

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 355 461**

21 Número de solicitud: 200930332

51 Int. Cl.:

A01J 5/013 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

G01N 33/04 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **18.06.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **28.03.2011**

Fecha de la concesión: **31.01.2012**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **10.02.2012**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
10.02.2012

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
CAMPUS PLZ. SAN FRANCISCO
EDF. INTERFACULTADES-C/ PEDRO CERBUNA,12
50009 ZARAGOZA, ES**

72 Inventor/es:

**ANDRÉS CODURAS, MARTA;
ITURRALDE NAVARRO, MARÍA;
GONZÁLEZ RAMÓN, NIEVES;
PIÑEIRO PARDO, MATILDE;
LAMPREAVE PALACIOS, FERMIÍN y
ÁLAVA MARTÍNEZ DE CONTRASTA, MARÍA
ÁNGELES**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **NUEVO BIOMARCADOR, ITIH4, PARA LA DETECCIÓN DE LA PREDISPOSICIÓN A UNA
PATOLOGÍA MAMARIA NO TUMORAL.**

57 Resumen:

Nuevo biomarcador, ITIH4, para la detección de la predisposición a una patología mamaria no tumoral. La presente invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para la detección de una predisposición a una patología mamaria no tumoral que comprende la detección y/o cuantificación de la proteína biomarcadora ITIH4, de cualquiera de los ácidos nucleicos que codifican para dicha proteína o de cualquiera de sus fragmentos, presentes en una muestra de leche obtenida de un mamífero. Los datos obtenidos se pueden comparar con datos estándar para encontrar alguna desviación significativa y atribuir la desviación a dicha predisposición del mamífero a padecer una patología mamaria no tumoral. La patología mamaria no tumoral es preferiblemente mastitis.

ES 2 355 461 B1

DESCRIPCIÓN

Nuevo biomarcador, ITIH4, para la detección de la predisposición a una patología mamaria no tumoral.

5 La presente invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para la detección de una predisposición a una patología mamaria no tumoral que comprende la detección y/o cuantificación de la proteína biomarcadora ITIH4, de cualquiera de los ácidos nucleicos que codifican para dicha proteína o de cualquiera de sus fragmentos, presentes en una muestra de leche obtenida de un mamífero. Los datos obtenidos se pueden comparar con datos estándar para encontrar alguna desviación significativa y atribuir la desviación a dicha predisposición del mamífero a padecer una patología mamaria no tumoral. La patología mamaria no tumoral es preferiblemente mastitis.

Estado de la técnica anterior

15 La respuesta de fase aguda es una reacción compleja de los animales superiores frente al estrés, infecciones, daño tisular, cáncer o alteraciones inmunológicas. Los tejidos afectados y el sistema vascular circundante inducen la acción de las plaquetas, la formación de coágulos y la activación de células inflamatorias. Como consecuencia de ese proceso se induce la síntesis de hormonas y citoquinas, las cuales desencadenan una reacción sistémica que termina con la muerte celular de las células afectadas. Además, entre otros numerosos efectos observados, se producen cambios significativos en la concentración de algunas proteínas que de manera genérica se denominan “proteínas de fase aguda” (PFA) (Baumann y Gauldie, 1994. *Immunol Today* 15(2): 74-80).

20 Las PFA se han estudiado ampliamente en humanos, por razones obvias de interés clínico, y en muchas especies animales. En vacuno, varias PFA entre ellas el amiloide sérico, la haptoglobina, la alfa-1-glicoproteína y la alfa-1-antitripsina aumentan su concentración sérica en diferentes procesos inflamatorios (Eckersall y Conner, 1988. *Vet Res Commun* 12(2-3): 169-78; Heegaard *et al.*, 2000. *Vet Immunol Immunopathol* 77(1-2): 151-159; Hirvonen *et al.*, 1996. *J Dairy Res* 63(3): 351-60).

30 La proteína ITIH4, inicialmente denominada pig-MAP (del inglés, *pig Major Acute-phase Protein*) (González-Ramón *et al.*, 1995. *FEBS Lett* 371(3): 227-30), se ha estudiado recientemente en diferentes especies animales y fundamentalmente en el caso porcino, bovino y humano. En este sentido, la determinación inmunoquímica de su concentración en el suero sanguíneo de animales durante infecciones experimentales bacteriana y vírica, ha indicado que ITIH4 es una nueva proteína de fase aguda en la vaca (Piñeiro *et al.*, 2004. *Infection and immunity*. 72(7): 3777-3782).

35 La familia del inhibidor de tripsina inter- α (ITI) comprende una serie de proteínas plasmáticas que se ensamblan a partir de dos proteínas precursoras: una cadena ligera (bikunina) y diferentes cadenas pesadas. La familia de las cadenas pesadas (ITIHs) consta de 5 miembros, ITIH1, ITIH2, ITIH3, ITIH4 y la recientemente caracterizada ITIH5. En la especie bovina, ITIH1, ITIH3 e ITIH4 están localizadas en el cromosoma 22, mientras que ITIH2 e ITIH5 se localizan en el cromosoma 13. En la especie humana ITIH1, ITIH3 e ITIH4 también se localizan en un mismo cromosoma diferente al de ITIH2 e ITIH5. El polipéptido bikunina se une a las cadenas pesadas H1, H2, H3 y H5, pero no a la H4.

