



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Industria

SUPERIN



No. 13-039902-00000-0000

Fecha: 2013-02-27 16:17:09 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 75

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

**SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION**

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO _____
SONDAS Y CEBADORES PARA DETECCION DEL
' DENGUE

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE _____
BIGTEC PRIVATE LIMITED

DOMICILIO _____
KARNATAKA, INDIA

74. APODERADO _____
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D.C., _____



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Adhesivo de radicación



No. 13-039902- -00000-0000

Fecha: 2013-02-27 16:17:09 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 75

DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☐ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☒ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/IB2011/053164	Fecha 2011/07/15
Publicación Internacional No.		WO 2012/014116 A1	Fecha 2012/02/02
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN		
SONDAS Y CEBADORES PARA DETECCIÓN DEL DENGUE			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
C12Q 001/068			
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN
BIGTEC PRIVATE LIMITED			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN		2nd Floor, Golden Heights, 59th 'C' Cross, 4 th 'M' Block Rajajinagar,	
CIUDAD		Bangalore 560 010,	
DEPARTAMENTO/ESTADO		Karnataka,	
PAÍS DE RESIDENCIA		India	
No. TELÉFONO		3 47 36 11	
CORREO ELECTRÓNICO		clientes@cavelier.com	
NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN		India	
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. JAGANNATH		Manjula	Hindú
2. NARAYANAN		Manoj Mulakkapurath	Hindú
3. NAIR		Chandrasekhar Bhaskaran	Hindú
4. SUBBARAO		Pillarisetti Venkata	Hindú
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1. India	Karnataka	Bangalore 560 010	c/o Bigtec Private Limited, 2nd Floor, Golden Heights, 59th 'C' Cross, 4 th 'M' Block Rajajinagar,
2. India	Karnataka	Bangalore 560 010	c/o Bigtec Private Limited, 2nd Floor, Golden Heights, 59th 'C' Cross, 4 th 'M' Block Rajajinagar,
3. India	Karnataka	Bangalore 560 010	c/o Bigtec Private Limited, 2nd Floor, Golden Heights, 59th 'C' Cross, 4 th 'M' Block Rajajinagar,
4. India	Karnataka	Bangalore 560 010	c/o Bigtec Private Limited, 2nd Floor, Golden Heights, 59th 'C' Cross, 4 th 'M' Block Rajajinagar,

OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS De Páez		NOMBRES Luz Clemencia	IDENTIFICACIÓN C.C . 35.456.344 T.P . 23.555
DIRECCIÓN	Carrera 4ª No. 72-35		No. TELÉFONO 3 47 36 11
CIUDAD	BOGOTA		CORREO ELECTRÓNICO cavelier@cavelier.com
PAÍS	COLOMBIA		No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
(33) PAÍS DE ORIGEN INDIA		CÓDIGO PAÍS IN	(31) NÚMERO 2162/CHE/2010
(32) FECHA (AAAA/MM/DD) 2010/07/29			
11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i>			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i>			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i>			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☐			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	No. <u>13-0014232</u> No. <u>13-0018099</u>	Fecha: <u>2013/02/13</u> Fecha: <u>2013/02/22</u>
16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL <i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)</i>		
Nombre del Firmante LUZ CLEMENCIA DE PAEZ		Firma  <u>17-23-555-055</u>	
C.C 35.456.344 de Usaquen		Tarjeta Profesional 23.555	

17 ANEXOS	
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano 1. ☒ Descripción N° de folios: <u>20</u> 2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: <u>19</u> 3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: <u>4</u> 4. ☒ Resumen. 5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso. 6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso. 7. ☐ Arte final 12 x 12. 8. ☐ Anexo formato digital. ☒ Traducción Al Español De Los Anexos Presentados Junto Con El Informe Del Examen Preliminar Internacional. ☒ Forma PCT/IB/306. Notificación correspondiente a la inscripción del cambio de dirección del solicitante BIGTEC PRIVATE LIMITED. ☒ 4 Formas PCT/IB/306. Notificación correspondiente a la inscripción del cambio de dirección de los inventores Manjula JAGANNATH, Manoj Mulakkapurath NARAYANAN, Chandrasekhar Bhaskaran NAIR, Pillarisetti Venkata SUBBARAO.	Documentación Jurídica 9. ☒ Poder de BIGTEC PRIVATE LIMITED 10. ☒ Documento que legalmente prueba la cesión de los inventores al solicitante o a su causante. 11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso. 12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso. 13. Reducción de tasas Micro, pequeñas o medianas empresas ☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004. Universidades públicas o privadas ☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación Entidades sin ánimo de lucro ☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☐ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar 14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$500.000. 15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. 16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación. 17. ☒ Comprobante de pago por 9 reivindicaciones adicionales a 10 por \$270.000.

(43) International Publication Date
2 February 2012 (02.02.2012)



(10) International Publication Number
WO 2012/014116 A1

(51) International Patent Classification:
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/IB2011/053164

(22) International Filing Date:
15 July 2011 (15.07.2011)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
2162/CHE/2010 29 July 2010 (29.07.2010) IN

(71) Applicant (for all designated States except US):
BIGTEC PRIVATE LIMITED [IN/IN]; 2nd Floor, SID Entrepreneurship Building, Indian Institute of Science [IISc], Campus, Malleshwaram, Bangalore, Karnataka 560 012 (IN).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **JAGANNATH, Manjula** [IN/IN]; c/o: Bigtec Private Limited, 2nd Floor, SID Entrepreneurship, Building, Indian Institute of Science [IISc], Campus, Malleshwaram, Bangalore, Karnataka 560 012 (IN). **NARAYANAN, Manoj, Mulakkapurath** [IN/IN]; c/o: Bigtec Private Limited, 2nd Floor, SID Entrepreneurship, Building, Indian Institute of Science [IISc], Campus, Malleshwaram, Bangalore, Karnataka 560 012 (IN). **NAIR, Chandrasekhar, Bhaskaran** [IN/IN]; c/o: Bigtec Private Limited, 2nd Floor, SID Entrepreneurship, Building, Indian Institute of Science [IISc], Campus, Malleshwaram, Bangalore, Karnataka 560 012 (IN). **SUBBARAO, Pillarisetti, Venkata** [IN/IN]; c/o: Bigtec Private Limited, 2nd Floor, SID Entrepreneurship, Building, Indian Institute of Science [IISc], Campus, Malleshwaram, Bangalore, Karnataka 560 012 (IN).

(74) Agents: **VIJAYAKRISHNAN, Sindhu** et al.; K & S Partners, 4121/B, 6th Cross, 19th A Main, HAL II, Stage [Extension], Bangalore, Karnataka 560 038 (IN).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))
- of inventorship (Rule 4.17(iv))

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: PROBES AND PRIMERS FOR DETECTION OF DENGUE

(57) Abstract: The present disclosure gives description of a method used for the detection and quantification of dengue viral infection caused by dengue virus using nucleic acids isolated from blood, plasma or serum samples by employing Oligonucleotide probes. The method employed here for detection is by Real time PCR. The instant disclosure also provides for primers, probes, PCR Reaction mixture and kit thereof.

WO 2012/014116 A1

SONDAS Y CEBADORES PARA DETECCIÓN DEL DENGUE

Campo técnico

La presente invención se relaciona con un método para la
5 detección y cuantificación del virus del dengue a partir de muestras de
sangre, plasma o suero empleando sondas de “oligonucleótidos”.

Antecedentes de la invención

La incidencia de dengue ha crecido dramáticamente alrededor
10 del mundo en décadas recientes. Cerca de 2500 millones de personas –
dos quintos de la población mundial – están ahora en riesgo de dengue.
La OMS estima actualmente que hay 50 millones de infecciones de
dengue a nivel mundial cada año. Tan sólo en 2007, hubo más de
890,000 casos de dengue reportados en el Continente Americano, de los
15 cuales 26,000 casos fueron DHF. La enfermedad es ahora endémica en
más de 100 países en África, el Continente Americano, el Mediterráneo
Oriental, Asia del Sureste y el Pacífico Occidental. El sureste de Asia y
el Pacífico Occidental son los más seriamente afectados. Antes de 1970,
sólo nueve países habían experimentado epidemia de DHF, un número
20 que se había incrementado más de cuatro veces para 1995. El dengue es
una infección causada por mosquitos que en décadas recientes se ha
vuelto una gran preocupación de salud pública internacional. El dengue
se encuentra en regiones tropicales y subtropicales alrededor del mundo,
principalmente en áreas urbanas y semiurbanas. La fiebre hemorrágica
25 por dengue (DHF), una complicación potencialmente letal, se reconoció
primero en los años 50's durante epidemia de dengue en las Filipinas y
Tailandia. Actualmente DHF afecta a la mayoría de los países asiáticos y
se ha convertido en una causa principal de hospitalización y muerte entre
niños en la región. DENV es un virus de hebra positiva de ARNss de la
30 familia Flaviviridae, género Flavivirus. También se conoce como fiebre

rompehuesos. Existen cuatro virus distintos pero estrechamente emparentados que causan dengue. La fiebre hemorrágica por dengue (DHF) es una complicación potencialmente letal que se caracteriza por fiebre alta, comúnmente con agrandamiento del hígado, y en casos severos insuficiencia circulatoria. La enfermedad comienza comúnmente con un aumento repentino de temperatura acompañado por enrojecimiento facial y otros síntomas tipo gripe. La fiebre normalmente continúa durante dos a siete días y puede ser tan alta como 41°C, posiblemente con convulsiones y otras complicaciones. No existe un tratamiento específico para la fiebre por dengue. Los métodos actualmente usados para el diagnóstico del dengue se basan en la detección serológica de IgM e IgG anti-dengue en el suero por ELISA. Estos métodos serológicos son incapaces de detectar la infección durante la fase inicial de la enfermedad. Así, existe la necesidad de métodos rápidos y sensibles para la detección de infección del dengue temprano en el curso de la infección para un mejor manejo de los pacientes.

Breve descripción de la invención

En consecuencia, la presente invención se refiere a una sonda que tiene una secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID Nos: 1 ó 2, conjugada opcionalmente con marcadores detectables; un cebador que tiene una secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID Nos. 3 ó 4; una mezcla de reacción de PCR para detección de infección de dengue, la mezcla comprende reactivos de amplificación de ácido nucleico, una sonda que tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada de un grupo que comprende SEQ ID Nos. 1 y 2 o una combinación de sondas de las mismas, y cebadores que tienen secuencias de nucleótidos mostradas como SEQ ID Nos 3 y 4; un método para detectar y opcionalmente cuantificar infección por dengue, el método comprende las etapas de - (a) obtener una mezcla de reacción de PCR que comprenda reactivos de

amplificación de ácido nucleico, una sonda seleccionada de un grupo que comprende SEQ ID NO. 1 y 2 y cebadores que tengan una secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID Nos. 3 y 4, (b) introducir una muestra de prueba en la mezcla de reacción de PCR para amplificación por PCR para obtener copias de la secuencia objetivo, seguida por medir la señal de fluorescencia generada para detectar la infección de dengue y (c) opcionalmente, construir una curva estándar a partir de la señal detectada para cuantificar la infección por dengue; un kit para detectar la infección por dengue, el kit comprende una sonda que tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada de un grupo que comprende SEQ ID Nos. 1 y 2 o una combinación de sondas de las mismas, opcionalmente marcada en el extremo 5' y 3', cebadores que tienen una secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID Nos. 3 y 4, y reactivos de amplificación, opcionalmente junto con un manual de instrucciones; y un método para ensamblar un kit para la detección de infección por dengue, el método comprende la etapa de combinar una sonda que tienen la secuencia de nucleótidos seleccionada de un grupo que comprende SEQ ID Nos. 1 y 2 o una combinación de sondas de las mismas, cebadores que tienen la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID Nos. 3 y 4, y reactivos de amplificación, opcionalmente junto con un manual de instrucciones.

Breve descripción de las figuras

Para que la invención pueda entenderse fácilmente y ponerse en efecto práctico, se hará referencia ahora a modalidades ejemplares como las ilustradas con referencia a las figuras acompañantes. Las figuras junto con una descripción detallada a continuación, se incorporan en y forman parte de la descripción, y sirven para ilustrar más las modalidades y explicar varios principios y ventajas de acuerdo con la presente invención, en donde:

La figura 1 muestra una gráfica de amplificación para serotipos de dengue mediante PCR en tiempo real usando SEQ ID NO. 1.

La figura 2 muestra una gráfica de amplificación para serotipos de dengue en PCR en tiempo real usando SEQ ID NO. 2.

5 La figura 3 muestra una gráfica de amplificación para serotipos de dengue mediante PCR en tiempo real usando cebadores y sonda de laboratorio de referencia nacional.

La figura 4 muestra una curva de dilución logarítmica.

10

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a una sonda que tiene una secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID Nos. 1 ó 2, conjugada opcionalmente con marcadores detectables.

15 En una modalidad de la presente invención, la sonda es para detectar infección por dengue; y en donde los marcadores detectables son fluoróforo en el extremo 5' y extintor o inhibidor en el extremo 3'.

En otra modalidad de la presente invención, el fluoróforo se selecciona de un grupo que comprende fluoresceína, derivados de fluoresceína que consisten en colorantes de 6-carboxi fluoresceína [FAM], VIC, JOE, ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftalen-1-sulfónico, 20 cumarina y derivados de cumarina, amarillo lucifer, rojo Texas, tetrametilrodamina, tetracloro-6-carboxifluoresceína, 5-carboxirodamina y cianina, de preferencia 6-carboxi fluoresceína [FAM]; y el extintor se selecciona de un grupo que comprende tetrametil rodamina, ácido 4'-(4-dimetilaminofenilazo)benzoico, 4-dimetilaminofenilazofenil-4'-maleimida, tetrametilrodamina, carboxitetrametilrodamina y extintor de agujero negro 1 [BHQ], de preferencia extintor de agujero negro 1 (BHQ1).

25 La presente invención se refiere a un cebador que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID Nos. 3 ó 4.

30

En una modalidad de la presente invención, el cebador que tiene la SEQ ID NO. 3 es un cebador encendido y el cebador que tiene la SEQ ID NO. 4 es un cebador antisentido.

5 En otra modalidad de la presente invención, los cebadores corresponden a una sonda que tiene SEQ ID Nos. 1 ó 2; y en donde los cebadores se usan en combinación ya sea con cualquiera de las sondas que tienen SEQ ID NO. 1 o SEQ ID NO. 2.

