000104] c. La solución permaneció estable durante varios meses.
- [000105] PBS
- [000106] a. Un paquete de Salina con amortiguador de fosfato Pierce BupH se disolvió en 500 mL de agua.
- [000107] b. La solución se almacenó a temperatura ambiente.
- [000108] c. La solución permaneció estable durante varios meses.
- [000109] PBST
- [000110] a. Un vial (10 mL) de Pierce Surfact Amp 20 se añadió a 2L de PBS.
- [000111] b. La solución se almacenó a temperatura ambiente.
- [000112] c. La solución permaneció estable durante varios meses.
- [000113] Anticuerpos de captura: IgG monoclonal purificada de ratón 2B, Anti-TGF- β 2
- [000114] a. 2 μ g/mL de anticuerpo en PBS se prepararon frescos para cada determinación.
- [000115] Estándar de antígeno: estándar TGF- β 2 humano recombinante:
- [000116] a. 0-4000 pg/mL en PBS se prepararon frescos para cada determinación.
- [000117] Anticuerpo de detección: Anti-TGF-B2: IgG purificada de cabra con afinidad biotinilada:
- [000118] a. 100 ng/mL anticuerpo en PBS se prepararon frescos para cada determinación.
- [000119] Solución de reactivo ABC Pierce:

AN

[000120] a. para 10 mL PBS, 1 gota (45 µL) de reactivo A se añadió a 1 gota (45 µL) reactivo B.

[000121] b. La solución se preparó fresca y se almacenó a 4°C hasta el uso.

[000122] Preparación de la muestra:

[000123] Se empleó el siguiente protocolo para la activación del TGF-β2 en una muestra en polvo de un producto nutricional.

[000124] 1. Una muestra de 1 g se pesó y se introdujo en un tubo de 50 mL.

[000125] 2. La muestra se reconstituyó con 5 mL de PBS.

[000126] 3. La muestra se mezcló suavemente con una varilla plástica.

[000127] 4. Se añadió HCl 1N a la muestra para alcanzar un pH de 2 a 3. La muestra entonces se mezcló con una varilla plástica.

[000128] 5. La muestra se incubó a temperatura ambiente durante 15 min.

[000129] 6. Se añadió NaOH 1N a la muestra para alcanzar un pH de 7 a 8. La muestra entonces se mezcló con una varilla plástica.

[000130] 7. La muestra se transfirió a un matraz volumétrico de 10 mL y se llevó hasta un volumen final con PBS (concentración final: 100 mg/mL).

[000131] Se empleó el siguiente protocolo para la activación del TGF-β2 en la muestra líquida de leche.

[000132] 1. 1 mL de la muestra líquida se transfirió dentro de un tubo lo-bind de 2 mL.

[000133] 2. Se añadió HCl concentrado para alcanzar un pH de 2 a 3. La mezcla se mezcló en el vórtice.

[000134] 3. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 15 min.

[000135] 4. Se añadió NaOH/H₂O) concentrado 50%/50% para alcanzar un pH de 7 a 8. La muestra se mezcló en el vórtice.

[000136] Tabla 1. Diluciones seriadas para el estándar

Concentración del estándar raíz rhTGF-β2	Volumen de la dilución raíz/previa (µL)	Amortiguador (PBS) (µL)	Concentración final (pg/mL)
2.000.000	4 (raíz)	1996	4000
	1000	1000	2000
	1000	1000	1000
	1000	1000	500
	1000	1000	250
	1000	1000	125
	1000	1000	62,5
	1000	1000	31,25
	0	2000	0

28

[000137] Tabla 2. Diluciones seriadas para las muestras

Concentración inicial de la muestra (mg/mL)	Volumen de la dilución raíz/previa (µL)	Amortiguador (PBS) (µL)	Concentración final (pg/mL)
100	1000 (raíz)	0	100.000
	500	500	50.000
	500	500	25.000
	500	500	12.500
	500	500	6.250
	500	500	3.125

29

[000138] Tabla 3. Plano de la placa de 96 pozos:

STD 1	STD 2	STD 3	STD 4	STD 5	STD 6	STD 7	STD 8	STD 9	CTL	CTL	Blanco
STD 1	STD 2	STD 3	STD 4	STD 5	STD 6	STD 7	STD 8	STD 9	CTL	CTL	Blanco
Muestra 1; dilución 6	Muestra 1; dilución 5	Muestra 1; dilución 4	Muestra 1; dilución 3	Muestra 1; dilución 2	Muestra 1; dilución 1	Muestra 3; dilución 1	Muestra 3; dilución 2	Muestra 3; dilución 3	Muestra 3; dilución 4	Muestra 3; dilución 5	Muestra 3; dilución 6
Muestra 1; dilución 6	Muestra 1; dilución 5	Muestra 1; dilución 4	Muestra 1; dilución 3	Muestra 1; dilución 2	Muestra 1; dilución 1	Muestra 3; dilución 1	Muestra 3; dilución 2	Muestra 3; dilución 3	Muestra 3; dilución 4	Muestra 3; dilución 5	Muestra 3; dilución 6
Muestra 1; dilución 6	Muestra 1; dilución 5	Muestra 1; dilución 4	Muestra 1; dilución 3	Muestra 1; dilución 2	Muestra 1; dilución 1	Muestra 3; dilución 1	Muestra 3; dilución 2	Muestra 3; dilución 3	Muestra 3; dilución 4	Muestra 3; dilución 5	Muestra 3; dilución 6
Muestra 2; dilución 6	Muestra 2; dilución 5	Muestra 2; dilución 4	Muestra 2; dilución 3	Muestra 2; dilución 2	Muestra 2; dilución 1	Muestra 4; dilución 1	Muestra 4; dilución 2	Muestra 4; dilución 3	Muestra 4; dilución 4	Muestra 4; dilución 5	Muestra 4; dilución 6
Muestra 2; dilución 6	Muestra 2; dilución 5	Muestra 2; dilución 4	Muestra 2; dilución 3	Muestra 2; dilución 2	Muestra 2; dilución 1	Muestra 4; dilución 1	Muestra 4; dilución 2	Muestra 4; dilución 3	Muestra 4; dilución 4	Muestra 4; dilución 5	Muestra 4; dilución 6
Muestra 2; dilución 6	Muestra 2; dilución 5	Muestra 2; dilución 4	Muestra 2; dilución 3	Muestra 2; dilución 2	Muestra 2; dilución 1	Muestra 4; dilución 1	Muestra 4; dilución 2	Muestra 4; dilución 3	Muestra 4; dilución 4	Muestra 4; dilución 5	Muestra 4; dilución 6

[000139] Procedimiento

- [000140] 1. 100 µL de solución de anticuerpo de captura se pipetearon a cada pozo y se cubrieron con cinta de enmascarar.
- [000141] 2. La muestra se incubó durante la noche a 4°C.
- [000142] 3. La placa se lavó tres veces con PBST.
- [000143] 4. 270 µL de amortiguador de bloqueo se pipetearon dentro de la placa y la placa se cubrió con cinta de enmascarar.
- [000144] 5. La placa se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente (RT).
- [000145] 6. La placa entonces se lavó tres veces con PBST.
- [000146] 7. 100 µL estándar se pipetearon dentro de la muestras, las cuales luego se cubrieron con cinta de enmascarar.
- [000147] 8. La mezcla entonces se incubó durante 1 hora y 30 minutos a TA bajo agitación.
- [000148] 9. La placa entonces se lavó tres veces con PBST.
- [000149] 10. 100 µ L de anticuerpo de detección se pipetearon dentro de la placa y la placa se cubrió con cinta de enmascarar.
- [000150] 11. La muestra se incubó durante 2 horas a TA bajo agitación.
- [000151] 12. La placa entonces se lavó tres veces con PBST.
- [000152] 13. 100 µL de reactivo ABC se pipetearon entonces dentro de la muestra y la muestra se cubrió con cinta de enmascarar.
- [000153] 14. La muestra se incubó durante 1 hora a TA bajo agitación.
- [000154] 15. La placa entonces se lavó tres veces con PBST.
- [000155] 16. 100 µL de sustrato cromógeno (Pierce Ultra-TMB) se pipetearon dentro de la muestra y se incubó durante unos pocos minutos a RT. El color se desarrolló al cabo de 5 minutos.
- [000156] 17. 100 µL de H₂SO₄ 1M se añadieron a la muestra para detener la reacción y la muestra se midió (A450/A652 nm) usando un lector de microplacas.

[000157] Tabla 4. Curva estándar

Nombre de la curva	Fórmula de la curva	A	B	R	R'
Curva	$Y = A \cdot X + B$	0,000349	-0,0137	0,999	0,998

[000158] La Figura 1 ilustra la curva estándar.