45 Los miembros de la familia ITI están regulados de diferente manera durante la fase aguda: la expresión de la cadena H2 y la bikunina se ve disminuida, mientras que la cadena H3 se sobre-expresa durante la fase aguda en pacientes con inflamación aguda y en células humanas HepB3 de hepatocarcinoma después del tratamiento con IL-6. Se ha observado además, en células HepG2 estimuladas con IL-6 un aumento en la expresión del mRNA de las cadenas H1 y H3, al mismo tiempo que una disminución del mensajero de H2. Hechos similares, es decir, sobre-expresión del mRNA de H3 y disminución del mRNA hepático de H2 y la bikunina se han observado en ratas durante una inflamación inducida por trementina. Los niveles de expresión del mRNA de H4 humano y de cerdo y la secreción de proteína están fuertemente estimulados por IL-6 en células de hepatoma HepG2 y en hepatocitos de cerdo aislados.

55 La presencia de la proteína ITIH4 está asociada a procesos patológicos, especialmente los que cursan con inflamación de la glándula mamaria. Sin embargo, la concentración de la proteína varía durante el proceso patológico pudiendo presentarse un nivel muy bajo y prácticamente indetectable. Los animales de producciones intensivas ganaderas sufren un gran número de patologías producidas fundamentalmente por infecciones de diversa etiología que producen pérdidas en la producción y en la calidad de la leche. Actualmente, los métodos de detección de estas patologías son caros y largos, ya que se necesitan varios días para conocer el resultado (cultivo bacteriano y detección del patógeno) ó bien no son totalmente fiables (p. ej: conteo de las células somáticas).

60 Por todo ello sería muy ventajoso para la salud del animal afectado, poder disponer de un método de detección de la predisposición de un animal a desarrollar una patología mamaria no tumoral mediante un método que proporcione una detección fiable, lo más tempranamente posible y que prescinda de técnicas invasivas y/o agresivas para el animal objeto de estudio.

65

Explicación de la invención

La presente invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para la detección de una predisposición a una patología mamaria no tumoral que comprende la detección y/o cuantificación de la proteína biomarcadora ITIH4, de cualquiera de los ácidos nucleicos que codifican para dicha proteína o de cualquiera de sus fragmentos, presentes en una muestra de leche obtenida de un animal mamífero. Los datos obtenidos se pueden comparar con datos estándar para encontrar alguna desviación significativa y también puede atribuirse la desviación a dicha predisposición del mamífero a padecer una patología mamaria no tumoral donde la patología mamaria no tumoral es preferiblemente mastitis. Una de las ventajas fundamentales de la presente invención es que la proteína biomarcadora puede ser detectada varias horas antes en la muestra de leche que en el suero sanguíneo, lo que implica una ventaja notable para los mamíferos afectados. Este método evita cualquier tipo de estrés al animal ya que comprende una técnica que no es invasiva ni agresiva.

La presencia de la proteína ITIH4 está asociada a procesos patológicos, especialmente los que cursan con infección o inflamación de la mama y su presencia puede ser detectada en la leche varias horas antes que en el suero sanguíneo, lo que implica una ventaja notable ya que el tratamiento para la patología mamaria no tumoral que podría desarrollar el mamífero, se lleva a cabo con mayor antelación que en el caso de la detección de la predisposición por cualquier otro medio o incluso de la detección de la propia patología.

La detección y/o cuantificación de la proteína en leche tiene interés, sobre todo, en la clínica veterinaria para la determinación temprana de patologías mamarias no tumorales.

Los animales de producciones intensivas ganaderas sufren un gran número de patologías no tumorales producidas fundamentalmente por infecciones de diversa etiología que cursan mayoritariamente con inflamación de la glándula mamaria y producen pérdidas significativas en la producción y en la calidad de la leche. La patología mamaria más importante en el ganado bovino es la mastitis. Esta enfermedad posee dos estadios: mastitis subclínica y mastitis clínica. Las dificultades encontradas en el diagnóstico y detección de la patología subclínica, donde la mama y la leche presentan un aspecto normal, son sin lugar a dudas una de las principales causas del elevado coste que supone.

El problema que se resuelve con la presente invención es identificar de una manera rápida a los animales enfermos para que puedan ser tratados de forma temprana y evitar el contagio en un mismo rebaño. Por tanto, podemos citar las siguientes ventajas:

Ventaja 1:

- El análisis bacteriológico de la leche, es un método caro y se necesitan varios días para conocer el resultado. Con esta nueva invención, el resultado es mucho más rápido y económico.

- El conteo de células somáticas de la leche, exigido por la normativa europea, sufre variaciones dependientes de diversos factores como los días de ordeño, la edad del animal, la estación del año, el sobreordeño, etc, provocando que no exista una buena correlación para valorar el estado sanitario del animal. El ARNm (ARN mensajero) de estas células no se ve afectado por estas causas.