La presente invención se refiere a una mezcla de reacción por PCR para la detección de infección por dengue, la mezcla comprende reactivos de amplificación de ácido nucleico, una sonda que tiene una
10 secuencia de nucleótidos seleccionada de un grupo que comprende SEQ ID Nos. 1 y 2 o una combinación de sondas de las mismas; y cebadores que tienen una secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID Nos. 3 y 4. En una modalidad de la presente invención, el cebador que tiene la
15 SEQ ID NO. 3 es un cebador en sentido y el cebador que tiene la SEQ ID NO. 4 es un cebador antisentido; y la sonda se conjuga con marcadores detectables que tienen fluoróforo en el extremo 5' y extintor en el extremo 3'.

En otra modalidad de la presente invención, los cebadores
20 corresponden a una sonda que tiene SEQ ID Nos. 1 ó 2; y en donde los cebadores se usan en combinación con cualquiera de las sondas que tienen SEQ ID NO. 1 o SEQ ID NO. 2.

En otra modalidad más de la presente invención, la infección por dengue se selecciona de una muestra seleccionada de un grupo que
25 comprende sangre, plasma y suero o cualquier combinación de los mismos; y los reactivos de amplificación se seleccionan de un grupo que comprende cloruro de magnesio, polimerasa Taq y buffer o cualquier combinación de los mismos.

La presente invención se refiere a un método para detectar y opcionalmente cuantificar la infección por dengue, el método comprende las etapas de:

5 (a) obtener una mezcla de reacción por PCR que comprenda reactivos de amplificación de ácido nucleico, la sonda se selecciona de un grupo que comprende SEQ ID NO. 1 y 2 y cebadores que tengan una secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NOS. 3 y 4;

(b) introducir la muestra de prueba en la mezcla de reacción por PCR para amplificación por PCR para obtener copias de la secuencia
10 objetivo, seguidas por medir la señal de fluorescencia generada para detectar la infección por dengue; y

(c) construir opcionalmente una curva estándar a partir de la señal detectada para cuantificar la infección por dengue.

En una modalidad de la presente invención, el cebador que
15 tiene la SEQ ID NO. 3 es un cebador en sentido y el cebador que tiene la SEQ ID NO. 4 es un cebador antisentido.

En otra modalidad de la presente invención, los cebadores corresponden a una sonda que tiene SEQ ID Nos. 1 ó 2; y en donde los cebadores se usan en combinación con cualquiera de las sondas que
20 tienen SEQ ID NO. 1 o SEQ ID NO. 2.

En otra modalidad más de la presente invención, la muestra de prueba se selecciona de un grupo que comprende sangre, plasma y suero o cualquier combinación de los mismos; y los reactivos de amplificación se seleccionan de un grupo que comprende cloruro de
25 magnesio, polimerasa Taq y buffer o cualquier combinación de los mismos.

En otra modalidad más de la presente invención, la sonda se conjuga con marcadores detectables que tienen fluoróforo en el extremo 5' y extintor en el extremo 3'; y la señal de fluorescencia se genera por

las sondas que tienen fluoróforo en extremo 5' y extintor en el extremo 3'.

En otra modalidad de la presente invención, el fluoróforo se selecciona del grupo que comprende fluoresceína, derivados de fluoresceína que consisten en colorantes de 6-carboxi fluoresceína [FAM], VIC, JOE, ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftalen-1-sulfónico, cumarina y derivados de cumarina, amarillo lucifer, rojo Texas, tetrametilrodamina, tetracloro-6-carboxifluoresceína, 5-carboxirodamina y cianina, de preferencia 6-carboxi fluoresceína [FAM]; y el extintor se selecciona de un grupo que comprende tetrametil rodamina, ácido 4'-(4-dimetilaminofenilazo)benzoico, 4-dimetilaminofenilazofenil-4'-maleimida, tetrametilrodamina, carboxitetrametilrodamina y extintor de agujero negro 1 [BHQ], de preferencia extintor de agujero negro 1 (BHQ1).

La presente invención se refiere a un kit para detectar infección por dengue, el kit comprende una sonda que tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada de un grupo que comprende SEQ ID NOS. 1 y 2, o una combinación de sondas de las mismas, opcionalmente marcada en el extremo 5' y 3'; cebadores que tienen una secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NOS. 3 y 4 y reactivos de amplificación, opcionalmente junto con un manual de instrucciones.

En otra modalidad de la presente invención, la sonda se conjuga con marcadores detectables que tienen fluoróforo en el extremo 5' y extintor en el extremo 3'; y los reactivos de amplificación se seleccionan de un grupo que comprende cloruro de magnesio, polimerasa Taq y buffer o cualquier combinación de los mismos.

La presente invención se refiere a un método para ensamblar un kit para la detección de infección por dengue, el método comprende la etapa de combinar una sonda que tiene la secuencia de nucleótidos seleccionada de un grupo que comprende SEQ ID Nos. 1 y 2 o una

combinación de sondas de las mismas; cebadores que tienen una secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID Nos. 3 y 4; y reactivos de amplificación, opcionalmente junto con manual de instrucciones.

5 Regiones seleccionadas para diseño de cebadores y sondas

En una modalidad de la presente invención, se diseñan cebadores y sondas para una región que se conserva en los cuatro serotipos. Las sondas que tienen SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 2 junto con cebadores que tienen SEQ ID No. 3 y SEQ ID No. 4 pueden detectar
10 los cuatro serotipos del virus del dengue.

El objetivo de la presente invención es la detección de una infección viral por dengue causada por virus del dengue a partir de ARN aislado de la sangre infectada, suero o plasma infectado de una persona infectada. El modo de detección es al monitorear el incremento en
15 fluorescencia mediante PCR en tiempo real usando sondas de “oligonucleótidos” marcados con fluoróforo y extintor.

La presente invención está relacionada con la detección de infección viral por dengue usando sondas de oligonucleótidos y sus cebadores respectivos empleando un método de PCR en tiempo real. Las
20 anteriormente mencionadas sondas de “oligonucleótidos” se conjugan a un fluoróforo en el extremo 5’ y un extintor en el extremo 3’. El fluoróforo usado en la presente invención es FAM (6-carboxi fluoresceína). Aparte de 6-carboxi fluoresceína, se pueden usar otros fluoróforos seleccionados del grupo que comprende fluoresceína y
25 derivados de fluoresceína, FAM, VIC, JOE, ácido 5-(2’-aminoetil)aminonaftalen-1-sulfónico, derivados de cumarina y cumarina, amarillo Lucifer, rojo Texas, tetrametilrodamina, tetracloro-6-carboxifluoresceína, 5-carboxi rodamina y colorantes de cianina también se pueden usar para el marcado.

El extintor usado en la presente invención es BHQ1 (extintor hoyo negro 1). Aparte de BHQ1 también se pueden usar para marcado otros extintores seleccionados del grupo que comprende colorantes de tetrametilrodamina, ácido 4'-(4-dimetilaminofenilazo)benzoico, 4-dimetilaminofenilazofenil-4'-maleimida, tetrametilrodamina, carboxitetrametilrodamina y BHQ.

En otra modalidad de la presente invención, dicho fluoróforo es 6-carboxifluoresceína [FAM] y el extintor es extintor hoyo negro 1 [BHQ1] cuando está presente en el extremo 3'.

De acuerdo con la presente invención, las sondas designadas por SEQ ID NO. 1 o SEQ ID No. 2 junto con cebadores designados como SEQ ID No. 3 y SEQ ID NO. 4 se designan para la detección de infección viral por dengue. La presente invención se relaciona con un método para detectar infección viral por dengue, en donde la mezcla de PCR comprende reactivos de amplificación de ácido nucleico, sondas de oligonucleótidos designadas como SEQ ID No. 1 o SEQ ID NO. 2 junto con sus cebadores correspondientes y la muestra de ARN con dengue se somete para amplificación usando PCR en tiempo real para obtener copias de la secuencia objetivo. La amplificación se mide en términos de incremento en señal de fluorescencia y la cantidad de señal producida se compara con muestras no infectadas.

La detección de la infección por dengue va seguida por la construcción opcional de una curva estándar a partir de la señal detectada para obtener un número de copias para cuantificar la infección por dengue.

De acuerdo con la presente invención se describen sondas de oligonucleótidos que tienen un tamaño que varía de 24-25 nucleótidos. Las sondas diseñadas tienen un fluoróforo en el extremo 5' y un extintor en el extremo 3'.

El fluoróforo en el extremo 5' es FAM (6-carboxifluoresceína) y el extintor es extintor hoyo negro 1 [BHQ1] cuando está presente en el extremo 3'.

5 La presente invención se usa para la detección de infección viral por dengue causada por virus del dengue usando ARN aislado de muestras de sangre, suero o plasma. El método empleado para detección es usando PCR en tiempo real.

De acuerdo con la presente invención la "sonda de oligonucleótidos" se refiere a una secuencia corta de ácido desoxirribonucleico (ADN). La sonda de oligonucleótidos puede hibridar específicamente al ADN objetivo sin exhibir hibridación no específica a ADN no infectado. Las sondas empleadas aquí siguen los principios de química TaqMan. Las sondas TaqMan también llamadas oligonucleótido de doble colorante o sondas marcadas dobles, son el tipo de sondas más
15 ampliamente usado.

Las sondas de oligonucleótidos de acuerdo con la presente invención están provistas además con cebadores en sentido y antisentido respectivos que se pueden usar para amplificar y detectar específicamente infecciones virales por dengue causadas por virus del dengue mediante
20 PCR en tiempo real. Los cebadores reclamados arriba tienen un tamaño que varía de 18-19 nucleótidos. Las sondas y secuencias de cebadores correspondientes para la detección de infección viral por dengue son las mostradas en la siguiente tabla 1.

25

30

Tabla 1

Nombre de secuencia	Secuencia de nucleótidos
SEQ ID No. 1	5'- FAM - AAAGACCAGAGATCCTGCTGTCTC-BHQ1- 3' O 5'- fluoróforo - AAAGACCAGAGATCCTGCTGTCTC - Extintor - 3'
SEQ ID No. 2	5'- FAM - ACGCTGGGAGAGACCAGAGATCCTG -BHQ1- 3' O 5'- fluoróforo - ACGCTGGGAGAGACCAGAGATCCTG - Extintor - 3'
SEQ ID No. 3	5'- GTTAGAGGAGACCCCCCG -3'
SEQ ID No. 4	5'- GCGTTCTGTGCCTGGAATG-3'

Los cebadores y sondas descritos en la presente invención también pueden ser provistos en forma de un kit junto con un manual de instrucciones. El kit contiene reactivos de amplificación por PCR tales como dNTPs, ADN polimerasa Taq, cloruro de magnesio, etc., junto con los cebadores y sondas descritos. Las sondas de oligonucleótidos de acuerdo con la presente invención encuentran aplicación para la detección de infección viral por dengue causada por virus del dengue.

La eficiencia de estas sondas y cebadores para detectar infección viral por dengue se ilustra por los siguientes ejemplos. La presente invención se elabora más mediante los siguientes ejemplos y figuras. Sin embargo, no se debe considerar que estos ejemplos limiten el alcance de la invención.

Ejemplo 1

Se aísla ARN de los cultivos de los cuatro tipos de virus del dengue (virus del dengue tipo 1, virus del dengue tipo 2, virus del dengue tipo 3 y virus del dengue tipo 4) usando un kit de aislamiento de ARN comercial. El ARN purificado se somete a PCR en tiempo real usando sondas ya sea de SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 2 junto con cebadores de SEQ ID No. 3 y 4. Similarmente, el ARN de los cuatro serotipos se prueba con cebadores y sondas diseñados por un laboratorio de referencia nacional para la detección de infección viral por dengue. Las mismas concentraciones de reactivos de PCR en tiempo real, plantilla y cebadores se usan en cada caso y también las condiciones de ciclos se mantienen constantes para todas las reacciones. La composición de mezcla de PCR y condiciones de PCR se indican en la **tabla 2** y **tabla 3**.

15

Tabla 2

Composición de la mezcla para PCR en tiempo real

20

25

30

Composición de mezcla de PCR en tiempo real	
Transcriptasa inversa Superscript III y mezcla de taq ADN polimerasa de platino	0,2 µl
Premezcla comercial	5,0 µl
Cebador Hacia Adelante	0,3 µl (5picomoles)
Cebador Hacia Atrás	0,3 µl (5picomoles)
Sonda	0,2 µl (2picomoles)
Muestra	4,0µl
Volumen total	10 µl

Tabla 3
Condiciones para ciclos de PCR en tiempo real

5	Programa de PCR	
	Etapa 1 (síntesis de ADNc)	50°C durante 10 min
	Etapa 2 (desnaturalización inicial)	95°C durante 120 seg
	Etapa 3 (desnaturalización por ciclos)	95°C durante 15 seg
10	Etapa 4 (fijación y extensión)	60°C durante 34 seg

Las etapas 2 y 3 se repiten 45 veces

15 Los resultados obtenidos demostraron que las sondas designadas como SEQ ID No. 1 y SEQ ID No. 2 detectaron los cuatro tipos de virus del dengue dentro de 45 ciclos (límite de muestra positivo) mostrando 100% de especificidad y sensibilidad (**tabla 4, figura 1, figura 2 y figura 3**). La sonda y cebadores de laboratorio de referencia

20 nacional detectaron sólo los tres virus del dengue en particular virus del dengue tipo 1, virus del dengue tipo 2, virus del dengue tipo 3 y fallaron en detectar virus del dengue tipo 4.

25

30

Tabla 4

5	ID de muestra	Ct SEQ ID No 1	Ct SEQ ID No 2	Ct laboratorio de referencia nacional
	Virus del dengue tipo 1	32,9	33,1	27,15
10	Virus del dengue tipo 2	25,4	26,6	24,16
	Virus del dengue tipo 3	20,4	19,68	19
15	virus del dengue tipo 4	34,7	34	No detectado

Ejemplo 2

20 Se aísla ARN de 25 muestras de suero clínicas usando un kit de aislamiento de ARN comercial. El ARN purificado se somete a PCR en tiempo real usando las sondas designadas como SEQ ID NO. 1 o SEQ ID No. 2 junto con cebadores de SEQ ID NO. 3 y 4, así como los cebadores y sondas designados por laboratorio de referencia nacional.

25 Las mismas concentraciones de reactivos de PCR en tiempo real, plantilla y cebadores se usan en cada caso y también en las condiciones de ciclos se mantienen constantes para todas las reacciones.

Los resultados con las muestras clínicas sugirieron que las sondas designadas como SEQ ID No. 1 y SEQ ID NO. 2 detectaron las 25 muestras clínicas exitosamente, mientras que los cebadores y sonda de

30

laboratorio de referencia nacional pudieron detectar sólo 14 de las 25 muestras clínicas (**tabla 5**). Estos datos soportan fuertemente la sensibilidad de las sondas designadas como SEQ ID No. 1 y SEQ ID No. 2 junto con sus cebadores respectivos para detectar infecciones virales por dengue.