7

[000159] Tabla de resultados

Well ID	Name	Well	Conc/Dil	Blank 450	Conc	Count	Mean	Std Dev	CV (%)
Sample 1		C6	1.00E+05	0.807	2833.964	3	2572.918	372.903	14.493
		D6	1.00E+05	1.004	2911.532				
		E6	1.00E+05	0.746	2173.259				
		C5	50000	0.655	1912.861	3	1853.723	70.836	3.81
		D5	50000	0.607	1775.508				
		E5	50000	0.641	1872.8				
		C4	25000	0.379	1123.082	3	1085.882	42.153	3.882
		D4	25000	0.369	1094.467				
		E4	25000	0.35	1040.098				
		C3	12500	0.17	525.024	3	527.888	13.113	2.484
		D3	12500	0.178	542.183				
		E3	12500	0.167	516.44				
		C2	6250	0.079	264.626	3	256.895	6.608	2.571
		D2	6250	0.075	253.18				
		E2	6250	0.075	253.18				
		C1	3125	0.039	150.185	3	121.55	24.946	20.523
Sample 2		D1	3125	0.023	104.381				
		E1	3125	0.028	110.184				
		F6	1.00E+05	0.605	1789.785	3	1807.839	116.388	6.438
		G6	1.00E+05	0.568	1715.418				
		H6	1.00E+05	0.664	1938.616				
		F5	50000	0.384	1137.389	3	1165.051	52.945	4.544
		G5	50000	0.382	1131.686				
		H5	50000	0.415	1226.098				
		F4	25000	0.203	619.154	3	698.1	50.138	7.505
		G4	25000	0.238	719.607				
		H4	25000	0.219	685.239				
		F3	12500	0.094	307.549	3	339.025	28.183	8.313
		G3	12500	0.113	381.918				
		H3	12500	0.108	347.61				
		F2	6250	0.048	170.188	3	184.503	17.87	9.688
		G2	6250	0.049	178.78				
		H2	6250	0.058	204.534				
		F1	3125	0.023	104.381	3	92.935	15.142	16.293
		G1	3125	0.013	75.766				
		H1	3125	0.021	98.658				

[000160] Cálculo

Eq.1 Concentración del antígeno (ppm) =
$$\frac{\text{(Concentración medida en pg } \frac{\square}{\square} \text{ mL)}}{\text{(Dilución de la muestra en } \mu\text{g } \frac{\square}{\square} \text{ mL)}}$$

[000161] Tabla 6. Concentraciones

Muestra	Concentración (µg/mL)	TGF-β2 (pg/mL)	CV (%)	TGF-β2 (pg/µg) ppm	% cambio de conc. previa	Promedio TGF-β2 (pg/µg) ppm
Muestra 1	1,00E+05	2572,918	14,493	0,0257		
	50000	1853,723	3,81	0,0371	144,09	
	25000	1085,882	3,882	0,0434	117,16	
	12500	527,886	2,484	0,0422	97,37	0,0409

22

	6250	256,996	2,571	0,0411	97,37	
	3125	121,55	20,523	0,0389	94,50	
Muestra 2	1,00E+05	1807,939	6,438	0,0181		
	50000	1165,051	4,544	0,0233	128,88	
	25000	668,1	7,505	0,0267	114,69	0,0227
	12500	339,025	8,313	0,0271	101,49	
	6250	184,503	9,686	0,0295	108,84	
	3125	92,935	16,293	0,0297	100,74	

[000162] Todas las referencias citadas en la presente especificación, que incluyen sin limitación, todos los artículos, publicaciones, patentes, solicitudes de patente, presentaciones, textos, informes, manuscritos, folletos, libros, publicaciones en internet, artículos de revista, periódicos y similares, se incorporan a la presente especificación en su integridad mediante referencia. La discusión de las referencias aquí mencionadas tiene por objeto únicamente resumir las aseveraciones hechas por sus autores y no se admite que alguna referencia constituya antecedente del estado de la técnica. Los solicitantes se reservan el derecho de controvertir la exactitud y pertinencia de las referencias citadas.

[000163] Aunque las modalidades preferidas de la invención han sido descritas usando términos, dispositivos y métodos específicos, tal descripción tiene únicamente propósitos ilustrativos. Los términos empleados son de descripción más que de limitación. Se entenderá que la persona medianamente versada en la técnica puede hacer cambios y variaciones sin apartarse del espíritu o el alcance de la presente invención, los cuales quedan estipulados en las siguientes reivindicaciones. Además, se entenderá que algunos aspectos de las diversas modalidades se pueden intercambiar en todo o en parte. Por ejemplo, aunque se han ejemplificado métodos para la producción de un suplemento nutricional líquido estéril comercial de acuerdo con esos métodos, se contemplan otros usos. En consecuencia, el espíritu y el alcance de las reivindicaciones anexas no deberán limitarse a la descripción de las versiones preferidas aquí contenidas.

