

Señor
SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COM
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 84097189 00000001 Folios: 5
Fecha (MM): 2004-10-01 16:14:14
Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 329 COMPLET
Dependencia: 2029 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Re: P1.-RAVGEN, INC.-Solicitud de Patente de Invención "METODOS PARA LA DETECCIÓN DE DESORDENES GENÉTICOS".-Clase C12Q 1/68.-Expediente número 04-097.189-

1. Me refiero a mi Solicitud de Patente de 29 de Septiembre de 2004.
2. Me permito manifestar a ese Despacho que es deseo del solicitante corregir algunos errores tipográficos que se cometieron en la descripción de la presente invención al momento de su preparación. Es así como:
 - En la página 130, líneas 19 y 30 debe leerse: Repite pasos 6 y 7 treinta y siete veces (37) y no treinta y nueve como erróneamente se mencionó;
 - En la página 139, línea 15 debe agregarse: 3' al final de la secuencia "5' CGTTGGCTTGAGGAATTCGACCAAAGAGCCAAGAGAA";
 - En la página 141, líneas 16,17 deben eliminarse algunos ceros y leerse: 141-180, 161-180, 181-200, 201-220, 221-240, 241-260, 261-280, 281-300, 301-350, 351-400, 401-450, 450-500 o a más de 500 bases del sitio de Interés;
 - En la página 153, líneas 26 27 deben eliminarse algunos ceros y leerse: 41-50, 51-60, 61-70, 71-80, 81-100, 101-120, 121-140, 141-160, 161-180, 181-200, y más de 200 en una reacción simple; y,
 - En la página 200, línea 8 debe leerse: 56:44 y no 56:46 como erróneamente se mencionó.

En relación con las anteriores modificaciones, atentamente me permito manifestar a ese Despacho que las mismas no amplían de manera alguna el alcance de la presente invención, toda vez que solamente obedecen a la enmienda de errores tipográficos que se presentaron en la preparación del texto de la presente solicitud de patente.

3. Anexos:

(a) Recibo No. 04-72240 expedido por la Superintendencia de Industria y Comercio , que acredita el pago de la tasa de modificación;

(b) Copia de la páginas 130, 139, 141, 153 y 200 de la descripción que reemplazan aquellas presentadas originalmente, en las cuales se han realizado las modificaciones expuestas anteriormente; y

(c) Formulario de modificaciones.

4. Ruego a usted tomar atenta nota de lo anterior y proceder de conformidad.

Señor Superintendente,


ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P. 53.215

FORMULARIO ÚNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES.
2000-10

①

SOLICITUD DE:



Corrección de Error Material.



Modificación a una Solicitud.

②

SOLICITANTE

Nombre: **RAVGEN, INC.,**

Dirección: 9241 Rumsey Road Columbia, MD 21045,
Estados Unidos de América.

Teléfono: 3 284270

Fax: 8 069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

Domicilio: Rahway, New Jersey, Estados Unidos de
América.

IDENTIFICACION

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Número

③

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: **ALICIA LLORED RICAURTE**

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, Colombia

Teléfono: 3 284270

Fax: 8 069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Número 39.690.713 TP 53.215

④

Número de expediente:

04-097.189

⑤

Descripción de la corrección o modificación solicitada corrección errores tipográficos en la
descripción de la invención.

⑥

Comprobante de pago No. 04-72.240

Fecha 10 de Septiembre de 2004

⑦

Anexos:



Comprobante de pago de la tasa.



Podemos, si fuere el caso.



Certificado de existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas.

⑧

NOMBRE ALICIA LLORED RICAURTE

FIRMA



C.C. 39.690.713

T.P. 53.215

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

MIT : 80017A089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 04 - 72,240
FECHA : SEPTIEMBRE 10 DE 2004

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	28715708	10/09/2004	6,250,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. CONTABILISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-03 CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	12 MARCAS Y LENAS COMERCIALES	27,000.00
	TOTAL :	27,000.00

SON: OCHENTA Y SIETE MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Reacción PCR

Todos los cinco sitios de interés fueron amplificados del template de ADN genómico usando PCR (Patentes U.S. Nos. 4,683,195 y 4,683,202). Para especificidad aumentada se usó una reacción de PCR de "inicio caliente". Las reacciones de PCR se llevaron a cabo usando el Kit HotStarTaq Master Mix suministrado por QIAGEN (número de catálogo 203443). La cantidad de template de ADN y plantilla por reacción se puede optimizar para cada sitio de interés; en este ejemplo se usaron 40 ng de template de ADN genómico humano y 5 μ M de cada primer. Se llevaron a cabo treinta y ocho ciclos de PCR. Se usaron las siguientes condiciones de PCR para SNP TSC 0115603, SNP TSC 0309610 y SNP TSC 02003437:

- (1) 95°C por 15 minutos y 15 segundos;
- (2) 42°C por 30 segundos;
- (3) 95°C por 30 segundos;
- (4) 60°C por 30 segundos;
- (5) 95°C por 30 segundos;
- (6) 69°C por 30 segundos;
- (7) 95°C por 30 segundos;
- (8) Repite pasos 6 y 7 treinta y siete (37) veces
- (9) 72°C por 5 minutos.