Tabla 5
Valores Ct mediante PCR en tiempo real

10	Nombre de muestra	Ct SEQ ID No 1	Ct SEQ ID No 2	Ct laboratorio de referencia nacional
	Muestra 1	30,9	31,4	33,1
15	Muestra 2	31,7	30,8	32,2
	Muestra 3	31,3	31,9	34,2
	Muestra 4	33,9	33,5	33,1
	Muestra 5	25,3	25,9	26,1
20	Muestra 6	38,5	38,0	No detectado
	Muestra 7	35,8	35,3	No detectado
	Muestra 8	27,7	28,1	29,4
	Muestra 9	30,3	30,8	29,6
25	Muestra 10	32,3	31,9	36,6
	Muestra 11	31,8	32,3	32,1
	Muestra 12	31,9	31,4	30,7

5

10

15

20

Muestra 13	38,7	37,9	No detectado
Muestra 14	35,5	35,1	No detectado
Muestra 15	34,5	35,0	No detectado
Muestra 16	18,95	19,1	20,6
Muestra 17	30,7	31,0	30,69
Muestra 18	36,1	35,8	No detectado
Muestra 19	34,2	33,8	No detectado
Muestra 20	35,63	35,2	No detectado
Muestra 21	32,0	32,4	31,61
Muestra 22	33,03	32,9	No detectado
Muestra 23	31,0	31,3	37,5
Muestra 24	31,4	31,7	No detectado
Muestra 25	35,1	34,8	No detectado

Ejemplo 3

25

30

Se aísla ARN de cuatro muestras de sangre entera obtenidas de pacientes que sufren de fiebre alta ya que los análisis de laboratorio de rutina (pruebas de serología de IgM e IgG) no pudieron confirmar el tipo de infección en estos casos. El ARN purificado se somete a PCR en tiempo real usando las sondas designadas como SEQ ID NO. 1 o SEQ ID No. 2 junto con cebadores de SEQ ID No. 3 y 4. Los resultados obtenidos mostraron que las sondas designadas como SEQ ID No. 1 y SEQ ID No. 2 pudieron detectar las 4 muestras de sangre clínicas como positivas para infección por dengue (**tabla 6**). Los valores Ct obtenidos

para estas muestras fueron muy tardíos indicando que los pacientes están en la etapa inicial de la infección y que es la razón para la falla de los análisis de laboratorio de rutina.

5

Tabla 6
Valores Ct mediante PCR en tiempo real

Nombre de muestra	Ct SEQ ID No 1	Ct SEQ ID No 2
Paciente 1	38,0	37,2
Paciente 2	36,5	36,9
Paciente 3	35,8	35,3
Paciente 4	37,4	37,1

10

15

Ejemplo 4

Este estudio se hace para poder demostrar que muestras de plasma uniformes se usan para la detección de infecciones por dengue. Se aísla ARN de 5 muestras de plasma clínicas usando un kit comercial. El ARN extraído se somete a PCR en tiempo real usando sondas designadas como SEQ ID NO. 1 o SEQ ID NO. 2 junto con cebadores de SEQ ID No. 3 y 4. Los resultados obtenidos mostraron que las sondas designadas como SEQ ID No. 1 y SEQ ID No. 2 pudieron detectar todas las 5 muestras de plasma clínicas como positivas para infección por dengue (tabla 7).

20

25

30

Tabla 7
Valores Ct mediante PCR en tiempo real

Nombre de muestra	Ct SEQ ID No 1	Ct SEQ ID No 2
Muestra 1	28,1	27,5
Muestra 2	30,3	30,9
Muestra 3	26,9	27,3
Muestra 4	36,5	36,4
Muestra 5	32,6	33,0

Ejemplo 5

También se puede cuantificar la carga viral de una muestra infectada al comparar los valores Ct obtenidos a partir de una curva estándar.

Protocolo para el cálculo del número de copias virales

Alrededor de 25 microlitros de mezcla de reacción por PCR que contiene ARN de dengue se someten a PCR junto con los cebadores respectivos usando una máquina de PCR convencional. Después de la PCR las muestras amplificadas se corren en un gel de agarosa y se tiñen con bromuro de etidio. La banda de amplicón es luego extirpada del gel y purificada usando un kit de extracción en gel Qiaquick. La absorbancia (amplicón de 2 µl) se estima a 260 nm usando una nanogota. El coeficiente de extinción del amplicón se calcula a partir de un coeficiente de base individual por suma.

Nanomoles de amplicón se calculan usando la siguiente ecuación:

$$\text{nmoles/ml} = \frac{1,000 \times \text{OD260 (1 cm)} \times 1 \text{ ml (vol)}}{\text{Coeficiente de extinción de amplicón}}$$

El número de copias se calcula usando la fórmula:

$$\text{Número de copias/ml} = (\text{moles/ml}) \times \text{número de Avogadro}$$

5 A partir del número de copias del amplicón puro se genera una curva estándar al hacer diluciones 10^{12} a 10^3 del amplicón usando PCR en tiempo real. A partir del Ct obtenido de la curva estándar, el número de copias virales puede calcularse para muestras desconocidas (figura 4 y tabla 8).

10

Tabla 8
Valores de curva de dilución logarítmica con respecto a Ct

15

20

25

30

Dilución log10	Dilución por 4µl tomada para PCR	ADN tomado por PCR	Ct Seq ID no.1	Ct Seq ID no.2
1,00E+12	3,90E+09	9,591065	12,36	12,37
1,00E+10	3,90E+07	7,591065	16,23	16,72
1,00E+08	3,90E+05	5,591065	23,16	22,68
1,00E+07	3,90E+04	4,591065	26,13	26,38
1,00E+06	3,90E+03	3,591065	30,95	31,37
1,00E+05	3,90E+02	2,591065	34,57	35,6
1,00E+04	3,90E+01	1,591065	34,86	37,38
1,00E+03	3,90E+00	0,591065	38,23	35,35

Conclusión

1. Las sondas de oligonucleótidos, SEQ ID NO. 1 y SEQ ID No. 2 detectaron todos los cuatro tipos de virus del dengue demostrando que son 100% específicas y 100% sensibles.
- 5 2. La sonda de laboratorio de referencia nacional detectó sólo 3 virus del dengue, en particular virus del dengue tipo 1, virus del dengue tipo 2, virus del dengue tipo 3 y no pudo detectar virus del dengue tipo 4.
- 10 3. Las sondas de oligonucleótidos, SEQ ID No. 1 y SEQ ID NO. 2 junto con sus cebadores respectivos son más sensibles para detectar las muestras clínicas en comparación con las sondas y cebadores de laboratorio de referencia nacional.
- 15 4. Finalmente, las sondas, SEQ ID No. 1 y 2 SEQ ID No. 2 junto con sus cebadores respectivos pueden detectar los casos de infecciones virales por dengue en muestras de sangre, plasma o suero de manera efectiva.

REIVINDICACIONES

1. Una sonda caracterizada porque consiste en una secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID Nos. 1 ó 2, conjugada
5 opcionalmente con marcadores detectables.

2. La sonda de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque es para detectar infección por dengue; y en donde los marcadores detectables son fluoróforo en el extremo 5' y extintor en
10 el extremo 3'.

3. La sonda de conformidad con la reivindicación 2, caracterizada porque el fluoróforo se selecciona de un grupo que comprende fluoresceína, derivados de fluoresceína que consisten en
15 colorantes de 6-carboxi fluoresceína [FAM], VIC, JOE, ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftalen-1-sulfónico, cumarina y derivados de cumarina, amarillo lucifer, rojo Texas, tetrametilrodamina, tetracloro-6-carboxifluoresceína, 5-carboxirrodamina y cianina, de preferencia 6-carboxi fluoresceína [FAM]; y el extintor se selecciona de un grupo que
20 comprende tetrametilrodamina, ácido 4'-(4-dimetilaminofenilazo)benzoico, 4-dimetilaminofenilazofenil-4'-maleimida, tetrametilrodamina, carboxitetrametilrodamina y colorantes de extintor de agujero negro 1 [BHQ], de preferencia extintor de agujero negro 1 (BHQ1).

25

4. Un cebador caracterizado porque consiste en una secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID Nos. 3 ó 4.

5. El cebador de conformidad con la reivindicación 4,
30 caracterizado porque el cebador que consiste en SEQ ID NO. 3 es un

cebador en sentido y el cebador que consiste en SEQ ID No. 4 es un cebador antisentido.

5 6. El cebador de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque los cebadores corresponden a una sonda que consiste en SEQ ID Nos. 1 ó 2; y en donde los cebadores se usan en combinación ya sea con la sonda que consiste en SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 2.

10 7. Una mezcla de reacción por PCR para la detección de infección por dengue, la mezcla se caracteriza porque comprende reactivos de amplificación de ácido nucleico, una sonda que consiste en la secuencia de nucleótidos seleccionada de un grupo que comprende SEQ ID Nos. 1 y 2 o una combinación de sondas de las mismas; y
15 cebadores que consisten en la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID Nos. 3 y 4.

 8. La mezcla de reacción de conformidad con la reivindicación 7, caracterizada porque el cebador que consiste en SEQ ID
20 No. 3 es un cebador en sentido y el cebador que consiste en SEQ ID No. 4 es un cebador antisentido; y la sonda se conjuga con marcadores detectables que tienen fluoróforo en el extremo 5' y extintor en el extremo 3'.

25 9. La mezcla de reacción de conformidad con la reivindicación 7, caracterizada porque los cebadores corresponden a una sonda que consiste en SEQ ID Nos. 1 ó 2; y en donde los cebadores se usan en combinación ya sea con la sonda que consiste en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO. 2.

27

10. La mezcla de reacción de conformidad con la reivindicación 7, caracterizada porque la infección por dengue se detecta a partir de una muestra seleccionada de un grupo que comprende sangre, plasma y suero o cualquier combinación de los mismos; y los reactivos de
5 amplificación se seleccionan de un grupo que comprende cloruro de magnesio, polimerasa Taq y buffer o cualquier combinación de los mismos.

11. Un método para detectar y opcionalmente cuantificar
10 infección por dengue, el método se caracteriza porque comprende las etapas de:

(a) obtener una mezcla de reacción por PCR que comprende reactivos de amplificación de ácido nucleico, una sonda seleccionada de un grupo que comprende SEQ ID No. 1 y 2 y cebadores que consistan en
15 una secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID Nos. 3 y 4,

(b) introducir una muestra de prueba en la mezcla de reacción por PCR para amplificación por PCR para obtener copias de la secuencia objetivo, seguida por medir la señal de fluorescencia generada para detectar la infección por dengue; y

20 (c) opcionalmente, construir una curva estándar a partir de la señal detectada para cuantificar la infección por dengue.

12. El método de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado porque el cebador que consiste en SEQ ID No. 3 es un
25 cebador en sentido y el cebador que consiste en SEQ ID No. 4 es un cebador antisentido.

13. El método de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado porque los cebadores corresponden a una sonda que
30 consiste en SEQ ID Nos. 1 ó 2; y en donde los cebadores se usan en

combinación ya sea con la sonda que consiste en SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 2.

14. El método de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado porque la muestra de prueba se selecciona de un grupo que comprende sangre, plasma y suero o cualquier combinación de los mismos; y los reactivos de amplificación se seleccionan de un grupo que comprende cloruro de magnesio, polimerasa Taq y buffer o cualquier combinación de los mismos.

10

15. El método de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado porque la sonda se conjuga con marcadores detectables que tienen fluoróforo en el extremo 5' y extintor en el extremo 3'; y la señal de fluorescencia se genera por las sondas que tienen fluoróforo en el extremo 5' y extintor en el extremo 3'.

15

16. El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque el fluoróforo se selecciona de un grupo que comprende fluoresceína, derivados de fluoresceína que consisten en colorantes de 6-carboxi fluoresceína [FAM], VIC, JOE, ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftalen-1-sulfónico, cumarina y derivados de cumarina, amarillo lucifer, rojo Texas, tetrametilrodamina, tetracloro-6-carboxifluoresceína, 5-carboxirrodamina y cianina, de preferencia 6-carboxi fluoresceína [FAM]; y el extintor se selecciona de un grupo que comprende tetrametilrodamina, ácido 4'-(4-dimetilaminofenilazo)benzoico, 4-dimetilaminofenilazofenil-4'-maleimida, tetrametilrodamina, carboxitetrametilrodamina y colorantes de extintor de agujero negro 1 [BHQ], de preferencia extintor de agujero negro 1 (BHQ1).

20

25

30

17. Un kit para detectar infección por dengue, el kit se caracteriza porque comprende una sonda que tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada de un grupo que comprende SEQ ID Nos. 1 y 2 o una combinación de sondas de los mismos, marcado opcionalmente en el extremo 5' y 3'; cebadores que consisten en la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID Nos. 3 y 4; y reactivos de amplificación, opcionalmente junto con manual de instrucciones.

18. El kit de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque la sonda se conjuga con marcadores detectables que tienen fluoróforo en el extremo 5' y extintor en el extremo 3'; y los reactivos de amplificación se seleccionan de un grupo que comprende cloruro de magnesio, polimerasa Taq y buffer o cualquier combinación de los mismos.

19. Un método para ensamblar un kit para la detección de infección por dengue, el método se caracteriza porque comprende la etapa de combinar una sonda que consiste en una secuencia de nucleótidos seleccionada de un grupo que comprende SEQ ID Nos. 1 y 2 o una combinación de sondas de las mismas; cebadores que consisten en la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID Nos. 3 y 4; y reactivos de amplificación, opcionalmente junto con un manual de instrucciones.

RESUMEN DE LA INVENCION

5 La presente invención describe un método que se usa para la detección y cuantificación de infección viral por dengue causada por el virus del dengue usando ácidos nucleicos aislados de muestras de sangre, plasma o suero al emplear sondas de oligonucleótidos. El método empleado en la presente para la detección es mediante PCR en tiempo real. La presente invención también proporciona cebadores, sondas, mezcla de reacción por PCR y kit de la misma.