3

REIVINDICACIONES

LO QUE SE REIVINDICA ES:

1. Un método para determinar el nivel de TGF- β 1 en una muestra de leche, el cual método comprende:
 - a. centrifugar la muestra durante cerca de 15 minutos a una fuerza centrífuga de cerca de 10.000 rpm;
 - b. recoger el sobrenadante de la fase acuosa de la muestra y repetir la etapa (a) usando el sobrenadante de la etapa (a);
 - c. recoger el sobrenadante de la fase acuosa de la muestra de la etapa (b) y repetir la etapa (a) usando el sobrenadante de la etapa (b);
 - d. activar la muestra mediante la adición de un ácido y una base en una proporción muestra:ácido:base de cerca de 1:0,2:0,2;
 - e. diluir la muestra usando una solución amortiguadora hasta una proporción de por lo menos cerca de 1:2 (muestra:amortiguador); y
 - f. determinar la concentración de TGF- β 1 en la muestra que comprende las etapas de:
 - i. inmovilizar la muestra que tiene una cantidad desconocida de TGF- β 1 sobre un soporte sólido;
 - ii. añadir por lo menos un anticuerpo de detección para formar un complejo con el TGF- β 1;
 - iii. añadir por lo menos un sustrato enzimático para producir una señal visible; y
 - iv. detectar la señal visible para determinar la cantidad de TGF- β 1 en la muestra.
2. Un método para determinar el nivel de TGF- β 2 en una muestra de leche, el cual método comprende:
 - a. centrifugar la muestra durante cerca de 15 minutos a una fuerza centrífuga de cerca de 10.000 rpm;

34

- b. recoger el sobrenadante de la fase acuosa de la muestra y repetir la etapa (a) usando el sobrenadante de la etapa (a);
 - c. recoger el sobrenadante de la fase acuosa de la muestra de la etapa (b) y repetir la etapa (a) usando el sobrenadante de la etapa (b);
 - d. activar la muestra mediante la adición de un ácido y una base en una proporción muestra:ácido:base de cerca de 1:0,2:0,2; y
 - e. determinar la concentración de TGF- β 2 en la muestra que comprende las etapas de:
 - i. inmovilizar la muestra que tiene una cantidad desconocida de TGF- β 2 sobre un soporte sólido;
 - ii. añadir por lo menos un anticuerpo de detección para formar un complejo con el TGF- β 2;
 - iii. añadir por lo menos un sustrato enzimático para producir una señal visible; y
 - iv. detectar la señal visible para determinar la cantidad de TGF- β 2 en la muestra.
3. Un método para determinar el nivel de TGF- β 1 en una muestra de producto nutricional en polvo, el cual método comprende:
- a. reconstituir el producto nutricional hasta una concentración de entre cerca de 160 mg/mL y cerca de 170 mg/mL;
 - b. evitar una etapa de centrifugación;
 - c. activar la muestra mediante la adición de un ácido y una base en una proporción muestra:ácido:base de cerca de 1:0,2:0,2;
 - d. diluir la muestra usando una solución amortiguadora hasta una proporción de por lo menos cerca de 1:4 (muestra:amortiguador);
 - e. determinar la concentración de TGF- β 1 en la muestra que comprende las etapas de:
 - i. inmovilizar la muestra que tiene una cantidad desconocida de TGF- β 1 sobre un soporte sólido;
 - ii. añadir por lo menos un anticuerpo de detección para formar un complejo con el TGF- β 1;
 - iii. añadir por lo menos un sustrato enzimático para producir una señal visible; y
 - iv. detectar la señal visible para determinar la cantidad de TGF- β 1 en la muestra.