- En el test de California y de Wisconsin, la actividad de la NAGasa (N-acetyl-glucosaminidasa) en la leche y la medición de la conductividad de la leche, pueden dar resultados erróneos (falsos positivos o negativos) a la hora de diagnosticar al animal como sano o enfermo. La detección de ARNm es una herramienta fiable para hacer un buen diagnóstico.

Ventaja 2: La aplicación de este método permite la selección genética de animales con resistencia a mamitis.

Ventaja 3: Este método evita cualquier tipo de estrés al animal ocasionado por la toma repetida de muestras ya que supone un método no invasivo.

Así pues, un aspecto de la presente invención es un método de obtención de datos útiles para la detección de una predisposición a una patología mamaria no tumoral que comprende:

- a. Obtener una muestra de leche de un mamífero,
- b. detectar y/o cuantificar uno o más productos de la expresión de una secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica con al menos un 70% de identidad con SEQ ID NO: 1 (ITIH4), presentes en la muestra de leche según el apartado (a), o cualquier fragmento de dichos productos.

La patología mamaria no tumoral se refiere a una enfermedad que afecta al menos a una de las mamas de un animal mamífero cuyo origen no se debe a la presencia de tumores.

El apartado (b) del método se refiere a la detección y a la cuantificación de dichos productos de la expresión o bien a su detección o bien a su cuantificación. El artículo “una” no limita a una sola secuencia nucleotídica o aminoacídica sino que se utiliza de forma indeterminada, entendiéndose que se refiere a cualquier secuencia nucleotídica que codifica para cualquiera de las secuencias aminoacídicas citadas.

El término “producto de la expresión” tal como se entiende en la presente invención hace referencia a cualquier producto resultante de la expresión de la secuencia de nucleótidos descrita. Así pues, como producto resultante de la expresión de la secuencia se entiende, por ejemplo, por sin limitarse, cualquiera de los ARN que se obtienen de la transcripción de la secuencia, el ARN procesado, la proteína resultante de la traducción de cualquiera de los ARN o las secuencias nucleotídicas sin intrones (ADN codificante) o con intrones. La secuencia de aminoácidos puede estar codificada por cualquier secuencia nucleotídica que dé lugar a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de la invención. Debido a que el código genético es degenerado, un mismo aminoácido puede ser codificado por diferentes codones (tripletes), por ello, la misma secuencia de aminoácidos puede ser codificada por distintas secuencias de nucleótidos.

Una realización preferida de la presente invención se refiere al método donde la secuencia aminoacídica del apartado (b) es SEQ ID NO: 1. Del mismo modo, quedan incluidas todas aquellas secuencias cuyo producto de la transcripción sea la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1.

El producto de la expresión puede estar en la leche o en células que se encuentren en la leche como por ejemplo, pero sin limitarse, en células somáticas.

La secuencia SEQ ID NO: 1 es la secuencia aminoacídica de la proteína ITIH4 (*Inter alpha-Trypsin Inhibitor, Heavy chain 4*, NQ de acceso NP_001015590) codificada por una secuencia nucleotídica presente en el genoma del animal *Bos taurus*.

Las secuencias aminoacídicas con, al menos, un 70% de identidad con SEQ ID NO: 1 son secuencias homologas de otros animales mamíferos como por ejemplo *Homo sapiens*, *Sus scrofa* o *Equus caballus*. Este porcentaje de identidad se ha escogido de acuerdo con un alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la proteína ITIH4 de *Homo sapiens*, *Sus scrofa* o *Equus caballus*, entre otros (Tabla 1) que se ha llevado a cabo por medio del programa Clustalw2. En este alineamiento se ha establecido que un porcentaje de identidad de al menos un 70% con la secuencia aminoacídica de ITIH4 de *Bos taurus* es suficiente para poder detectar y/o cuantificar cualquiera de los productos de la expresión de cualquiera de las secuencias nucleotídicas que codifican para esta secuencia aminoacídica. Como puede observarse, al establecer un límite inferior de un 70% de identidad, se renuncia a la identificación y/o cuantificación de éstos en organismos tales como *Ratus norvegicus* por considerar que no tienen ninguna aplicación industrial.

TABLA 1

Porcentaje de identidad de las secuencias aminoacídicas de varios animales mamíferos. Los números de acceso de las secuencias que se han utilizado en este alineamiento son:

Homo sapiens (NP_002209.2), *Bos taurus* (NP_001015590), *Equus caballus* (XP_001915876), *Sus scrofa* (NP_001001537.1), *Ratus norvegicus* (NP_062242.2)

Especie 1	Especie 2	% de Identidad
<i>Bos taurus</i>	<i>Homo sapiens</i>	72
<i>Bos taurus</i>	<i>Equus caballus</i>	75
<i>Bos taurus</i>	<i>Sus scrofa</i>	76
<i>Bos taurus</i>	<i>Ratus norvegicus</i>	63
<i>Homo sapiens</i>	<i>Equus caballus</i>	79
<i>Homo sapiens</i>	<i>Sus scrofa</i>	70
<i>Homo sapiens</i>	<i>Ratus norvegicus</i>	65
<i>Equus caballus</i>	<i>Sus scrofa</i>	79
<i>Equus caballus</i>	<i>Ratus norvegicus</i>	69
<i>Sus scrofa</i>	<i>Ratus norvegicus</i>	63