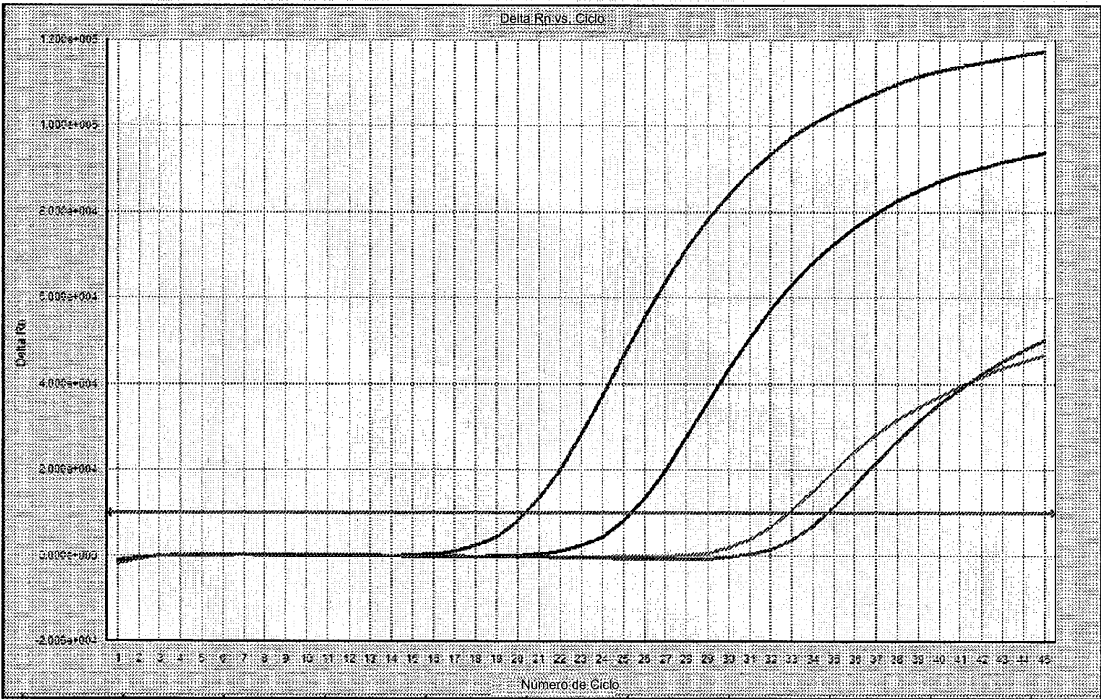


Figura 1

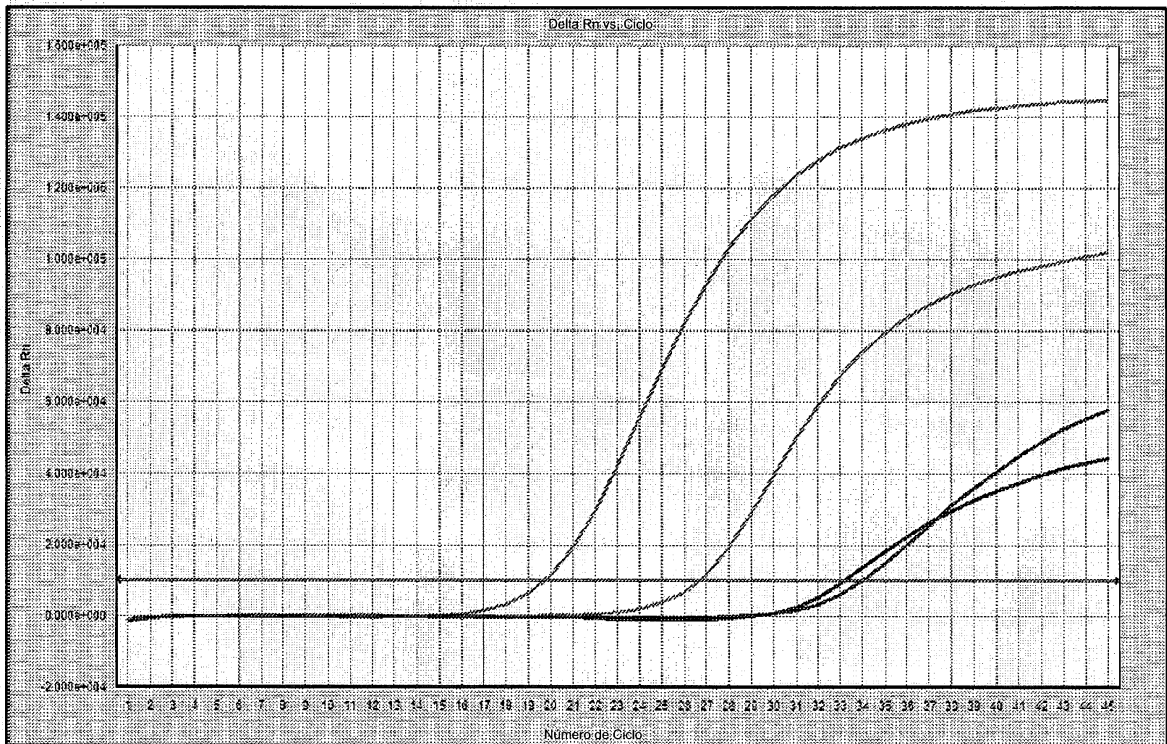


Figura 2

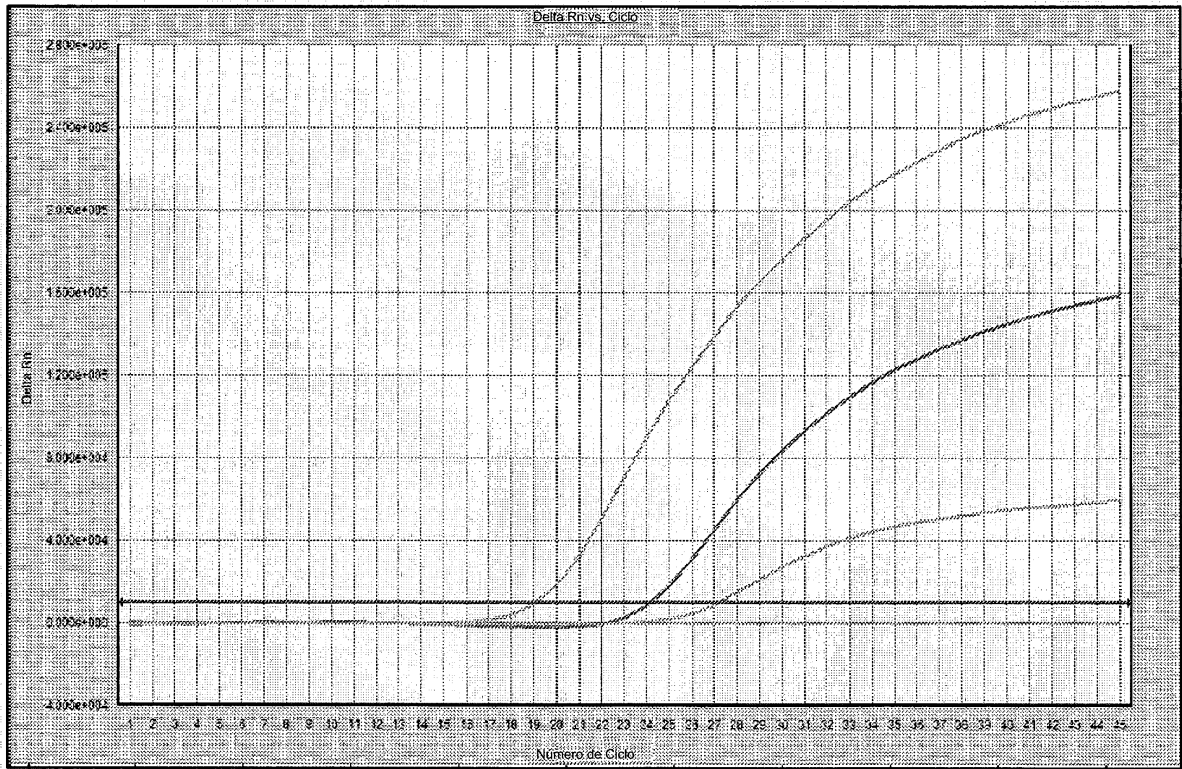


Figura 3

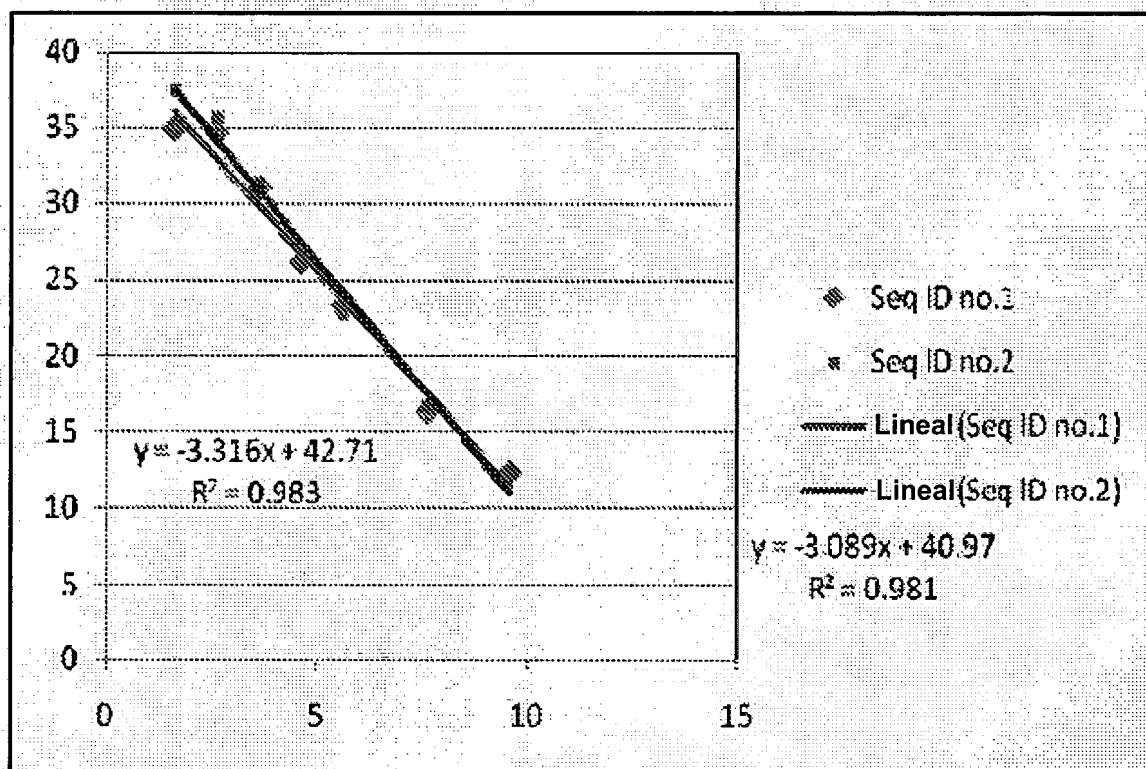


Figura 4

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BIGTEC PRIVATE LIMITED

<120> SONDAS Y CEBADORES PARA DETECCIÓN DE DENGUE

<130> IP14679

<150> 2162/CHE/2010

<151> 2010-07-29

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 24

<212> ADN

<213> virus de Dengue

<220>

<221> gen

<222> (1)..(24)

<400> 1

aaagaccaga gatcctgctg tctc

24

<210> 2

<211> 25

<212> ADN

<213> virus de Dengue

<220>

<221> gen

<222> (1)..(25)

<400> 2

acgctgggag agaccagaga tcctg

25

<210> 3

<211> 18

<212> ADN

<213> virus de Dengue

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(18)

<400> 3
gttagaggag accccccg
18

<210> 4
<211> 19
<212> ADN
<213> virus de Dengue

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(19)

<400> 4
gcgttctgtg cctggaatg
19

Id.236616/WPC17626
COLO 17626 841 006 3

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA RELACIÓN DE ANEXOS	
Dependencia:		Fecha: ____/____/____ AAAA MM DD	Recorrido:
Tipo de Radicación: Entrada: ☐ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐		Planilla:	
Radicador:			

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1			
2			
3			
4	02-39902-0		
5			
6	281116-0		
7	13-39902-0		
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	Soporte Documental
7	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
10	Otro

Observaciones:

Folio 37 CD en sobre blanco
Listado de frecuencias

38

PATENT COOPERATION TREATY
PCT
INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY
(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)
(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PCT1133-SV	FOR FURTHER ACTION See Form PCT/IPEA/416	
International application No. PCT/IB2011/053164	International filing date (<i>day/month/year</i>) 15 July 2011	Priority date (<i>day/month/year</i>) 29 July 2010
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC Int. Cl. C12Q 1/68 (2006.01)		
Applicant BIGTEC PRIVATE LIMITED et al		

1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of **5** sheets, including this cover sheet.

3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising:

a. ☒ (*sent to the applicant and to the International Bureau*) a total of **16** sheets, as follows:

☒ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority, unless those sheets were superseded or cancelled, and any accompanying letters (see Rules 46.5, 66.8, 70.16, 91.2, and Section 607 of the Administrative Instructions).

☐ sheets containing rectifications not taken into account by this Authority because they were not available at the time when this Authority began to draw up this report, and any accompanying letters (Rules 66.4*bis*, 70.2(e), 70.16 and 91.2).

☐ Superseded sheets and any accompanying letters, where this Authority either considers that the superseding sheets contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, or the superseding sheets were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box (see Rule 70.16(b)).

b. ☐ (*sent to the International Bureau only*) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see paragraph 3*bis* of Annex C of the Administrative Instructions).

4. This report contains indications relating to the following items:

☒	Box No. I	Basis of the report
☐	Box No. II	Priority
☐	Box No. III	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
☐	Box No. IV	Lack of unity of invention
☒	Box No. V	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
☐	Box No. VI	Certain documents cited
☐	Box No. VII	Certain defects in the international application
☐	Box No. VIII	Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 23 January 2012	Date of completion of this report 19 March 2012
Name and mailing address of the IPEA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaustalia.gov.au Facsimile No. +61 2 6283 7999	Authorized Officer DAMIAN TRIFFETT AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. +61 2 6283 2845

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/IB2011/053164

Box No. I	Basis of the report
1.	With regard to the language, this report is based on: ☒ The international application in the language in which it was filed ☐ A translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of: ☐ international search (under Rules 12.3(a) and 23.1 (b)). ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a)). ☐ international preliminary examination (Rules 55.2(a) and/or 55.3(a) and (b)).
2.	With regard to the elements of the international application, this report is based on (<i>replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report</i>): ☐ the international application as originally filed/furnished ☒ the description: pages 1-16 as originally filed/furnished pages* received by this Authority on _____ with the letter of _____ pages* received by this Authority on _____ with the letter of _____ ☒ the claims: pages as originally filed/furnished pages* as amended (together with any statement) under Article 19 pages* 17-19 received by this Authority on 23/01/12 with the letter of 23/01/12 pages* received by this Authority on _____ with the letter of _____ ☒ the drawings: pages 1/4-4/4 as originally filed/furnished pages* received by this Authority on _____ with the letter of _____ pages* received by this Authority on _____ with the letter of _____ ☒ a sequence listing - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing.
3.	The amendments have resulted in the cancellation of: ☐ the description, pages ☐ the claims, Nos. ☐ the drawings, sheets/figs ☐ the sequence listing (<i>specify</i>):
4.	☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since either they are considered to go beyond the disclosure as filed, or they were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rules 70.2(c) and (c-bis)): ☐ the description, pages ☐ the claims, Nos. ☐ the drawings, sheets/figs ☐ the sequence listing (<i>specify</i>):
5.	☐ This report has been established: ☐ taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rules 66.1(d-bis) and 70.2(e)). ☐ without taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rules 66.4bis and 70.2(e)).
6.	☐ Supplementary international search report(s) from Authority(ies) _____ has/have been received and taken into account in establishing this report (Rule 45bis.8(b) and (c)).
* If item 4 applies, some or all of those sheets may be marked "superseded."	