4. El método de la reivindicación 3 en donde el producto nutricional es reconstituido hasta una concentración de cerca de 166 mg/mL.
5. Un método para determinar el nivel de TGF- β 2 en una muestra de producto nutricional en polvo, el cual método comprende:
 - a. reconstituir el producto nutricional hasta una concentración de entre cerca de 160 mg/mL y cerca de 170 mg/mL;
 - b. evitar una etapa de centrifugación;
 - c. activar la muestra mediante la adición de un ácido y una base en una proporción muestra:ácido:base de cerca de 1:0,2:0,2;
 - d. diluir la muestra usando una solución amortiguadora hasta una proporción de por lo menos cerca de 1:8 (muestra:amortiguador);
 - e. determinar la concentración de TGF- β 2 en la muestra que comprende las etapas de:
 - i. inmovilizar la muestra que tiene una cantidad desconocida de TGF- β 2 sobre un soporte sólido;
 - ii. añadir por lo menos un anticuerpo de detección para formar un complejo con el TGF- β 2;
 - iii. añadir por lo menos un sustrato enzimático para producir una señal visible; y
 - iv. detectar la señal visible para determinar la cantidad de TGF- β 2 en la muestra.
6. El método de la reivindicación 5 en donde el producto nutricional es reconstituido hasta una concentración de cerca de 166 mg/mL.
7. Un método para determinar el nivel de TGF- β 1 en una muestra de fuente de proteínas crudas en polvo, el cual método comprende:
 - a. reconstituir una fuente de proteínas crudas hasta una concentración de entre cerca de 95 mg/mL y cerca de 105 mg/mL;
 - b. evitar una etapa de centrifugación;

7b

- c. activar la muestra mediante la adición de un ácido y una base en una proporción muestra:ácido:base de cerca de 1:0,2:0,225;
 - d. diluir la muestra usando una solución amortiguadora hasta una proporción de por lo menos cerca de 1:2 (muestra:amortiguador);
 - e. determinar la concentración de TGF- β 1 en la muestra que comprende las etapas de:
 - i. inmovilizar la muestra que tiene una cantidad desconocida de TGF- β 1 sobre un soporte sólido;
 - ii. añadir por lo menos un anticuerpo de detección para formar un complejo con el TGF- β 1;
 - iii. añadir por lo menos un sustrato enzimático para producir una señal visible; y
 - iv. detectar la señal visible para determinar la cantidad de TGF- β 1 en la muestra.
8. El método de la reivindicación 7 en donde la fuente de proteínas crudas es reconstituida hasta una concentración de cerca de 100 mg/mL.
9. Un método para determinar el nivel de TGF- β 2 en una muestra de fuente de proteínas crudas en polvo, el cual método comprende:
- a. reconstituir una fuente de proteínas crudas hasta una concentración de entre cerca de 95 mg/mL y cerca de 105 mg/mL;
 - b. evitar una etapa de centrifugación;
 - c. activar la muestra mediante la adición de un ácido y una base en una proporción muestra:ácido:base de cerca de 1:0,2:0,2;
 - d. diluir la muestra usando una solución amortiguadora hasta una proporción de por lo menos cerca de 1:9 muestra:amortiguador; y
 - e. determinar la concentración de TGF- β 2 en la muestra que comprende las etapas de:
 - i. inmovilizar la muestra que tiene una cantidad desconocida de TGF- β 2 sobre un soporte sólido;
 - ii. añadir por lo menos un anticuerpo de detección para formar un complejo con el TGF- β 2;
 - iii. añadir por lo menos un sustrato enzimático para producir una señal visible; y

- iv. detectar la señal visible para determinar la cantidad de TGF- β 2 en la muestra.
-
10. El método de la reivindicación 9 en donde fuente de proteínas crudas es reconstituida hasta una concentración de cerca de 100 mg/mL.
 11. El método de la reivindicación 1 en donde la muestra es activada por acidificación con un ácido hasta un pH de entre cerca de 2 y cerca de 3.
 12. El método de la reivindicación 1 en donde la muestra es activada por neutralización con una base a a pH de entre cerca de 7 y cerca de 8.
 13. El método de la reivindicación 1 en donde la muestra es activada por acidificación con un ácido hasta un pH de entre cerca de 2 y cerca de 3 seguido de neutralización con una base hasta un pH de entre cerca de 7 y cerca de 8.
 14. El método de la reivindicación 1, que además comprende a etapa de comparar la concentración de TGF- β en un estándar porcino con la concentración de TGF- β en la muestra.
 15. El método de la reivindicación 1 en donde el anticuerpo de detección comprende IgG biotinilada purificada de cabra con afinidad.
 16. Un kit para medir TGF- β en leche, productos nutricionales o fuentes de proteínas crudas, el cual kit comprende:
 - a. un conjugado de TGF- β ;
 - b. un estándar de TGF- β ;
 - c. un diluyente;
 - d. un amortiguador de lavado;
 - e. por lo menos un reactivo de color; y
 - f. una solución de detención.