Otra realización preferida de la presente invención se refiere a un método que además comprende el paso de comparar los datos obtenidos en el apartado (b) con datos estándar para encontrar alguna desviación significativa. Los datos estándar se obtienen de muestras de leche control. Las muestras de leche control pueden proceder, pero sin limitarse, de animales sanos, o animales de referencia que padezcan cualquier otra enfermedad no relacionada con una patología mamaria no tumoral. Los datos estándar pueden obtenerse *de novo* cada vez que se lleva a cabo la detección y/o cuantificación de cualquiera de los productos de la expresión de la presente invención, o bien pueden ser datos obtenidos en determinaciones anteriores. El término “desviación significativa” tal como se entiende en la presente invención hace referencia a que la comparación de los datos obtenidos en el análisis de la muestra problema respecto de los datos estándar se considera lo suficientemente amplia como para establecer una relación causal entre esta diferencia y la predisposición del animal al padecimiento de la patología mamaria no tumoral. Para determinar el valor de la diferencia a partir del cual ésta se considera significativa, se puede llevar a cabo un análisis de alguna muestra control positiva, es decir, una muestra de leche que proceda de al menos un animal que padezca una patología mamaria no tumoral en cualquiera de los estadios. Según otra realización más preferida del método, además se atribuye la desviación significativa a una predisposición de un mamífero a padecer una patología mamaria no tumoral.

Una realización preferida más se refiere al método de la presente invención donde la patología mamaria no tumoral es mastitis. Según una realización más preferida, la mastitis es puerperal. Según otra realización aún más preferida, la mastitis está causada por una infección de la mama por un agente microbiano.

El término “mastitis” se refiere a la inflamación de la glándula mamaria de los mamíferos. La mastitis puede ser llamada también absceso subareolar, ectasia ductal, inflamación periductal, enfermedad de Zuska o mamitis, entre otros términos. La mastitis afecta sobre todo al ganado bovino, especie *Bos taurus*, causado por bacterias, endureciendo los pezones del animal, al igual que la ubre, cortando el suministro de leche y en su lugar segregando un líquido amarillento y oloroso que la mayoría de las veces se acompaña de residuos de sangre.

La mastitis puerperal está causada por el bloqueo de los conductos galactóforos durante la lactación. El cuadro infeccioso, que suele aparecer a las dos a tres semanas después del parto, se caracteriza por manifestaciones que van desde la celulitis hasta la formación de abscesos.

El agente microbiano puede ser, pero sin limitarse, una bacteria, un hongo o un virus. Los microorganismos más frecuentemente asociados a una mastitis son, pero sin limitarse, estreptococos del grupo B, el *Staphylococcus aureus* y especies no tuberculosas del género *Mycobacterium* en humanos y el *Aerobacterium pyogenes* que produce una mastitis bovina transmitida por moscas o *Escherichia coli*.

La patología mamaria no tumoral puede desarrollarse en, al menos, una mama o ubre de cualquier animal mamífero. El animal mamífero se selecciona, pero sin limitarse, de la lista que comprende *Homo sapiens*, *Sus scrofa*, *Equus caballus* o *Bos taurus*. Otra realización preferida de la presente invención se refiere al método donde la muestra de leche se obtiene de un mamífero no humano. Una realización aún más preferida se refiere al método donde la muestra de leche se pertenece a la especie *Bos taurus*.

Otra realización preferida se refiere al método de la presente invención donde el producto de la expresión es ARN mensajero (ARNm), es decir, se detecta y/o cuantifica cualquiera de los fragmentos de cualquiera de los ARNm que codifican para una secuencia aminoacídica con al menos un 70% de identidad con SEQ ID NO: 1, o que codifican para SEQ ID NO: 1. Según otra realización más preferida, el método de la presente invención comprende la síntesis de uno o más fragmentos de un ADN codificado (ADNc) por una secuencia de ARNm que codifica para una secuencia aminoacídica con al menos un 70% de identidad con SEQ ID NO: 1 o que codifica para SEQ ID NO: 1, mediante RT-PCR, y el último paso sería el de detectar y/o cuantificar el fragmento sintetizado mediante RT-PCR. La síntesis de uno o más fragmentos de un ADNc codificado por una secuencia de ARNm no se limita a una sola secuencia de ADNc ni a una sola secuencia de ARNm sino que el artículo “una” se utiliza de forma indeterminada, entendiéndose que se refiere a cualquier secuencia de ADNc o ARNm que codifica para las secuencias aminoacídicas citadas.