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/IB2011/053164

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims 1-19	YES
	Claims NONE	NO
Inventive step (IS)	Claims 1-19	YES
	Claims NONE	NO
Industrial applicability (IA)	Claims 1-19	YES
	Claims NONE	NO

2. Citations and explanations (Rule 70.7)

The following documents cited in the International Search Report have been considered in the preparation of this International Preliminary Report on Patentability (Chapter II of the PCT):

D1: US 2006/0172325 A1 (BROWNSTEIN et al) 3 August 2006
D2: WO 2007/130519 A2 (GOVERNMENT OF THE USA, as represented by THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 15 November 2007
D3: WO 2005/030800 A2 (AVI BIOPHARMA, INC.) 7 April 2005
D4: US 2009/0176236 A1 (YOUNG) 9 July 2009

NOVELTY (N)

Claim 1-19 meet the requirements of Article 33(2) of the PCT with regard to novelty in view of any one of D1-D4.

D1 discloses SEQ ID NO:520 which is a 52bp antisense nucleic acid probe which comprises a sequence (27bp-51bp) which is 100% identical to SEQ ID NO:2 of the current invention (Claim 3). In addition D1 discloses the use of such probes to detect Dengue virus (Claim 12) and the use of detectable labels on the amplified target before hybridisation to the probe (Claims 17 and 18).

D2 discloses SEQ ID NO:984 which is a 60bp sequence which comprises a sequence (12bp-35bp) which is 100% identical to SEQ ID NO:1 of the current invention (Sequence Listing).

D3 discloses SEQ ID NO:31 which is an 112bp sequence which comprises a sequence (25bp-48bp) which is 100% identical to SEQ ID NO:1 of the current invention (Sequence Listing).

D4 discloses SEQ ID NO:840 which is a 28bp primer which comprises a sequence (10bp-27bp) which is 100% identical to SEQ ID NO:3 of the current invention. Furthermore D1 discloses that the sequence is a conserved sequence in 3' untranslated region of the genome of Dengue virus type 1 (Sequence Listing).

Claims 1-19 are considered novel in view of any one of D1-D4, as none of D1-D4 disclose probes consisting of nucleotide sequences set forth as SEQ ID NO's 1 or 2, primers consisting of nucleotides set forth as SEQ ID NO's 3 or 4, and the use of such probes and primers in reaction mixtures, methods or kits for detecting dengue infection using PCR amplification.

(Continued in Supplemental Box)

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/IB2011/053164

Supplemental Box Relating to Sequence Listing

Continuation of Box No. I, item 2:

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this report was established on the basis of a sequence listing filed or furnished:
- a. (means)
- ☐ on paper
- ☒ in electronic form
- b. (time)
- ☐ in the international application as filed
- ☒ together with the international application in electronic form
- ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search and/or examination
- ☐ to this Authority as an amendment* on
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

* If item 4 in Box No. I applies, the sequence listing, which forms part of the basis of the report, may be marked "superseded."

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.
Continuation of: Box V

INVENTIVE STEP (IS)

Claim 1-19 meet the requirements of Article 33(3) of the PCT with regard to inventive step of any one of D1-D4.

D1 is regarded as the closest prior art to Claims 1-3 and 7-19. D1 fails to disclose probes consisting of nucleotide sequences set forth as SEQ ID NO's 1 or 2. D4 is regarded as the closest prior art to Claims 4-6. D4 fails to disclose probes consisting of nucleotide sequences set forth as SEQ ID NO's 3 or 4. The technical problem to be solved is regarded as the need for rapid and sensitive methods for detection of dengue infection early in the course of infection for better patient management. It would not be obvious to a person skilled in the art in view of any one of D1-D4, to modify the sequences disclosed in D1-D4 to probes consisting of any one of the SEQ ID NO's 1-4 for use as dual-labelled probes in a PCR reaction. Therefore Claims 1-19 are inventive in view of any one of D1-D4.

INDUSTRIAL APPLICABILITY (IA)

The invention defined in the claims is considered to meet the requirements of Industrial Applicability under Article 33(4) of the PCT because it can be made by, or used in, industry.

We claim:

- 1) Probe consisting of nucleotide sequence set forth as SEQ ID Nos. 1 or 2, optionally conjugated with detectable labels.
- 2) The probe as claimed in claim 1, wherein the probe is for detecting dengue infection; and wherein the detectable labels are fluorophore at 5' end and quencher at 3' end.
- 3) The probe as claimed in claim 2, wherein the fluorophore is selected from a group comprising fluorescein, fluorescein derivatives consisting of 6-Carboxy Fluorescein [FAM], VIC, JOE, 5-(2'-aminoethyl)aminonaphthalene-1-sulphonic acid, coumarin and coumarin derivatives, lucifer yellow, texas red, tetramethylrhodamine, tetrachloro-6-carboxyfluorescein, 5-carboxyrhodamine and cyanine dyes, preferably 6-Carboxy Fluorescein [FAM]; and the quencher is selected from a group comprising tetra methyl rhodamine, 4'-(4-dimethylaminophenylazo)benzoic acid, 4-dimethylaminophenyl azophenyl-4'-maleimide, tetramethylrhodamine, carboxytetramethyl rhodamine and black hole quencher 1 [BHQ] dyes, preferably black hole quencher 1 (BHQ1).
- 4) Primer consisting of nucleotide sequence set forth as SEQ ID Nos. 3 or 4.
- 5) The primer as claimed in claim 4, wherein the primer consisting of the SEQ ID No. 3 is sense primer and the primer consisting of the SEQ ID No. 4 is an antisense primer.
- 6) The primer as claimed in claim 4, wherein the primers correspond to probe consisting of SEQ ID Nos. 1 or 2; and wherein the primers are used in combination with either the probe consisting of SEQ ID No. 1 or SEQ ID No. 2.
- 7) A PCR reaction mixture for detection of dengue infection, said mixture comprising nucleic acid amplification reagents, probe consisting of nucleotide sequence selected from a group comprising SEQ ID Nos. 1 and 2 or a combination of probes thereof; and primers consisting of nucleotide sequence set forth as SEQ ID Nos. 3 and 4.
- 8) The reaction mixture as claimed in claim 7, wherein the primer consisting of the SEQ ID No. 3 is sense primer and the primer consisting of the SEQ ID No. 4 is antisense primer; and the probe is conjugated with detectable labels having fluorophore at 5' end and quencher at 3' end.
- 9) The reaction mixture as claimed in claim 7, wherein the primers correspond to probe consisting of SEQ ID Nos. 1 or 2; and wherein the primers are used in combination with either the probe consisting of SEQ ID No. 1 or SEQ ID No. 2.
- 10) The reaction mixture as claimed in claim 7, wherein the dengue infection is detected from sample selected from a group comprising blood, plasma and serum or any combination

REPLACEMENT SHEETS UNDER ARTICLE 34

thereof; and the amplification reagents are selected from a group comprising magnesium chloride, Taq polymerase and buffer or any combination thereof.

- 11) A method of detecting and optionally quantifying dengue infection, said method comprising acts of:
 - (a) obtaining a PCR reaction mixture comprising nucleic acid amplification reagents, probe selected from a group comprising SEQ ID No.1 and 2 and primers consisting of nucleotide sequence set forth as SEQ ID Nos. 3 and 4;
 - (b) introducing test sample to the PCR reaction mixture for PCR amplification to obtain copies of target sequence, followed by measuring fluorescence signal generated for detecting the dengue infection; and
 - (c) optionally, constructing a Standard Curve from the detected signal for quantifying the dengue infection.
- 12) The method as claimed in claim 11, wherein the primer consisting of SEQ ID No. 3 is sense primer and the primer consisting of SEQ ID No. 4 is an antisense primer.
- 13) The method as claimed in claim 11, wherein the primers correspond to probe consisting of SEQ ID Nos. 1 or 2; and wherein the primers are used in combination with either the probe consisting of SEQ ID No. 1 or SEQ ID No. 2.
- 14) The method as claimed in claim 11, wherein the test sample is selected from a group comprising blood, plasma and serum or any combination thereof; and the amplification reagents are selected from a group comprising magnesium chloride, Taq polymerase and buffer or any combination thereof.
- 15) The method as claimed in claim 11, wherein the probe is conjugated with detectable labels having fluorphore at 5' end and quencher at 3' end; and the fluorescence signal is generated by the probes having fluorphore at 5' end and quencher at 3' end.
- 16) The method as claimed in claim 15, wherein the fluorophore is selected from a group comprising fluorescein, fluorescein derivatives consisting of 6-Carboxy Fluorescein [FAM], VIC, JOE, 5-(2'-aminoethyl)aminonaphthalene-1-sulphonic acid, coumarin and coumarin derivatives, lucifer yellow, texas red, tetramethylrhodamine,, tetrachloro-6-carboxyfluorescein, 5-carboxyrhodamine and cyanine dyes, preferably 6-Carboxy Fluorescein [FAM]; and the quencher is selected from a group comprising tetra methyl rhodamine, 4'-(4-dimethylaminophenylazo)benzoic acid, 4-dimethylaminophenyl azophenyl-4'-maleimide, tetramethylrhodamine, carboxytetramethyl rhodamine and black hole quencher 1 [BHQ] dyes, preferably black hole quencher 1 (BHQ1).

REPLACEMENT SHEETS UNDER ARTICLE 34

- 45
- 17) A kit for detecting dengue infection, said kit comprising probe having nucleotide sequence selected from a group comprising SEQ ID Nos. 1 and 2 or a combination of probes thereof, optionally labeled at 5' and 3' end; primers consisting of nucleotide sequence set forth as SEQ ID Nos. 3 and 4; and amplification reagents, optionally along with instruction manual.
- 18) The kit as claimed in claim 17, wherein the probe is conjugated with detectable labels having flurophore at 5' end and quencher at 3' end; and the amplification reagents are selected from a group comprising magnesium chloride, Taq polymerase and buffer or any combination thereof.
- 19) A method of assembling a kit for detection of dengue infection, said method comprising step of combining probe consisting of nucleotide sequence selected from a group comprising SEQ ID Nos. 1 and 2 or a combination of probes thereof; primers consisting of nucleotide sequence set forth as SEQ ID Nos. 3 and 4; and amplification reagents, optionally along with instruction manual.



Intellectual Property Attorneys

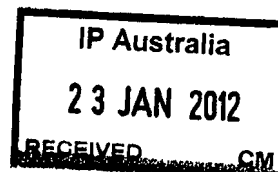
LODGEMENT UNIT		
A)	\$.....277.....	Payable
B)	\$.....0.....	Received
C)	\$.....777.....	Underpaid
D)	\$.....—.....	Overpaid
FANG BATCH No:		
595010		

January 18, 2012

DAMIAN TRIFFETT
Authorized Officer
Australian Patent Office
PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA

TEL # +61 2 6283 2845
FAX # +61 2 6283 7999
E-mail: pct@ipaustalia.gov.au

VIA COURIER



Re: RESPONSE TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND WRITTEN
OPINION UNDER ARTICLE 34
International PCT Application No. PCT/IB2011/053164
Filed on: 15th July 2011
Claiming priority of Indian Patent Application No. 2162/CHE/2010 dated 29th July 2010
Title: PROBES AND PRIMERS FOR DETECTION OF DENGUE
Applicant: BIGTEC PRIVATE LIMITED
Our Ref.: PCT1133/SV/as

Dear Sir,

We write with reference to the above-identified PCT Application.

The applicant is now desirous of commencing International Preliminary Examination on this application. Accordingly, we enclose herewith a PCT Demand under Article 31 for Preliminary Examination electing "AU" as Examining Authority.

The prescribed fee of AUD 777 will be sent to you separately. As per the new rationalization of the International Preliminary Examination procedure at the AU, we request the Examiner to carry-out detailed examination.

We request the Examiner to take the Demand on record and proceed further in this matter.

Bangalore Office:

4121/B, 6th Cross, 19A Main, HAL II Stage (Extension), Bangalore – 560 038, India.
Ph: 91-80-40427900 Fax: 91-80-40427901 E-Mail: bangalore@knspartners.com

Gurgaon Office:

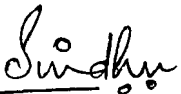
109, Sector 44, Gurgaon 122 003, National Capital Region, India.
Tel.: +91 (124) 4708 700 Fax: +91 (124) 4708 760/770/780
E-Mail: postmaster@knspartners.com, gurgaon@knspartners.com

www.knspartners.com

47

Kindly acknowledge receipt of the demand and we will pay the fees within one month from the demand date.

Yours faithfully,


VIJAYAKRISHNAN, Sindhu
IN/PA-1726

Enclosure: PCT Demand;
Fee Calculation Sheet;
Copy of the response to combined ISR and WO;
Two copies of Clear version & One copy of Marked-up version of the claims; and
Copy of Replaced Sheets

Cc: International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20
SWITZERLAND

Tel # 0041-22-338-8316, 0041-22-338-8012
Fax # 0041-22-910 0610



Intellectual Property Attorneys

January 18, 2012

VIA COURIER

The International Bureau of WIPO

34, Chemin des Colombettes
1211 Geneva 20
SWITZERLAND

Tel # 004122 338 8316, 0041-22-338-8012

Fax # 0041-22-910-0610

E-mail: ro.ib@wipo.int

Re: RESPONSE TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
WRITTEN OPINION UNDER ARTICLE 34
International PCT Application No. PCT/IB2011/053164
Filed on: 15th July 2011
Claiming priority of Indian Patent Application No. 2162/CHE/2010 dated 29th July 2010
Title: PROBES AND PRIMERS FOR DETECTION OF DENGUE
Applicant: BIGTEC PRIVATE LIMITED
Our Ref.: PCT1133/SV/as

Dear Sir,

In response to the combined International Search Report and Written Opinion transmitted on 19 October 2011 we are submitting herewith a response.