Se usaron las siguientes condiciones de PCR para SNP ss813773, SNP TSC 0198557 y SNP TSC 0197279:

- (1) 95°C por 15 minutos y 15 segundos;
- (2) 37°C por 30 segundos;
- (3) 95°C por 30 segundos;
- (4) 57°C por 30 segundos;
- (5) 95°C por 30 segundos;
- (6) 64°C por 30 segundos;
- (7) 95°C por 30 segundos;
- (8) Repite pasos 6 y 7 treinta y siete (37) veces; y
- (9) 72°C por 5 minutos.

El SNP TSC0597888 (70) se amplió usando el siguiente conjunto de plantillas:

Primera plantilla:

5' ACCCAGGCGCCAGAATTCTTTAGATAAAGCTGAAGGGA 3' (SEC ID No: 36)

Segunda plantilla:

5' GTTACGGGATCCGGGACTCCATATTGATC 3' (SEC ID No: 37)

La primera plantilla tenía un marcador de biotina en el extremo 5', y contenía un sitio de reconocimiento de enzima de restricción para EcoRI. La primera plantilla se diseñó para recocerse a 70 bases del sitio de interés. La segunda plantilla contenía un sitio de reconocimiento de enzima de restricción para BsmF I.

El SNP TSC0195492 se amplió usando el siguiente conjunto de plantillas:

Primera plantilla:

5' CGTTGGCTTGAGGAATTCGACCAAAAGAGCCAAGAGAA 3' (SEC ID No: 38)

Segunda plantilla:

5' AAAAAGGGATCCGGGACCTTGACTAGGAC 3' (SEC ID No: 39)

La primera plantilla tenía un marcador de biotina en el extremo 5' y contenía un sitio de reconocimiento de enzima de restricción para EcoRI. La primera plantilla se diseñó para recocerse a 80 bases del sitio de interés. La segunda plantilla contenía un sitio de reconocimiento de enzima de restricción para BsmF I.

El SNP TSC0607185 (90) se amplió usando el siguiente conjunto de plantillas:

Primera plantilla:

5' ACTTGATTCCGTGAATTCGTTATCAATAAATCTTACAT 3' (SEC ID No: 40)

Segunda plantilla:

5' CAAGTTGGATCCGGGACCCAGGGCTAACC 3' (SEC ID No: 41)

temperatura de fusión de la secuencia entera de la segunda plantilla, que fue de 64°C. La temperatura de recocido para los ciclos restantes fue de 64°C. La escalación de la temperatura de recocido de TM1 a TM2 a TM3 en los tres primeros ciclos de PCR mejora la especificidad grandemente. Estas temperaturas de recocido son representativas, y el experto entenderá que las temperaturas de recocido de cada ciclo dependen de las plantillas específicas usadas.

Las temperaturas y tiempos para la desnaturalización, recocido y extensión se pueden optimizar probando varios ajustes y usando los parámetros que produjeron los mejores resultados. En este ejemplo la primera plantilla se diseñó para recocerse a varias distancias del sitio de interés. El experto entenderá que la ubicación de recocido de la primera plantilla puede ser a 5-10, 11-15, 16-20, 21-25, 26-30, 31-35, 36-40, 41-45, 46-50, 51-55, 56-60, 61-65, 66-70, 71-75, 76-80, 81-85, 86-90, 91-95, 96-100, 101-105, 106-110, 111-115, 116-120, 121-125, 126-130, 131-140, 141-160, 161-180, 181-200, 201-220, 221-240, 241-260, 261-280, 281-300, 301-350, 351-400, 401-450, 450-500 o a más de 500 bases del sitio de interés.

Purificación del Fragmento de Interés

Los productos de PCR fueron separados del template de ADN genómico. Después de la reacción, ¼ del volumen de cada reacción de PCR de un individuo se mezclaron juntos en un agujero de una placa Streptawell transparente de Alto Enlace, de Roche Diagnostics GmbH (número de catálogo 1 645 692, como se lista en Roche Molecular Biochemicals, Catálogo de Bioquímicos 2001). Las primeras plantillas contenían un marcador de biotina 5' de forma que los productos de PCR se enlazaron a los agujeros recubiertos de Estreptavidina, mientras que el template de ADN genómico no lo hizo. La reacción de ligamiento de estreptavidina se realizó usando un Termomezclador (Eppendorf) a 1000 rpm por 20 min., a 37°C. Cada agujero fue aspirado para remover el material no enlazado, y fue lavado tres veces con PBS 1X, con cuidadoso mezclado (Kandpal et al., Nucl. Acid Res. 18:1789-1795 (1990)); Kaneoka et al., Biotechniques 10:30-34 (1991); Green et al., Nucleic Acids Res. 18:6163-6164 (1990)).