La técnica de la RT-PCR consigue amplificar el ADN codificante de los genes deseados mediante el empleo de cualquier enzima (retrotranscriptasa; RT o transcriptasa reversa) que utiliza el ARNm aislado de la muestra descrita y un cebador reverso (ver ejemplos). El cebador reverso hará de iniciador para obtener el ADN de cadena simple o monocatenario complementario a la secuencia de ARNm transcrita. El siguiente paso es la obtención de fragmentos de ADN de doble cadena amplificados mediante PCR (de las siglas en inglés *Polimerase Chain Reaction*) utilizando como molde el ADN codificante obtenido mediante la reacción de retrotranscripción y los pares de cebadores directo/reverso que se describen en los ejemplos. Además, para la síntesis del ADN es necesaria la presencia de nucleótidos dNTPs, es decir, dATP, dTTP, dCTP y dGTP, ADN polimerasa termorresistente, cloruro de magnesio en una concentración determinada así como tampones que creen las condiciones físico-químicas adecuadas para el funcionamiento de todos los componentes y se consiga con ello la amplificación. Así pues, en la presente invención también puede llevarse a cabo una RT-PCR cuantitativa o en tiempo real.

Otra realización preferida se refiere al método de la presente invención donde la detección y/o cuantificación del fragmento de ARNm o ADNc se lleva a cabo por medio de técnicas cromatográficas y/o electroforéticas.

Las técnicas cromatográficas permiten separar moléculas en función de sus cargas, tamaños, masas moleculares, a través de la polaridad de sus enlaces o sus potenciales redox, entre otros. La técnica cromatográfica se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, cromatografía de líquidos (Cromatografía de reparto, C. de adsorción, C. de exclusión o C. de intercambio iónico), cromatografía de gases o cromatografía de fluidos supercríticos.

La electroforesis es una técnica analítica de separación de fundamento cinético basada en el movimiento o migración de las macromoléculas disueltas en un determinado medio (solución tampón de electroforesis), a través de una matriz o soporte reticulado como resultado de la acción de un campo eléctrico. El comportamiento de la molécula viene dado por su movilidad electroforética y ésta por la carga, tamaño y forma de la misma. Existen numerosas variaciones de esta técnica en función del equipo utilizado, soporte y condiciones físico-químicas en las cuales se va a llevar a cabo la separación. La electroforesis se selecciona de la lista que comprende electroforesis capilar, electroforesis en papel, electroforesis en gel de agarosa, electroforesis en gel de poliacrilamida, isoelectroenfoque, electroforesis bidimensional. Preferiblemente la electroforesis se lleva a cabo en gel de poliacrilamida (PAGE). La electroforesis PAGE se selecciona de la lista que comprende SDS-PAGE, PAGE no desnaturizante o PAGE desnaturizante.

Otra realización preferida es el método donde el producto de la expresión es una proteína o cualquiera de sus fragmentos. Es decir, el método para la detección y/o cuantificación de cualquiera de las proteínas con al menos un 70% de identidad con SEQ ID NO: 1, de SEQ ID NO: 1 o con cualquiera de los fragmentos de éstas.

En otra realización preferida del método de la presente invención, la proteína o cualquiera de sus fragmentos se detecta y/o cuantifica por medio de técnicas seleccionadas de la lista que comprende técnicas cromatográficas, electroforéticas o inmunoquímicas, o por cualquiera de sus combinaciones.

La técnica inmunoquímica es una prueba en la que está implicada la detección de un anticuerpo unido a su antígeno. En la presente invención, el antígeno puede ser cualquiera de los fragmentos de cualquiera de las proteínas con al menos un 70% de identidad con SEQ ID NO: 1 o cualquiera de los fragmentos de SEQ ID NO: 1. Una de las técnicas inmunoquímicas más usadas es la técnica ELISA.

Según una realización preferida del método de la presente invención, la proteína o cualquiera de sus fragmentos se detecta en un periodo de entre 12 y 30 horas después del comienzo de una infección de la mama por un agente microbiano.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de uno o más productos de la expresión de una secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica con al menos un 70% de identidad con SEQ ID NO: 1 como biomarcador de una patología mamaria no tumoral o como biomarcador para la monitorización del tratamiento de dicha patología, en una muestra de leche. Una realización preferida se refiere al uso según el aspecto anterior donde la secuencia aminoacídica es SEQ ID NO: 1. El uso de uno o más productos de la expresión de una secuencia nucleotídica no se limita a una sola secuencia nucleotídica sino que el artículo “una” se utiliza de forma indeterminada, entendiéndose que se refiere a cualquier secuencia nucleotídica que codifica para las secuencias aminoacídicas citadas.

Según otra realización preferida de los usos anteriores, la patología mamaria no tumoral es mastitis.

Un aspecto más de la presente invención es un kit para la obtención de datos útiles para la detección de una predisposición a una patología mamaria no tumoral o para la monitorización del tratamiento de dicha patología que comprende una o más sondas:

- a. para reconocer uno o más productos de la expresión de una secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica con al menos un 70% de identidad con SEQ ID NO: 1,
- b. para reconocer uno o más productos de la expresión de una secuencia nucleotídica que codifica para la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1, o
- c. para reconocer cualquier fragmento de dichos productos.