CLAIMS (Art. 34)

1
4 to 9
11 to 13
17
19

CLAIMS AS CURRENTLY AMENDED

amended
amended
amended
amended
amended

The Applicant believes that the response is timely filed.

Bangalore Office:

4121/B, 6th Cross, 19A Main, HAL II Stage (Extension), Bangalore – 560 038, India.
Ph: 91-80-40427900 Fax: 91-80-40427901 E-Mail: bangalore@knspartners.com

Gurgaon Office:

109, Sector 44, Gurgaon 122 003, National Capital Region, India.
Tel.: +91 (124) 4708 700 Fax: +91 (124) 4708 760/770/780
E-Mail: postmaster@knspartners.com, gurgaon@knspartners.com

www.knspartners.com

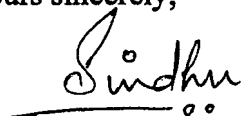
49

If any information is required, the Authorized officer is respectfully requested to contact:

VIJAYAKRISHNAN Sindhu
K & S PARTNERS
#4121/B, 6th Cross, 19A Main, HAL II Stage [Extension]
Bangalore 560 038, Karnataka, India
Ph: 91-080-4042-7900
Fax: 91-080-4042-7901
e-mail: bangalore@knspartners.com

With regards,

Yours sincerely,



VIJAYAKRISHNAN Sindhu
IN/PA-1726

Encl: **Response to ISR & WO;**
Two copies of Clear version & One copy of Marked-up version of the claims,
Replaced Sheets; and
A copy of demand to IPEA

CC: **DAMIAN TRIFFETT**
Authorized Officer
Australian Patent Office
PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA

TEL # +61 2 6283 2845
FAX # +61 2 6283 7999
E-mail: pct@ipaaustralia.gov.au

50

BEFORE THE INTERNATIONAL SEARCH AUTHORITY

Re: International Patent Application No. PCT/IB2011/053164

International Filing Date: 15 July 2011

Priority Application No.: 2162/CHE/2010 dated 29.07.2010

Title: PROBES AND PRIMERS FOR DETECTION OF DENGUE

Our Ref: PCT 1133/SV/as

Applicant: BIGTEC PRIVATE LIMITED

RESPONSE TO ISR AND WO UNDER ARTICLE 34

The Applicant respectfully provides the comments to highlight the novel and inventive features of the present disclosure in view of the objections raised by the esteemed Authorised Officer. The Authorised Officer at the Australian Patent Office has already acknowledged Industrial Applicability for all the claims.

The Applicant has considered the citations and explanations provided by the Authorised Officer while filing the response to the International Search Report [ISR] and Written Opinion [WO]. In view of the objections raised by the Authorised Officer, the Applicant would like to respectfully provide their comments. The Applicant would like to address the objections raised in the ISR & WO in view of the amended claims submitted herein alongside this response. The Applicant also requests the Authorised Officer to consider the amended set of claims enclosed herein. A marked up and clear version of the claims has been enclosed along with the response.

The Applicant would like to humbly state initially that the cited documents in the International Search Report and Written Opinion pertain to detection of nucleic acids in biological samples and methods of uses thereof. The present invention relates specifically to a set of probes, primers and uses thereof. Further, the Applicant would like to provide a brief overview of the Citations D1-D4

51

Citation D1: US 2006/0172325 A1 (BROWNSTIEN et al)

As the Applicant understands, the **Citation D1** discloses and claims for an oligonucleotide array, comprising a plurality of single-stranded nucleic acid probe pairs, a method for detecting target nucleic acids in a sample and a kit for identifying a pathogen in a sample. The disclosed oligonucleotide arrays are used to detect binding of a PCR amplified target nucleic acid sequence (the target), which is labelled, to an immobilized nucleic acid molecule which is unlabelled.

Citation D2: WO 2007/130519 A2 (GOVERNMENT OF THE USA)

The **Citation D2** relates to methods of detection and identification of viruses with the use of nucleic acid hybridisation arrays, using conserved and non-conserved viral nucleotide sequences in the process. It also pertains to the sequencing of nucleotides which hybridize to the microarrays and analysis of the hybridized sequences for identification of viruses.

Citation D3: WO 2005/030800 A2 (AVI BIOPHARMA, INC.)

The **Citation D3** relates to a method of inhibiting replication of a flavivirus in animal cell and an oligonucleotide analog for use in treating flavivirus infection in animal cells. The invention discloses the use of the analog for an antiviral method and monitoring binding of the analog to a viral genome target site. The four serotypes of Dengue Virus belong to the Flavivirus genus of the Flaviviridae family. This invention includes a method of inhibiting replication of flavivirus in animal cells, including mammalian and avian cells.

Citation D4: US 2009/0176236 A1 (YOUNG)

The **Citation D4** relates to methods and kits for detecting the presence of flaviviruses using the technique of hybridisation of nucleic acids onto a solid support, rolling circle amplification assay with primers and probes of the invention and related techniques. The compositions and methods of the present invention are based, in part, on the discovery of oligonucleotides that can be used as primers and probes to detect the presence of members of the Japanese encephalitis virus serogroup and other detectable flaviviruses.

52

1. Response to Objections raised towards the novelty and inventiveness of Claim 1 of the instant invention

The Authorised officer has objected to the novelty and inventiveness of Claim 1 of the instant invention in view of citations D1-D3. In view of the claim amendments, Claim 1 of the instant invention is provided below for the ready reference of the Authorized Officer:

"Probe consisting of nucleotide sequence set forth as SEQ ID Nos. 1 or 2, optionally conjugated with detectable labels."

The Applicant would also like to point out here that in view of the claim amendments, the probes of the instant invention consist of SEQ ID Nos. 1 or 2 and the primers of the instant invention consist of nucleotide sequences set forth as SEQ ID Nos. 3 or 4. Thus, any sequence that does not have the exact number and nature of nucleotides as the sequences of the instant invention cannot be construed to be identical to the sequences of the instant invention and the sequences are novel when considered *vis-à-vis* the prior art.

1.1 In view of Citation D1

The Authorised Officer has noted that citation D1 discloses SEQ ID No: 520, which comprises a sequence which is 100% identical to SEQ ID No. 2 of the instant invention. The Applicant begs to differ here and presents certain observations on citation D1. The Applicant would like to humbly point out here that **SEQ ID No: 520** of the citation D1 is a sense oligonucleotide probe and not an antisense probe as captured in the Written Opinion.

The Applicant would like to add that this aspect can be observed from a specific section from citation D1, which has been quoted below for the ready reference of the Authorised Officer:

Citation D1: Page 10, Line 2: *"In a specific example of the provided arrays, each antisense nucleic acid probe sequence of a probe pair consists essentially of at least one of the sequences shown in SEQ ID NOs: 429-519 and each sense nucleic acid probe sequence of the probe pair consists essentially of at least one of the sequences shown in SEQ ID NOs: 520-609."*

In the citation D1, **SEQ ID No: 520** (as disclosed in claim 3, a dependant claim) is a 52bp sequence designed to correspond to a particular region of the Dengue Virus genome. On the

other hand, the probe presented in the instant disclosure, **SEQ ID No. 2** is a 25bp oligonucleotide, optionally conjugated with detectable labels. Thus it becomes clear that the sequences captured in the two inventions are distinct from each other in terms of identity, length, function and strand orientation.

It is a well established fact that for any sequence to be deprived of its novelty, a corresponding sequence should showcase a 100% match in the sequence length and identity. In other words, if a sequence is found embedded within a longer sequence, then it does not satisfy either of the two requirements for a 100% sequence match. On comparison of the sequences presented in the citation D1 and the instant invention, the difference in the total number of nucleotides is apparent and hence the Applicant believes that the sequences presented in citation D1 and the instant disclosure are distinct in nature. It is also to be noted that the citation D1 does not claim for any of the sequences mentioned therein as probes and/or primers.

Further, the Authorised Officer is of the opinion that claims 12, 17 and 18 of the citation D1 are instrumental in depriving the instant disclosure of its novelty. However, Claim 12 of Citation D1 relates to a method of detecting dengue infection using the Hybridization array coupled to PCR. The Applicant would like to point out here that claim 12 is a dependant claim, that appears to be dependent on claim 11, which is in turn dependent on claim 9 that relates to a method of detection of nucleic acids in a sample, the said method comprising a series of steps. Hence, it can be derived that the citation discloses a methodology to use the probes; however it is imperative to note here that the sequences employed in the citation are distinct from the probe sequences captured in the instant disclosure.

According to Claims 17 and 18 of the citation D1, the method of detecting the dengue infection includes conjugating a detectable label to the amplified target-specific nucleic acid molecules before hybridizing them to the array and the detectable label comprises a fluorescent dye. The Applicant would like to humbly state here that, in the instant disclosure, probes are optionally conjugated to detectable labels. Also, Dual Labeled probes that function on Taqman chemistry as seen in the instant invention and conjugating of a dye to amplified viral nucleic acid molecules before hybridizing them to an array as seen in the citation D1 are two different concepts that do not share any similarity in principle.

The Authorised officer has objected to the inventiveness of Claim 1 of the instant invention in view of citation D1. The Applicant would like to point out that the function of a surface bound probe (52bp sequence disclosed as **SEQ ID No: 520** in D1) in a hybridization array is different from the function of a dual-labeled probe (25 bp sequence disclosed as **SEQ ID No.2** in instant invention) in a PCR Reaction. It can also be understood that the two sequences, being different in length will also vary in the complementary sequence that they bind to. This in turn affects the function and degree of specificity of the two sequences. Also, the sequence used as a probe in a microarray hybridization technique cannot be used as a probe in PCR as it is well established in the art that for a sequence to act as a probe in PCR, the prerequisite is its length. A skilled artisan would be well aware that a probe for a Real-Time PCR application refers to a polynucleotide sequence which has its nucleotide sequence complementary to the target genome/genetic material sequence and has length ranging between 22-30 nucleotide residues. From page 35 of the citation D1, it becomes clear that sequence SEQ ID No: 520 is a 52 bp sequence that is specific to gene NCR2S of the Dengue virus genome. Furthermore, this knowledge does not motivate a person to arrive at SEQ ID No. 2 of the instant invention.

In view of the above, the Applicant would like to humbly state that the citation D1 does not deprive Claim 1 of the instant invention of novelty and inventiveness. Hence, the Applicant humbly requests the Respected Authorised Officer to withdraw the objections raised in this regard.

1.2 In view of Citation D2

The ISR and WO states that citation D2 discloses a sequence that is 100% identical to SEQ ID No.1 of the instant invention. The Applicant would like to humbly state here that SEQ ID No. 1 of the instant invention does not bear any similarity to the sequence disclosed in the citation. The Authorised Officer has stated that **SEQ ID No: 984** of Citation D2 comprises a sequence which is 100% identical to SEQ ID No. 1 of the instant invention. However, upon observation, it becomes clear that the two bear no similarity in terms of identity and length. Both the sequences have been placed below for the ready reference of the Authorised Officer:

Instant invention:

SEQ ID NO: 1

AAAGACCAGAGATCCTGCTGTCTC

24bp

Citation D2:

55
SEQ ID NO: 984 CCAGCGTCAATATGCTGTTTTGTGTGGGGGGTCTCCTCTAACCTCTAGTCCTCCAC 60bp

On comparing the two sequences, it becomes apparent that SEQ ID No. 1 of the instant invention is not disclosed in the citation D2. As has already been stated before, any nucleotide sequence is considered in totality when a comparative study is made and the two sequences given above will also differ in degree of specificity, binding and functional capability. Also, according to Table E on page 571 of the sequence listing of citation D2, SEQ ID No: 984 is specific for Dengue Virus Type 4. However, there is no mention in the specification of the use of the sequence as a probe or a primer in any method of detection. Also, having already discussed that a length of 22-30 nucleotides is a prerequisite for a sequence to be used as a probe in a PCR Reaction; SEQ ID N0: 984 of citation D2 cannot be employed for the same purpose as SEQ ID No. 1 of the instant invention. The invention in the citation relates to analysing the genomic sequences of all types of viruses for inclusion as probes for the microarray and hybridization of these probes to conserved and non-conserved nucleotide regions of all known viruses for their identification, detection and analysis. However, analysis of the instant set of probes has not been carried out in the citation and PCR does not form a part of claimed method in the citation. The Applicant believes that no Person skilled in the art would be motivated to use the information about a completely different sequence used for a different purpose and arrive at the instant invention. Thus, citation D2 does not affect the inventiveness of claim 1 of the instant invention.

Hence, upon reviewing the document, the Applicant would like to respectfully request the Authorised Officer to withdraw the objections regarding novelty and inventiveness of claim 1 of the instant invention in view of Citation D2.

1.3 In view of Citation D3

The ISR and WO state that citation D3 discloses a sequence that is 100% identical to SEQ ID No.1 of the instant invention. The Applicant would like to humbly state here that SEQ ID No. 1 of the instant invention does not bear any similarity to the sequence disclosed in the citation. The Authorised Officer has stated that **SEQ ID No: 31** of **Citation D3** comprises a sequence which is 100% identical to SEQ ID No. 1 of the instant invention. However, according to the document, the **SEQ ID No: 31** is a 112 nucleotide long RNA sequence specific for the Dengue Virus Type 2. This has been captured on Pages 61-62 of the Citation D3. Also, SEQ ID No: 31 of the citation D3 is not used as a probe or primer in the citation.

56

The Applicant would like to mention here that SEQ ID No. 1 of the present invention is a 24bp long DNA oligonucleotide that functions as a dual labelled probe. Any similarity between the said sequence and SEQ ID No. 1 of the instant invention does not appear to be possible, as SEQ ID No. 1 of the instant invention is a 24bp DNA oligonucleotide, optionally labelled and employed as a probe in a PCR reaction for detection of all serotypes of dengue virus in samples. It is also to be noted that the nature and length of the complementary sequences to which the sequences will bind and the nature of the interaction will also differ (DNA-DNA, DNA-RNA or RNA-RNA interaction). Thus, it becomes apparent that there is no similarity between the sequences in terms of length, chemical structure, binding characteristics and functionality.

The Applicant would like to mention here that the Citation D3 relates to a method of inhibition of replication of virus in cells using an oligonucleotide analog and the said method does not employ the PCR Reaction or any use of a probe or a primer therein. The sequence cited, SEQ ID No: 31 is an RNA molecule in nature and the method involved in the citation is heteroduplex formation as a means of inhibiting replication. Thus, the Applicant believes that no person skilled in the art would be motivated to use a sequence and method entirely different in principle and arrive at the instant invention. Thus, citation D3 does not affect the novelty and inventiveness of claim 1 of the instant invention.

