

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 449 665**

21 Número de solicitud: 201231456

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C12N 9/24** (2006.01)

12

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

R1

22 Fecha de presentación:

**19.09.2012**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**20.03.2014**

88 Fecha de publicación diferida del informe sobre el estado de la técnica:

**26.03.2014**

71 Solicitantes:

**SERVIZO GALEGO DE SAÚDE-CONSELLERIA DE SANIDADE, XUNTA DE GALICIA (50.0%)  
Edificio Administrativo de San Lázaro s/n  
15703 Santiago de Compostela (A Coruña) ES y  
FUNDACIÓN DO COMPLEXO HOSPITALARIO  
UNIVERSITARIO A CORUÑA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BOU ARÉVALO, Germán;  
FERNÁNDEZ GONZÁLEZ, Ana y  
TÓMAS CARMONA , Maria Del Mar**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

54 Título: **Procedimiento para el diagnóstico clínico de una enfermedad infecciosa basada en el empleo de la PCR cuantitativa, oligonucleótidos marcados de 8 a 9 nucleótidos de longitud y la UNG del Bacalao del Atlántico (Gadus morhua).**

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 449 665**

21 Número de solicitud: 201231456

57 Resumen:

La presente invención proporciona un procedimiento, útil para su uso en un laboratorio de microbiología clínica, que permite la determinación de la presencia o ausencia de un microorganismo en una muestra Biológica de un sujeto con un alto grado de fiabilidad utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) realizada de forma cuantitativa en tiempo real. Dicho procedimiento comprende los siguientes pasos:

a. Llevar a cabo un tratamiento de la mezcla de reacción que se utilizará para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) realizada de forma cuantitativa en tiempo real con la Uracil-ADN-Glicosilasa procedente del Bacalao del Atlántico (Gadus morhua) de SEQ ID No 3 o con una variante de la misma; y

b. Determinar la presencia o ausencia del microorganismo en la muestra biológica, tras tratamiento de la mezcla de reacción según el apartado a), a través de la determinación de la presencia o ausencia de amplicones procedentes de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) realizada de forma cuantitativa en tiempo real; donde dicha reacción en cadena de la polimerasa (PCR) emplea ADN, ADN complementario (ADNc) ó ADN de hebra simple obtenido por retrotranscripción de ácido ribonucleico (ARN) de la muestra biológica, al menos un par de cebadores específicos, dNTPs, un tampón de reacción adecuado, una ADN polimerasa termoestable y una sonda marcada fluorescentemente, donde dicha sonda marcada fluorescentemente consiste en un oligonucleótido con una longitud de 8 a 9 nucleótidos marcado con un fluoróforo, preferiblemente dicha sonda presenta una longitud de 8 nucleótidos.



- ②<sup>1</sup> N.º solicitud: 201231456  
②<sup>2</sup> Fecha de presentación de la solicitud: 19.09.2012  
③<sup>2</sup> Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤<sup>1</sup> Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)  
C12N9/24 (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ <sup>6</sup> Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	EP 2138590 A1 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH) 30.12.2009, reivindicaciones 1-15.	1-18,23
Y	LONGO, M.C. et al., 'Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions.', GENE, 1990, Vol. 93, No. 1, Páginas 125-128, ISSN: 0378-1119 (print), todo el documento, en particular, 'Experimental and Discussion'.	1-18,23
Y	LANES, O. et al., 'Purification and characterization of a cold-adapted uracil-DNA glycosylase from Atlantic cod (Gadus morhua).', COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY. PART B, BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY, 2000, Vol. 127, No. 3, Páginas 399-410, ISSN: 1096-4959, Resultados, Discusión.	1-18,23
A	PRUVOST, M. et al., 'Minimizing DNA contamination by using UNG-coupled quantitative real-time PCR on degraded DNA samples: application to ancient DNA studies.', BIOTECHNIQUES, 2005, Vol. 38, No. 4, Páginas 569-575. ISSN: 0736-6205 (Print), todo el documento.	1-23
A	PENNINGS, J.L. et al., 'Degradable dU-based DNA template as a standard in real-time PCR quantitation.', LEUKEMIA, 2001, Vol.15, No. 12, Páginas 1962-1965. ISSN: 0887-6924 (Print), todo el documento.	1-23
A	KLEIBOEKER, S.B., 'Quantitative assessment of the effect of uracil-DNA glycosylase on amplicon DNA degradation and RNA amplification in reverse transcription-PCR.', VIROLOGY JOURNAL, 2005, Vol. 2, No. 29, Páginas 1-8, ISSN: 1743-422X (print), ISSN: 1743-422X (electronic), todo el documento.	1-23
A	WO 2006009870 A2 (EPIGENOMICS AG) 26.01.2006, todo el documento.	1-23

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia  
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría  
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita  
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud  
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
06.03.2014

Examinador  
J. L. Vizán Arroyo

Página  
1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q, C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 06.03.2014