En los apartados (a) o (b), el reconocimiento de uno o más productos de la expresión de una secuencia nucleotídica no se limita a una sola secuencia nucleotídica sino que el artículo “una” se utiliza de forma indeterminada, entendiéndose que se refiere a cualquier secuencia nucleotídica que codifica para las secuencias aminoacídicas citadas.

Una sonda es una sustancia normalmente marcada (aunque no necesariamente) que se usa para detectar, identificar y/o cuantificar cualquier fragmento de cualquiera de los productos de la expresión de cualquiera de las secuencias nucleotídicas que codifican para una secuencia aminoacídica con al menos un 70% de identidad con SEQ ID NO: 1, o para reconocer cualquiera de los fragmentos de SEQ ID NO: 1.

Una realización preferida de la presente invención se refiere al kit donde las sondas están fijadas a un soporte sólido. Según otra realización más preferida, las sondas son anticuerpos.

El soporte sólido puede ser, por ejemplo, pero sin limitarse, vidrio, plástico, silicio, agarosa o poliacrilamida. El soporte sólido puede ser un “chip” al cual se fijan una serie de fragmentos de ADN, péptidos, anticuerpos o cualquier otro producto de la expresión tal como se ha definido en la presente invención. La detección y/o cuantificación de cualquiera de los péptidos de la presente invención se puede llevar a cabo mediante la fijación de cualquiera de los péptidos al *chip* y su hibridación con anticuerpos específicos marcados con una molécula cromogénica, fluorogénica o quimioluminiscente.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para el experto en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Fig. 1. Muestra la concentración de la proteína *ITIH4* en suero y leche de animales con mastitis

La concentración de proteína se determina por inmunodifusión radial utilizando antisueros específicos contra la proteína, y proteína purificada en diluciones seriadas como estándar primario para confeccionar la recta patrón.

En el eje de ordenadas se representa la concentración de proteína *ITIH4* detectada en relación con el tiempo que transcurre desde que se lleva a cabo la infección. El tiempo (en horas) se representa en el eje de abscisas.

Fig. 2. Muestra el análisis de la expresión del gen *ITIH4*

Los carriles 1 muestran el fragmento de ADNc amplificado que indica la expresión del gen *ITIH4* (362 pb) y los carriles 2 muestran el fragmento de ADNc que indica la expresión del gen control *GAPDH* (298 pb), en células somáticas procedentes de leche de vacas que padecen mastitis (A), de vacas sanas (B) y de vaca que padece tuberculosis (C) en un gel de agarosa al 1%.

Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores que describen la determinación de la expresión del ARNm correspondiente a la proteína *ITIH4* de *Bos taurus*, en las células somáticas aisladas de leche procedente de vaca con mastitis (de acuerdo con diagnóstico veterinario y microbiológico). Se realiza por transcripción inversa del ARN total celular, seguida de PCR (RT-PCR). Se analiza asimismo su expresión en células somáticas aisladas a partir de leche fresca de vaca sana (primer parto, sin historial de infecciones).

Ejemplo 1

Materiales y métodos

Animales: Los ensayos se llevan a cabo con seis vacas de 3 años de edad que habían parido recientemente, con mastitis (infección por *Escherichia coli*, determinado en análisis microbiológico). El análisis veterinario evalúa los signos sistémicos y locales, que se clasifican entre 1 y 3 para mastitis suave, moderada y severa. A los tiempos que se indican, se toman muestras de sangre de la vena yugular y las muestras de leche se recogen de forma aséptica y se almacenan a -70°C. Alternativamente, se toman muestras de suero y leche en vacas de granjas positivas para brote infeccioso.

Proteína *ITIH4* y antisueros específicos: La proteína *ITIH4* se purifica siguiendo los protocolos descritos anteriormente que combinan cromatografía de filtración en gel, de intercambio iónico y de afinidad (González-Ramón *et al.*, 1995. *FEBS Lett.* 371(3): 227-30). La proteína purificada se inyecta en conejos y los antisueros se generan de acuerdo con los protocolos de rutina (González-Ramón *et al.*, 1995. *FEBS Lett.* 371 (3): 227-30).

Determinación de la concentración de *ITIH4*: La concentración de la proteína se determina en las muestras biológicas por inmunodifusión radial, en geles de agarosa al 1% que contienen el antisuero específico anti-*ITIH4* bovina (Pineiro *et al.*, 2004. *Infect Immun.* 72(7): 3777-82).

Aislamiento de ARN total y RT-PCR: Se toma una muestra de leche de vaca, se centrifuga para obtener las células somáticas. Se recogen las células y se añade el reactivo para la extracción de ARN (González-Ramón *et al.*, 2000. *Eur J Biochem.* 267(6): 1878-85). El ARN total se convierte en ADNc tratándolo con transcriptasa inversa (Piñeiro *et al.*, 2004. *Infection and Immunity*, 72 (7): 3777-3782). Cada muestra se divide en tres dos tubos y se realiza una PCR en presencia de los cebadores específicos: cebador directo SEQ ID NO: 2 (exón 20) y cebador reverso SEQ ID NO: 3 (exón 22), para la amplificación de los correspondientes genes de *ITIH4* y de un gen control (gliceraldehído 3-P-dehidrogenasa, *GAPDH* (Piñeiro *et al.*, 2004. *Infection and Immunity*, 72 (7): 3777-3782). Se realiza el control del ensayo para controlar contaminaciones inespecíficas, en ausencia de ADNc molde.