2. Response to Objections raised towards the inventiveness of Claims 2 and 3 of the instant invention in view of citation D1

The Authorised Officer has noted that claims 2 and 3 of the instant invention are not inventive, in view of citation D1. It is to be noted that claims 2 and 3 of the instant invention are dependent claims and are to be considered in conjunction with claim 1.

Claim 2 of the instant invention relates to:

"The probe as claimed in claim 1, wherein the probe is for detecting dengue infection; and wherein the detectable labels are fluorphore at 5' end and quencher at 3' end."

Claim 3 of the instant invention further describes the groups from which the fluorophore and quencher are selected.

57

The Authorised Officer has noted that citation D1 discloses the use of detectable labels as employed in the instant invention. The Applicant would like to humbly state here that the flurophore and quencher are conjugated optionally to the probe as part of claim 1. Also, the labeling of a probe with a detectable moiety and dual-labeling of probes that function according to Taqman Chemistry work on different principles that cannot be construed to be the same. Additionally, whereas the instant invention discloses use of labeled probes in the PCR reaction, D1 discloses labeling of the amplified PCR product. In D1, the dye-conjugated amplified PCR products are hybridized with the microarray whereas in the instant invention dual-labeled Taqman probes are used for binding to specific sequences in the dengue genome during the PCR reaction. Moreover, dual-labeled Taqman probes are well known in the art and the instant invention does not claim for the same. So, the Applicant believes that claims 2 and 3 of the instant invention are inventive, when read in conjunction with claim 1, in view of citation D1 and humbly requests the Authorised Officer to accord the same.

3. Response to objections raised towards the novelty and inventiveness of Claims 4 and 5 of the instant invention in view of citation D4

The Authorised Officer has objected to novelty and inventiveness of claims 4 and 5 of the instant invention in view of Citation D4. In view of the claim amendments, Claim 4 of the instant invention relates to:

“Primer consisting of nucleotide sequence set forth as SEQ ID Nos. 3 or 4.”

Claim 5 is dependent on claim 4 and states that the primer consisting of the SEQ ID No.3 is sense primer and the primer consisting of the SEQ ID No.4 is an anti-sense primer.

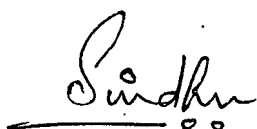
The Authorised Officer has noted that SEQ ID No.840 of the citation comprises a sequence which is 100% identical to SEQ ID No.3 of the instant invention. The Applicant would like to humbly point out here that **SEQ ID No. 3** of the instant invention is an 18bp oligonucleotide that is used as a Sense Primer; which is in turn used in a PCR method to detect Dengue Virus in samples. On the other hand, the **SEQ ID No: 840** of citation D4 is a 28bp artificial oligonucleotide that has been designed in accordance to a region of conserved sequence in the 3' untranslated region in the genome of Dengue Virus Type 1. Thus, it becomes apparent that the two sequences are different in length, totality and function.

58

Furthermore, the citation does not discuss the use of the sequence (SEQ ID No.840) as a probe or primer for the detection of Dengue. The Applicant would like to bring to the notice of the Authorised Officer that the citation D4 presents a list of nucleotide sequences that can be used as probes and/or primers for the detection of Dengue Virus, but SEQ ID No: 840 does not form a part of any such probes and primers used in the method in citation D4. The citation neither implicitly nor explicitly mentions that the citation's sequence can be truncated and still function as a probe.

Since the sequences used in both disclosures are different in length, totality, specificity and use, the Applicant believes that no person skilled in the art would be motivated to take a longer sequence of undefined orientation that corresponds to the 3' untranslated region in the genome of Dengue Virus Type 1 and arrive at the primer used in the instant invention, that is shorter, fixed in orientation and works in conjunction with another primer of SEQ ID No. 4 and a Taqman probe in a PCR reaction that detects all four serotypes of Dengue Virus. Based on the review of citation D4, the Applicant believes that claims 4 and 5 of the instant invention are novel and inventive and requests the Authorised Officer to grant the same.

The Applicant respectfully adds here that the ingenuity and inventive features of the instant invention lie in the identification and designing of specific nucleotide sequences as potentially useful probes and primer sequences. Hence, in view of the above facts, the Applicant humbly requests the Authorised Officer to withdraw the objections raised in the ISR and WO in view of the citations D1, D2, D3 and D4 and thereby issue a favourable IPRP.



VIJAYAKRISHNAN, Sindhu

IN/PA-1726

59

**REIVINDICACIONES MODIFICADAS
PARA REALIZAR EL EXAMEN DE
PATENTABILIDAD**

REIVINDICACIONES

1. Una sonda caracterizada porque consiste en una secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID Nos. 1 o 2, conjugada opcionalmente con marcadores detectables.
2. La sonda de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque es para detectar infección por dengue; y en donde los marcadores detectables son fluoróforo en el extremo 5' y extintor en el extremo 3'.
3. La sonda de conformidad con la reivindicación 2, caracterizada porque el fluoróforo se selecciona de un grupo que comprende fluoresceína, derivados de fluoresceína que consisten en colorantes de 6-carboxi fluoresceína [FAM], VIC, JOE, ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftalen-1-sulfónico, cumarina y derivados de cumarina, amarillo lucifer, rojo Texas, tetrametilrodamina, tetracoloro-6-carboxifluoresceína, 5-carboxirrodamina y cianina, de preferencia 6-carboxi fluoresceína [FAM]; y el extintor se selecciona de un grupo que comprende tetrametilrodamina, ácido 4'-(5-dimetilaminofenilazo)benzoico, 4-dimetilaminofenilazofenil-4'-maleimida, tetrametilrodamina, carboxitetrametilrodamina y colorantes de extintor de agujero negro 1 [BHQ], de preferencia extintor de agujero negro 1 (BHQ1).
4. Un cebador caracterizado porque consiste en una secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID Nos. 3 o 4.
5. El cebador de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque el cebador que consiste en SEQ ID NO. 3 es un cebador en sentido y el cebador que consiste en SEQ ID No. 4 es un cebador antisentido.
6. El cebador de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque los cebadores corresponden a una sonda que consiste en SEQ ID Nos. 1 o 2; y en donde los cebadores se usan en combinación ya sea con la sonda que consiste en SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 2.

7. Una mezcla de reacción por PCR para la detección de infección por dengue, la mezcla se caracteriza porque comprende reactivos de amplificación de ácido nucleico, una sonda que consiste en la secuencia de nucleótidos seleccionada de un grupo que comprende SEQ ID Nos. 1 y 2 o una combinación de sondas de las mismas; y cebadores que consisten en la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID Nos. 3 y 4.

8. La mezcla de reacción de conformidad con la reivindicación 7, caracterizada porque el cebador que consiste en SEQ ID No. 3 es un cebador en sentido y el cebador que consiste en SEQ ID No. 4 es un cebador antisentido; y la sonda se conjuga con marcadores detectables que tienen fluoróforo en el extremo 5' y extintor en el extremo 3'.

9. La mezcla de reacción de conformidad con la reivindicación 7, caracterizada porque los cebadores corresponden a una sonda que consiste en SEQ ID Nos. 1 o 2; y en donde los cebadores se usan en combinación ya sea con la sonda que consiste en SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 2.

10. La mezcla de reacción de conformidad con la reivindicación 7, caracterizada porque la infección por dengue se detecta a partir de una muestra seleccionada de un grupo que comprende sangre, plasma y suero o cualquier combinación de los mismos; y los reactivos de amplificación se seleccionan de un grupo que comprende cloruro de magnesio, polimerasa Taq y regulador de pH o cualquier combinación de los mismos.

11. Un método para detectar y opcionalmente cuantificar infección por dengue, el método se caracteriza porque comprende las etapas de:

(a) obtener una mezcla de reacción por PCR que comprende reactivos de amplificación de ácido nucleico, una sonda seleccionada de un grupo que comprende SEQ ID No. 1 y 2 y cebadores que consistan en una secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID Nos. 3 y 4;

(b) introducir una muestra de prueba en la mezcla de reacción por PCR para amplificación por PCR para obtener copias de la secuencia objetivo, seguida por medir la señal de fluorescencia generada para detectar la infección por dengue; y

(c) opcionalmente, construir una Curva Estándar a partir de la señal detectada para cuantificar la infección por dengue.

12. El método de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado porque el cebador que consiste en SEQ ID No. 3 es un cebador en sentido y el cebador- que consiste en SEQ ID No. 4 es un cebador antisentido.

13. El método de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado porque los cebadores corresponden a una sonda que consiste en SEQ ID Nos. 1 o 2; y en donde los cebadores se usan en combinación ya sea con la sonda que consiste en SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 2.

14. El método de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado porque la muestra de prueba se selecciona de un grupo que comprende sangre, plasma y suero o cualquier combinación de los mismos; y los reactivos de amplificación se seleccionan de un grupo que comprende cloruro de magnesio, polimerasa Taq y regulador de pH o cualquier combinación de los mismos.

15. El método de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado porque la sonda se conjuga con marcadores detectables que tienen fluoróforo en el extremo 5' y extintor en el extremo 3'; y la señal de fluorescencia se genera por las sondas que tienen fluoróforo en el extremo 5' y extintor en el extremo 3'.

16. El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque el fluoróforo se selecciona de un grupo que comprende fluorosceína, derivados de fluorosceína que consisten en colorantes de 6-carboxi fluorosceína [FAM], VIC, JOE, ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftalen-1-sulfónico, cumarina y derivados de cumarina, amarillo lucifer, rojo Texas, tetrametilrodamina,

tetracloro-6--carboxifluorosceína, 5-carboxirrodamina y cianina, de preferencia 6-carboxi fluorosceína [FAM]; y el extintor se selecciona de un grupo que comprende tetrametilrodamina, ácido 4'-(4-dimetilarninofenilazo)benzoico, 4-dimetilaminofenilazofeni1-4'-maleimida, tetrametilrodamina, carboxitetrametilrodamina y colorantes de extintor de agujero negro 1 [BHQ], de preferencia extintor de agujero negro 1 (BHQ1).

17. Un kit para detectar infección por dengue, el kit se caracteriza porque comprende una sonda que tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada de un grupo que comprende SEQ ID Nos. 1 y 2 o una combinación de sondas de los mismos, marcado opcionalmente en el extremo 5' y 3'; cebadores que consisten en la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID Nos. 3 y 4; y reactivos de amplificación, opcionalmente junto con manual de instrucciones.

18. El kit de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque la sonda se conjuga con marcadores detectables que tienen fluoróforo en el extremo 5' y extintor en el extremo 3'; y los reactivos de amplificación se seleccionan de un grupo que comprende cloruro de magnesio, polimerasa Taq y regulador de pH o cualquier combinación de los mismos.

19. Un método para ensamblar un kit para la detección de infección por dengue, el método se caracteriza porque comprende la etapa de combinar una sonda que consiste en una secuencia de nucleótidos seleccionada de un grupo que comprende SEQ ID Nos. 1 y 2 o una combinación de sondas de las mismas; cebadores que consisten en la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID Nos. 3 y 4; y reactivos de amplificación, opcionalmente junto con un manual de instrucciones.

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:
VIJAYAKRISHNAN, Sindhu K & S Partners 4121/B, 6th Cross, 19th A Main, HAL II Stage [Extension] Bangalore, Karnataka 560 038 INDE

Date of mailing (day/month/year) 24 January 2013 (24.01.2013)	
Applicant's or agent's file reference PCT1133-SV	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/IB2011/053164	International filing date (day/month/year) 15 July 2011 (15.07.2011)

1. The following indications appeared on record concerning:										
☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative										
Name and Address BIGTEC PRIVATE LIMITED 2nd Floor, SID Entrepreneurship Building Indian Institute of Science [IISc] Campus, Malleshwaram, Bangalore, Karnataka 560 012 India	State of Nationality IN	State of Residence IN								
	Telephone No. 918040427900									
	Facsimile No. 918040427901									
	E-mail address bangalore@knspartners.com									
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:										
☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence										
Name and Address BIGTEC PRIVATE LIMITED 2nd Floor Golden Heights, 59th 'C' Cross 4th 'M' Block Rajajinagar Bangalore 560 010 Karnataka India	State of Nationality IN	State of Residence								
	Telephone No.									
	Facsimile No.									
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized									
3. Further observations, if necessary:										
4. A copy of this notification has been sent to:										
<table><tr><td>☐ the receiving Office</td><td>☐ the International Preliminary Examining Authority</td></tr><tr><td>☐ the International Searching Authority</td><td>☐ the designated Offices concerned</td></tr><tr><td>☐ the Authority(ies) specified for supplementary search</td><td>☒ the elected Offices concerned</td></tr><tr><td></td><td>☐ other:</td></tr></table>			☐ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority	☐ the International Searching Authority	☐ the designated Offices concerned	☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☒ the elected Offices concerned		☐ other:
☐ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority									
☐ the International Searching Authority	☐ the designated Offices concerned									
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☒ the elected Offices concerned									
	☐ other:									

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Grolier David
Facsimile No. +41 22 910 06 10	e-mail ro.ib@wipo.int Telephone No. +4122 338 8698

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/IB2011/053164

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

VIJAYAKRISHNAN, Sindhu
K & S Partners
4121/B, 6th Cross, 19th A Main, HAL II
Stage [Extension]
Bangalore, Karnataka 560 038
INDE

Date of mailing (day/month/year) 24 January 2013 (24.01.2013)	
Applicant's or agent's file reference PCT1133-SV	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/IB2011/053164	International filing date (day/month/year) 15 July 2011 (15.07.2011)

1. The following indications appeared on record concerning:		
☒ the applicant	☒ the inventor	☐ the agent
☐ the common representative		
Name and Address JAGANNATH, Manjula c/o: Bigtec Private Limited 2nd Floor, SID Entrepreneurship Building, Indian Institute of Science [IISc] Campus, Malleshwaram Bangalore, Karnataka 560 012 India	State of Nationality IN	State of Residence IN
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
☐ the person	☐ the name	☒ the address
☐ the nationality		
☐ the residence		
Name and Address JAGANNATH, Manjula C/o: Bigtec Private Limited 2nd Floor Golden Heights, 59th 'C' Cross 4th 'M' Block Rajajinagar Bangalore 560 010 Karnataka	State of Nationality IN	State of Residence IN
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to:		
☐ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority	
☐ the International Searching Authority	☐ the designated Offices concerned	
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☒ the elected Offices concerned	
	☐ other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Grolier David
Facsimile No. +41 22 910 06 10	e-mail ro.ib@wipo.int Telephone No. +4122 338 8698