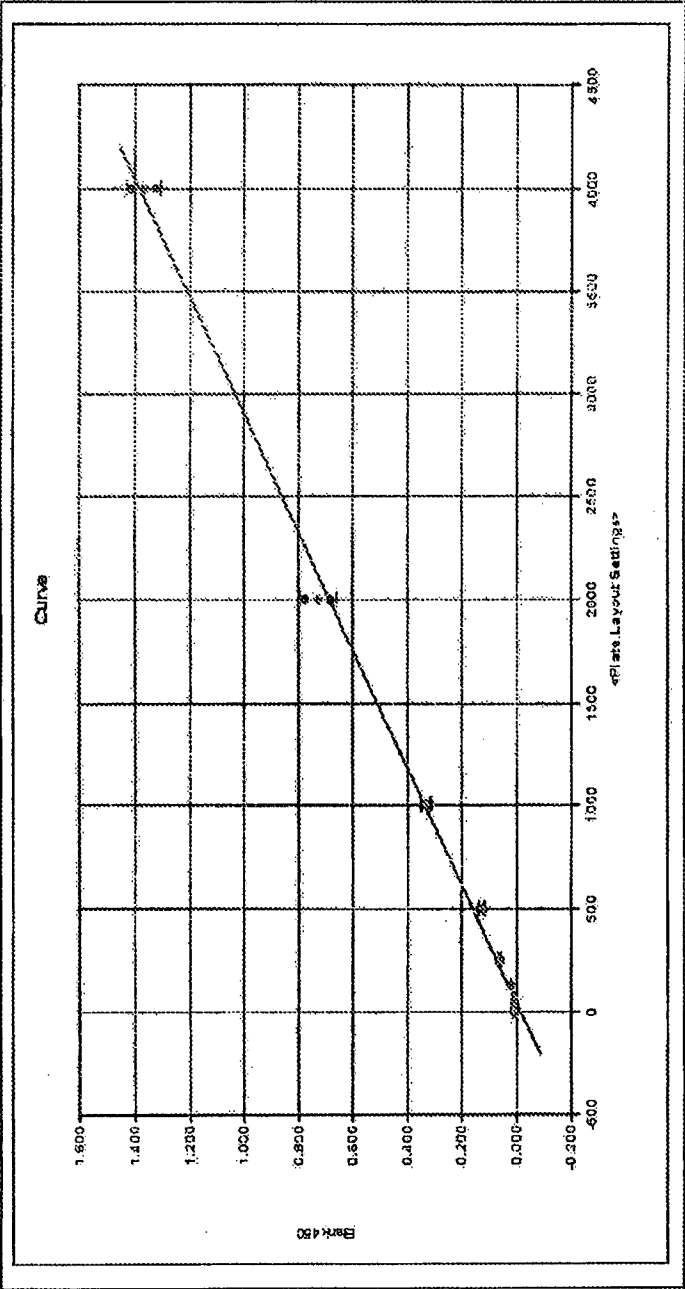


Resumen

Se proporciona un método novedoso para determinar los niveles de TGF- β 1 o TGF- β 2 en una muestra de leche, una fuente de proteínas crudas o una composición nutricional. El método involucra, en algunos casos, reconstituir la muestra; en algunos casos, centrifugar la muestra; activar la muestra usando proporciones particulares muestra:ácido:base; diluir la muestra usando proporciones particulares de muestra: agente amortiguador; y determinar la concentración de TGF- β 1 en la muestra usando una prueba de ELISA.

9
A

Figure 1. Standard Curve





No. 11-041150- -00000-0000

Fecha: 2011-04-04 15:30:20 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 39

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTIL

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☒ Indicación que se solicita una PCT
- ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☒ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
CASTILLO GRAU GERMAN
Apoderado(a) y/o Representante de
MEAD JOHNSON NUTRITION COMPANY

REFERENCIA	Radicación No.	11 041150
	Solicitud internacional	PCT/US2009/61790
	Fecha inicio fase nacional	24/05/2011
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	009706

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (c)

17 JUN. 2011

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____
adpa11



42

Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
CASTILLO GRAU GERMAN
Apoderado(a) y/o Representante de
MEAD JOHNSON NUTRITION COMPANY

REFERENCIA	Radicación No.	11 041150
	Solicitud internacional	PCT/US2009/61790
	Fecha inicio fase nacional	24/05/2011
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	009707

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de diez reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 13 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.

JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 17 JUN. 2011
adpa11