Ejemplo 2

Resultados

2.1. Evaluación de la patología en los animales

Las vacas desarrollaron mastitis clínica a las 8-12 horas después de la infección. Se observó un valor máximo en el recuento de células somáticas (RCS) a las 16 horas, con presencia de bacterias en leche a las 8 horas que se eliminó a los 3-4 días posteriores. Los signos sistémicos volvieron a la normalidad a las 48 horas y los signos locales tanto de las ubres infectadas como de la apariencia de la leche desaparecieron a los 7 días.

2.2. Determinación de la proteína ITIH4 en suero y leche de vacas con mastitis

Se aisló la proteína ITIH4 de la leche de vacas con mastitis aguda, y se utilizó para preparar antisueros específicos para su determinación inmunoquímica. Los resultados obtenidos, indican sin lugar a dudas que esta proteína no aparece en la leche de vacas sanas y se puede detectar en la leche de vacas con mastitis. En suero, los valores máximos se obtuvieron a las 60 horas después de la infección, alcanzándose valores de 3 mg/ml (Fig. 1), mientras que en la leche, los valores máximos se observaron más tempranamente, alrededor de las 16 horas después de la infección, con una concentración para la ITIH4 de 0,53 mg/ml (Fig. 1).

2.3. Análisis por RT-PCR de la expresión de *ITIH4* en animales con mastitis

En la Fig. 2 se muestra el análisis por RT-PCR de la expresión del gen que codifica para ITIH4 de *Bos taurus* (Fig. 2, carriles 1) y de un gen control (*GAPDH*) (Fig. 2, carriles 2), en vacas con mastitis (A) y en vacas sanas (B) en un gel de agarosa al 1% tras tinción con bromuro de etidio. Se realiza el control del ensayo para controlar contaminaciones inespecíficas (Fig. 2, control). La presencia de una banda única a los tamaños que se indican, determina la expresión de esos genes (el fragmento amplificado de *ITIH4* tiene 362 pares de bases [pb] y el fragmento amplificado de *GAPDH* tiene 298 pb) en las muestras analizadas. Asimismo, se observa la expresión positiva del gen *ITIH4* en células somáticas procedentes de leche de vaca que padecen tuberculosis (C) (Fig. 2). El resultado obtenido indica que el ARNm del gen *ITIH4* se expresa en las células procedentes de vaca con mastitis, siendo indetectable en las correspondientes de animales sanos, a diferencia del ARNm del gen *GAPDH*, cuya expresión no cambió en ninguno de los dos casos.

REIVINDICACIONES

1. Método de obtención de datos útiles para la detección de una predisposición a una patología mamaria no tumoral que comprende:

- a. Obtener una muestra de leche de un mamífero,
- b. detectar y/o cuantificar uno o más productos de la expresión de una secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica con al menos un 70% de identidad con SEQ ID NO: 1, presentes en la muestra de leche según el apartado (a), o cualquier fragmento de dichos productos.

2. Método según la reivindicación 1 donde la secuencia aminoacídica del apartado (b) es SEQ ID NO: 1.

3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde además comprende comparar los datos obtenidos en el apartado (b) con datos estándar para encontrar alguna desviación significativa.

4. Método según la reivindicación 3, donde además se atribuye la desviación significativa a una predisposición de un mamífero a padecer una patología mamaria no tumoral.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde la patología mamaria no tumoral es mastitis.

6. Método según la reivindicación 5 donde la mastitis es puerperal.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6 donde la mastitis se produce por una infección de la mama causada por un agente microbiano.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la muestra de leche se obtiene de un mamífero no humano.

9. Método según la reivindicación 8, donde el mamífero pertenece a la especie *Bos taurus*.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 donde el producto de la expresión es un ARN mensajero (ARNm).

11. Método según la reivindicación 10 que comprende:

- a. Sintetizar uno o más fragmentos de un ADN codificado (ADNc) por una secuencia de ARNm que codifica para una secuencia aminoacídica con al menos un 70% de identidad con SEQ ID NO: 1 o que codifica para SEQ ID NO: 1, mediante RT-PCR, y
- b. detectar y/o cuantificar el fragmento sintetizado según el apartado (a).

12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11 donde la detección y/o cuantificación del fragmento de ARNm o ADNc se lleva a cabo por medio de técnicas cromatográficas y/o electroforéticas.

13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 donde el producto de la expresión es una proteína o cualquiera de sus fragmentos.

14. Método según la reivindicación 13 donde la proteína o cualquiera de sus fragmentos se detecta y/o cuantifica por medio de técnicas seleccionadas de la lista que comprende técnicas cromatográficas, electroforéticas o inmunoquímicas, o por cualquiera de sus combinaciones.