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/IB2011/053164

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

VIJAYAKRISHNAN, Sindhu
K & S Partners
4121/B, 6th Cross, 19th A Main, HAL II
Stage [Extension]
Bangalore, Karnataka 560 038
INDE

Date of mailing (day/month/year) 24 January 2013 (24.01.2013)	
Applicant's or agent's file reference PCT1133-SV	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/IB2011/053164	International filing date (day/month/year) 15 July 2011 (15.07.2011)

1. The following indications appeared on record concerning:		
☒ the applicant	☒ the inventor	☐ the agent
☐ the common representative		
Name and Address NARAYANAN, Manoj, Mulakkapurath c/o: Bigtec Private Limited 2nd Floor, SID Entrepreneurship Building, Indian Institute of Science [IISc] Campus, Malleshwaram Bangalore, Karnataka 560 012 India	State of Nationality IN	State of Residence IN
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
☐ the person	☐ the name	☒ the address
☐ the nationality		
☐ the residence		
Name and Address NARAYANAN, Manoj, Mulakkapurath C/o: Bigtec Private Limited 2nd Floor Golden Heights, 59th 'C' Cross 4th 'M' Block Rajajinagar Bangalore 560 010 Karnataka	State of Nationality IN	State of Residence IN
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to:		
☐ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority	
☐ the International Searching Authority	☐ the designated Offices concerned	
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☒ the elected Offices concerned	
	☐ other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Grolier David e-mail ro.ib@wipo.int Telephone No. +4122 338 8698
---	--

Facsimile No. +41 22 910 06 10

Form PCT/IB/306 (January 2009)

1/PKFX YHHEU7D2X0

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

VIJAYAKRISHNAN, Sindhu
K & S Partners
4121/B, 6th Cross, 19th A Main, HAL II
Stage [Extension]
Bangalore, Karnataka 560 038
INDE

Date of mailing (day/month/year) 24 January 2013 (24.01.2013)	
Applicant's or agent's file reference PCT1133-SV	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/IB2011/053164	International filing date (day/month/year) 15 July 2011 (15.07.2011)

1. The following indications appeared on record concerning:
☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address NAIR, Chandrasekhar, Bhaskaran C/o: Bigtec Private Limited 2nd Floor Golden Heights, 59th 'C' Cross 4th 'M' Block Rajajinagar Bangladore 560 010 Karnataka	State of Nationality IN	State of Residence IN
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:
☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address NAIR, Chandrasekhar, Bhaskaran C/o: Bigtec Private Limited 2nd Floor Golden Heights, 59th 'C' Cross 4th 'M' Block Rajajinagar Bangladore 560 010 Karnataka	State of Nationality IN	State of Residence IN
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☐ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority
☐ the International Searching Authority	☐ the designated Offices concerned
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☒ the elected Offices concerned
	☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Grolier David
Facsimile No. +41 22 910 06 10	e-mail ro.ib@wipo.int Telephone No. +4122 338 8698

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:
VIJAYAKRISHNAN, Sindhu
K & S Partners
4121/B, 6th Cross, 19th A Main, HAL II
Stage [Extension]
Bangalore, Karnataka 560 038
INDE

Date of mailing (day/month/year) 24 January 2013 (24.01.2013)	
Applicant's or agent's file reference PCT1133-SV	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/IB2011/053164	International filing date (day/month/year) 15 July 2011 (15.07.2011)

1. The following indications appeared on record concerning:										
☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative										
Name and Address SUBBARAO, Pillarisetti, Venkata C/o: Bigtec Private Limited 2nd Floor Golden Heights, 59th 'C' Cross 4th 'M' Block Rajajinagar Bangladore 560 010 Karnataka	State of Nationality IN	State of Residence IN								
	Telephone No.									
	Facsimile No.									
	E-mail address									
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:										
☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence										
Name and Address SUBBARAO, Pillarisetti, Venkata C/o: Bigtec Private Limited 2nd Floor Golden Heights, 59th 'C' Cross 4th 'M' Block Rajajinagar Bangladore 560 010 Karnataka	State of Nationality IN	State of Residence IN								
	Telephone No.									
	Facsimile No.									
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized									
3. Further observations, if necessary:										
4. A copy of this notification has been sent to:										
<table><tr><td>☐ the receiving Office</td><td>☐ the International Preliminary Examining Authority</td></tr><tr><td>☐ the International Searching Authority</td><td>☐ the designated Offices concerned</td></tr><tr><td>☐ the Authority(ies) specified for supplementary search</td><td>☒ the elected Offices concerned</td></tr><tr><td></td><td>☐ other:</td></tr></table>			☐ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority	☐ the International Searching Authority	☐ the designated Offices concerned	☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☒ the elected Offices concerned		☐ other:
☐ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority									
☐ the International Searching Authority	☐ the designated Offices concerned									
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☒ the elected Offices concerned									
	☐ other:									

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Grolier David
Facsimile No. +41 22 910 06 10	e-mail ro.ib@wipo.int Telephone No. +4122 338 8698

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	Espacio reservado para el adhesivo de radicación
---	--

DELEGATURA PARA LA PROPIEDAD INDUSTRIAL
FORMULARIO PARA OTORGAR PODER A ABOGADO
EN LOS TRÁMITES DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

1. Datos del otorgante

☐ Persona Natural ☒ Persona Jurídica

BIGTEC PRIVATE LIMITED

Nombre o denominación/Razón Social completa(En caso de que haya más de un solicitante, relaciónese en hoja adjunta)

Nombre del Representante CHANDRASEKHAR NAIR, DIRECTOR AND CEO

Nacionalidad/País de constitución	Dirección del otorgante	
India	2nd Floor, Golden Heights, 59th 'C' cross, 4 th 'M' Block, Rajajinagar. Bangalore – 560010, Karnataka, India	
Dirección Electrónica	No. Fax	Número Telefónico
clientes@cavelier.com	2118650	3473611

2. Datos del Apoderado

Principal Luz Clemencia Suárez de Páez	35.456.344	23.555
Primer Suplente Nidia Osorio López	39.787.682	73.366
Segundo Suplente Oscar Correa Barbosa	79.524.634	71.027

Apellidos y Nombre Documento de Identificación T.P.(sólo abogados Profesionales)

Nacionalidad/País de constitución	Dirección del Apoderado	
Colombiana	Carrera 4 No. 72-35, Bogotá, Colombia	
Dirección Electrónica	No. Fax	Número Telefónico
cavelier@cavelier.com	2118650	3473611

☐ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico.

Mediante el presente documento, la persona indicada en el punto 1 de este documento nombra a las personas que se identifican en el punto 2 como sus apoderados en los términos del artículo 66 del Código de Procedimiento Civil, para las actuaciones que se relacionan a continuación.

3. Actuaciones en cuestión:

Este poder concierne:

- ☒ Todas las solicitudes y/o registros actuales y futuros del otorgante.
- ☐ La(s) siguiente(s) solicitud(es) y/o registro(s):

NOMBRE	NÚMERO DE SOLICITUD O REGISTRO

Nota: Si el espacio anterior no es suficiente, por favor relacione las actuaciones en hoja anexa.

4. Alcance del poder:

- ☒ Confiero expresamente al (los) apoderado(s) todas las facultades legales para que represente mi(s) interés(es) en la(s) actuación(es) señalada(s) en el punto 3 de este documento, incluyendo:
- ☒ Desistir de la(s) solicitud(es) y de la demás actuaciones
 - ☒ Renunciar a los derechos del registro de signos distintivos o de nuevas creaciones
 - ☒ Transigir
 - ☒ Recibir
 - ☒ Conciliar
 - ☒ Ratificar los actos de agentes oficiosos

5. Firma

CHANDRASEKHAR NAIR

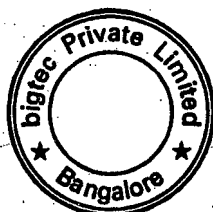
Nombre del Firmante

(Signer's name)

Firma (signature)

29TH JAN 2013

Fecha (Date)



LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

Firma del Apoderado

TP No. 23.555

Tarjeta Profesional

CESION

Yo, (nosotros) abajo firmado (s)

(1) Manjula JAGANNATH

(2) Manoj Mulakkapurath NARAYANAN

(3) Chandrasekhar Bhaskaran NAIR

(4) Pillariseti Venkata SUBBARAO

domiciliado(s) en

(1) Of (4)

Bigtec Private Limited , 2nd Floor, Golden Heights, 59th 'C'cross, 4th 'M' Block, Rajajinagar. Bangalore – 560010, Karnataka, India

declaro(amos) bajo juramento ser único(s) y verdadero(s) inventor(es) de la invención:

SONDAS Y CEBADORES PARA DETECCION DEL DENGUE

declaro(amos) así mismo que cedo(emos) y transfiero(erimos), sin limitación, a favor de la sociedad

BIGTEC PRIVATE LIMITED

constituida y existente de conformidad con las leyes de India

domiciliada en

2nd Floor, Golden Heights, 59th 'C'cross, 4th 'M' Block, Rajajinagar. Bangalore – 560010, Karnataka, India

todos los derechos inherentes a dicha invención y que la citada Compañía queda facultada para solicitar en su nombre la patente de invención correspondiente en la República de Colombia.

ASSIGNMENT

I (we), the undersigned

(1) Manjula JAGANNATH

(2) Manoj Mulakkapurath NARAYANAN

(3) Chandrasekhar Bhaskaran NAIR

(4) Pillariseti Venkata SUBBARAO

of

c/o Bigtec Private Limited , 2nd Floor, Golden Heights, 59th 'C'cross, 4th 'M' Block, Rajajinagar. Bangalore – 560010, Karnataka, India

state(s) under oath to be sole and true inventor(s) of the invention:

PROBES AND PRIMERS FOR DETECTION OF DENGUE

state as well, that assign, without reservations or limitations in favour of

BIGTEC PRIVATE LIMITED

a corporation constituted and existing in conformity with the laws of India

domiciled in

2nd Floor, Golden Heights, 59th 'C'cross, 4th 'M' Block, Rajajinagar. Bangalore – 560010, Karnataka, India

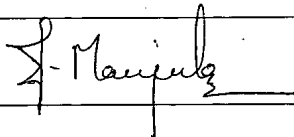
all rights inherent to said invention and that the above mentioned company hereby is enabled to apply, in its name, for the corresponding patent invention, in the Republic of Colombia

Dado y firmado hoy/Given and signed this 29th Jan. 13

en/in India

por/by Manjula JAGANNATH

Firma/Signature

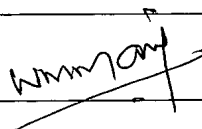


Dado y firmado hoy/Given and signed this 29th Jan. 13

en/in India

por/by Manoj Mulakkapurath NARAYANAN

Firma/Signature

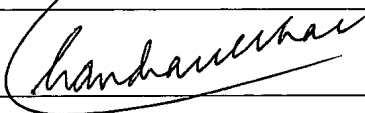


Dado y firmado hoy/Given and signed this 29th Jan. 13

en/in India

por/by Chandrasekhar Bhaskaran NAIR

Firma/Signature



Dado y firmado hoy/Given and signed this 29th Jan. 13

en/in India

por/by Pillarisetti Venkata SUBBARAO

Firma/Signature



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0014232
		Bogotá D.C., Febrero 13 de 2013 - 10:45:43

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	197827836	13/02/2013	34.841.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr LINDITARIO Vr CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00 500.000.00
			\$500.000.00

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-039902- -00000-0000

Fecha: 2013-02-27 16:17:09 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION Folios: 75

Colo: 17626- 841- 006-3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0018099
		Bogotá D.C., Febrero 22 de 2013 - 11:08:38

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS				NI 860.041.367	
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
RECIBO DE CA	999999999	11600	06/02/2013		5.000.00
RECIBO DE CA	999999999	14263	13/02/2013		206.000.00
RECIBO DE CA	999999999	17092	19/02/2013		60.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1850 SOL. TRANSFERENCIA / LICENCIA USO MULTI-MARCA / LEMA	270.000.00	270.000.00
			<u>\$270.000.00</u>
			=====

SON: **DOSCIENTOS SETENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-039902- -00000-0000

Fecha: 2013-02-27 16:17:09 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 75

COLO:17626-841-006-3

75

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD FASE NACIONAL PCT	
(21) N° de solicitud: 22) Fecha de solicitud: (30) Prioridad (31) Prioridad (32) Fecha (33) País 2162/CHE/2010 2010/07/29 IN		(51) Int Cl: C12Q 001/068 (71) Solicitante(s) BIGTEC PRIVATE LIMITED (72) Inventor(es) MANJULA JAGANNATH Y OTROS (74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 2013/02/28 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 2011/07/15 No. de solicitud PCT/IB2011/053164		(87) Publicación internacional Fecha: 2012/02/02 N° publicación: WO 2012/014116 A1	
(54) Titulo: SONDAS Y CEBADORES PARA DETECCIÓN DEL DENGUE			

Resumen:

La presente invención describe un método que se usa para la detección y cuantificación de infección viral por dengue causada por el virus del dengue usando ácidos nucleicos aislados de muestras de sangre, plasma o suero al emplear sondas de oligonucleótidos. El método empleado en la presente para la detección es mediante PCR en tiempo real. La presente invención también proporciona cebadores, sondas, mezcla de reacción por PCR y kit de la misma.

PATENTE DE INVENCION ☐ MODELO DE UTILIDAD ☐ Art 33 Decisión 486/00

☐	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 ☐

PI02-FPA (2008-11-18)

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-039902- -00000-0000

Fecha: 2013-02-27 16:17:09 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 75

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BIGTEC PRIVATE LIMITED

<120> SONDAS Y CEBADORES PARA DETECCIÓN DE DENGUE

<130> IP14679

<150> 2162/CHE/2010

<151> 2010-07-29

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 24

<212> ADN

<213> virus de Dengue

<220>

<221> gen

<222> (1)..(24)

<400> 1

aaagaccaga gatcctgctg tctc

24

<210> 2

<211> 25

<212> ADN

<213> virus de Dengue

<220>

<221> gen

<222> (1)..(25)

<400> 2

acgctgggag agaccagaga tcctg

25

<210> 3

<211> 18

<212> ADN

<213> virus de Dengue

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(18)

<400> 3
gtagaggag accccccg
18

<210> 4
<211> 19
<212> ADN
<213> virus de Dengue

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(19)

<400> 4
gcgttctgtg cctggaatg
19

Id.236616/WPC17626
COLO 17626 841 006 3