Alelo A – Corte 11/15	5' TTA				
	3' AAT	T	T	A	C
	Posición de la proyección	0	1	2	3
Alelo A – después del llenado	5' TTA	A	A	T	G*
	3' AAT	T	T	A	C
	Posición de la proyección	0	1	2	3

Para el alelo de guanina, la primera posición en la proyección sería llenada con dATP, que permitiría que la polimerasa incorporara ddGTP en la posición 2 complementaria a la proyección. No habría diferencia detectable entre las moléculas cortadas en la posición 10/14 o en las moléculas cortadas en la posición 11/15.

Para el alelo de adenina, la primera posición complementaria a la proyección se llenaría con dATP, la segunda posición se llenaría con dATP, la tercera posición se llenaría con dTTP, y la cuarta posición se llenaría con ddGTP. No habría diferencia en los pesos moleculares de las moléculas cortadas en 10/14 o las moléculas cortadas en 11/15. Las únicas diferencias corresponderían a si las moléculas de ADN contenían una adenina en el sitio variable o una guanina en el sitio variable.

Como se ve en la FIG. 11, el posicionamiento de la región de recocido de la primera plantilla permite analizar múltiples SNPs en una línea simple o en un gel. Además, cuando se usa el mismo nucleótido con el mismo colorante, se puede llevar a cabo una reacción de llenado simple. En este ejemplo, se analizaron 6 SNPs en una línea. Sin embargo, se puede analizar cualquier número de SNPs incluyendo, pero sin limitarse a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 30-40, 41-50, 51-60, 61-70, 71-80, 81-100, 101-120, 121-140, 141-160, 161-180, 181-200, y más de 200 en una reacción simple.

Además, un nucleótido marcado usado para detectar ambos alelos se puede mezclar con un segundo nucleótido marcado usado para detectar un juego diferente de SNPs siempre y cuando ninguno de los nucleótidos que

Se vieron dos bandas de alta intensidad para cada uno de los cuatro SNPs que indican que ambos alelos estaban bien representados en la población.

Sin embargo, no es necesario que los SNPs tengan frecuencias de alelo 50:50 para que sean útiles. Todos los SNPs proveen información útil. Los métodos descritos aquí proveen una técnica rápida para la determinación de la frecuencia de alelo en un SNP, o cualquier sitio variable incluyendo, pero sin limitars a mutaciones puntuales. Puede ser útiles las frecuencias de alelo de 50:50, 51:49, 52:48, 53:47, 54:46, 55:45, 56:44, 57:43, 58:42, 59:41, 60:40, 61:39, 62:38, 63:37, 64:36, 65:35, 66:34, 67:33, 68:32, 69:31, 70:30, 72:29, 72:28, 73:27, 74:26, 75:25, 76:24, 77:23, 78:22, 79:21, 80:20, 81:19, 82:18, 83:17, 84:16, 85:15, 86:14, 87:13, 88:12, 89:11, 90:10, 91:9, 92:8, 93:7, 94:6, 95:5, 96:4, 97:3, 98:2, 99:1 y 100:0.

Se vieron dos bandas para SNP TSC0903430. Una banda, la banda de peso molecular más bajo representaba las moléculas de ADN llenadas con ddGTP marcado. Se vió una banda de intensidad más débil para las moléculas llenadas con ddGTP marcado, en la posición 3 complementaria a la proyección, que representaba el alelo de citosina. El SNP TSC0903430 representa un SNP con una variación de frecuencia de alelo. En la población, la mayoría de los individuos portan el alelo guanina, pero el alelo de citosina aún está presente.

Se vió una banda de alta intensidad para SNP TSC0337961 y SNP TSC0786441. La banda detectada para SNP TSC0337961 y SNP TSC0786441 correspondía a las moléculas de ADN llenadas con ddGTP en la posición 1 complementaria a la proyección. No se detectó señal de las moléculas de ADN que hubieran sido llenadas en la posición 3 complementaria a la proyección, que hubieran representado al segundo alelo. El SNP TSC0337961 y el SNP TSC0786441 representan SNPs con pequeña variabilidad en la población.

Como se demuestra en el FIG. 14, la primera plantilla usado para amplificar cada sitio de interés se puede diseñar para recocerse a varias distancias del sitio de interés. Esto permite analizar múltiples SNPs en la misma reacción. Mediante el diseño de la primera plantilla para recocerse a distancias especificadas del sitio de interés, se puede analizar cualquier