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-23	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 19-22	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-18, 23	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	EP 2138590 A1 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH)	30.12.2009
D02	LONGO, M.C. et al., 'Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions.', GENE, 1990, Vol. 93, No. 1, Páginas 125-128, ISSN: 0378-1119 (print), todo el documento, en particular, 'Experimental and Discussion'.	
D03	LANES, O. et al., 'Purification and characterization of a cold-adapted uracil-DNA glycosylase from Atlantic cod (Gadus morhua).', COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY. PART B, BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY, 2000, Vol. 127, No. 3, Páginas 399-410, ISSN: 1096-4959, Resultados, Discusión.	
D04	PRUVOST, M. et al., 'Minimizing DNA contamination by using UNG-coupled quantitative real-time PCR on degraded DNA samples: application to ancient DNA studies.', BIOTECHNIQUES, 2005, Vol. 38, No. 4, Páginas 569-575. ISSN: 0736-6205 (Print), todo el documento.	
D05	PENNINGS, J.L. et al., 'Degradable dU-based DNA template as a standard in real-time PCR quantitation.', LEUKEMIA, 2001, Vol.15, No. 12, Páginas 1962-1965. ISSN: 0887-6924 (Print), todo el documento.	
D06	KLEIBOEKER, S.B., 'Quantitative assessment of the effect of uracil-DNA glycosylase on amplicon DNA degradation and RNA amplification in reverse transcription-PCR.', VIROLOGY JOURNAL, 2005, Vol. 2, No. 29, Páginas 1-8, ISSN: 1743-422X (print), ISSN: 1743-422X (electronic), todo el documento.	
D07	WO 2006009870 A2 (EPIGENOMICS AG)	26.01.2006

En D01, D02, D04-D07 se analizan métodos para prevenir y/o minimizar la presencia de amplicones contaminantes en reacciones PCR de amplificación de ADN.

En D03 se caracteriza la enzima uracil-ADN glicosilasa (UNG) de bacalao (Gadus morhua).

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración****1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes).****1.1 Reivindicaciones independientes 1, 9 y 17.**

1.1.1. El objeto de las reivindicaciones 1 y 9 consiste respectivamente en un procedimiento para determinar la presencia o ausencia de un microorganismo en una muestra biológica y en uno para diagnosticar una patología causada por un microorganismo mediante una reacción PCR en tiempo real. Los procedimientos de la reivindicaciones 1 y 9 se caracteriza básicamente por un tratamiento previo de la mezcla de reacción PCR con la enzima uracil-ADN glicosilasa (UNG) de bacalao (Gadus morhua). El objeto de la reivindicación 17 es un kit relacionado con los procedimientos indicados que se caracteriza porque comprende UNG de bacalao (Gadus morhua) y una sonda fluorescente de 8-9 nucleótidos.

En el estado de la técnica más próximo, constituido por los documentos D01-D07, no se ha divulgado ningún procedimiento ni kit que comparta la característica básica de los reivindicados en la solicitud de patente, es decir, el uso y la aplicación de UNG de bacalao (Gadus morhua). Por consiguiente, el objeto de protección de las reivindicaciones 1, 9 y 17 se considera nuevo sobre la base del documento D01-D07.

1.2. La presente invención satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes porque el objeto de la invención, definido en las reivindicaciones 1-23, es nuevo de acuerdo con el Art. 6.1. de la Ley de Patentes.

**2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).****2.1. Reivindicaciones independientes 1, 9 y 17.**

2.1.1. Los documentos D01-D03 constituyen el estado de la técnica más próximo. En D01-D02 se describen procedimientos para controlar la denominada carry-over contamination en reacciones de amplificación PCR a través de la eliminación de amplicones contaminantes no deseados mediante la incubación de la mezcla de reacción con la actividad uracil-ADN glicosilasa (cf. D01: Reivindicaciones 1-15. D02: 'Experimental and Discussion'). En D03 se divulga la purificación y caracterización de UNG de bacalao (Gadus morhua) (cf. D03: Resultados, Discusión).

2.1.2. El problema técnico a resolver por el objeto de las reivindicaciones 1, 9 y 17 puede ser considerado, por consiguiente, como la provisión de nuevos métodos para determinar la presencia o ausencia de un microorganismo en una muestra biológica y para diagnosticar una patología causada por un microorganismo mediante una reacción PCR en tiempo real, y un nuevo kit relacionado con dichos procedimientos.

2.1.3. Las soluciones propuestas son los métodos de las reivindicaciones 1 y 9 que se caracterizan básicamente por el tratamiento previo de la mezcla de reacción PCR con UNG de bacalao (*Gadus morhua*) y una sonda marcada fluorescentemente de 8-9 nucleótidos, y el kit de la reivindicación 17 caracterizado porque comprende a la enzima y a la sonda referidas. Según la descripción, la eficiencia de la amplificación es menor cuanto mayor sea el tamaño del amplicon. Por lo tanto, se recomienda la amplificación de transcritos con un tamaño de entre 50 y 150 nucleótidos, y más concretamente, de entre 70 y 110 nucleótidos cuando se emplean sondas cortas (8-9 nucleótidos). Sin embargo, el uso de amplicones y sondas de ese tamaño tiene la limitación de los falsos positivos como consecuencia de la contaminación resultante de las amplificaciones realizadas previamente (□carry-over contamination□). Con el fin de incrementar la fiabilidad de los métodos de detección reivindicados se ha llevado a cabo una descontaminación previa de los posibles amplicones no deseados presentes en la muestra mediante la utilización de UNG, en particular, UNG de bacalao frente a UNG de *E.coli* utilizada en D01-D02. Como en la solicitud no se explicita ningún efecto sorprendente e inesperado derivado del uso de UNG de bacalao, caracterizada en D03, frente a UNG utilizada D01-D02 con relación al objetivo de eliminar amplicones contaminantes no deseados, se considera que la solución propuesta en la solicitud es una alternativa no inventiva frente a las del estado de la técnica. Análogamente, el kit caracterizado porque comprende UNG de bacalao se considera una alternativa obvia para un experto en la materia sobre base de los documentos D1-D3. Por todo ello, se estima que las reivindicaciones 1, 9 y 17 y las reivindicaciones dependientes 2-8, 10-16, 18 y 23 no son inventivas.

2.2. La presente invención no satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes porque el objeto de la invención, definido en las reivindicaciones 1-18, 23 no implica actividad inventiva de acuerdo con el Art. 8.1. de la Ley de Patentes.