15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14 donde la proteína o cualquiera de sus fragmentos se detecta en un periodo de entre 12 y 30 horas después del comienzo de una infección de la mama por un agente microbiano.

16. Uso de uno o más productos de la expresión de una secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica con al menos un 70% de identidad con SEQ ID NO: 1 como biomarcador de una patología mamaria no tumoral, obtenido en una muestra de leche.

17. Uso de uno o más productos de la expresión de una secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica con al menos un 70% de identidad con SEQ ID NO: 1 como biomarcador para la monitorización del tratamiento de una patología mamaria no tumoral, obtenido en una muestra de leche.

18. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 16 ó 17, donde la secuencia aminoacídica es SEQ ID NO: 1.

19. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18 donde la patología mamaria no tumoral es mastitis.

20. Kit para la obtención de datos útiles para la detección de una predisposición a una patología mamaria no tumoral o para la monitorización del tratamiento de dicha patología que comprende una o más sondas:

- a. para reconocer uno o más productos de la expresión de una secuencia nucleotídica que codifica para una secuencia aminoacídica con al menos un 70% de identidad con SEQ ID NO: 1,
- b. para reconocer uno o más productos de la expresión de una secuencia nucleotídica que codifica para la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 1, o
- c. para reconocer cualquier fragmento de dichos productos.

21. Kit según la reivindicación 20, donde las sondas están fijadas a un soporte sólido.

22. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 20 ó 21 donde las sondas son anticuerpos.

LECHE

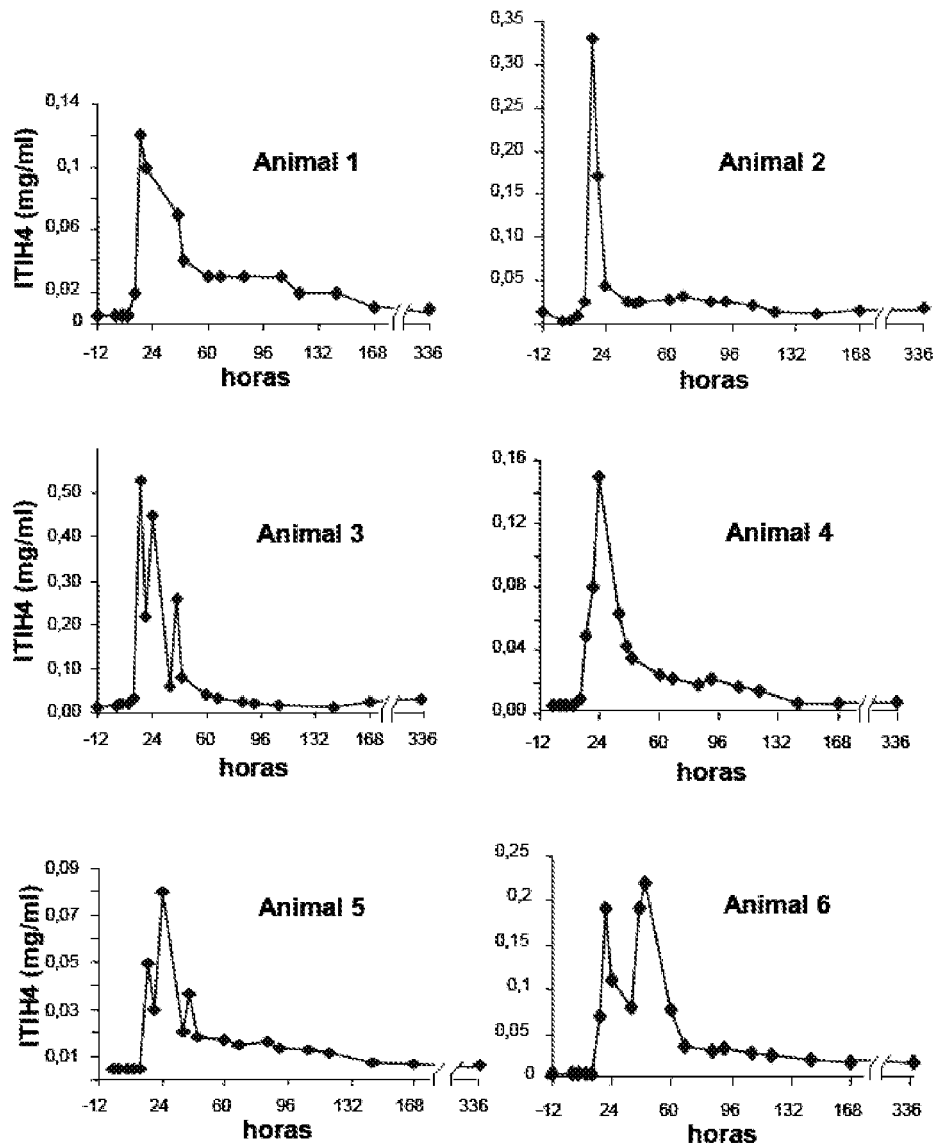


FIG. 1

SUERO

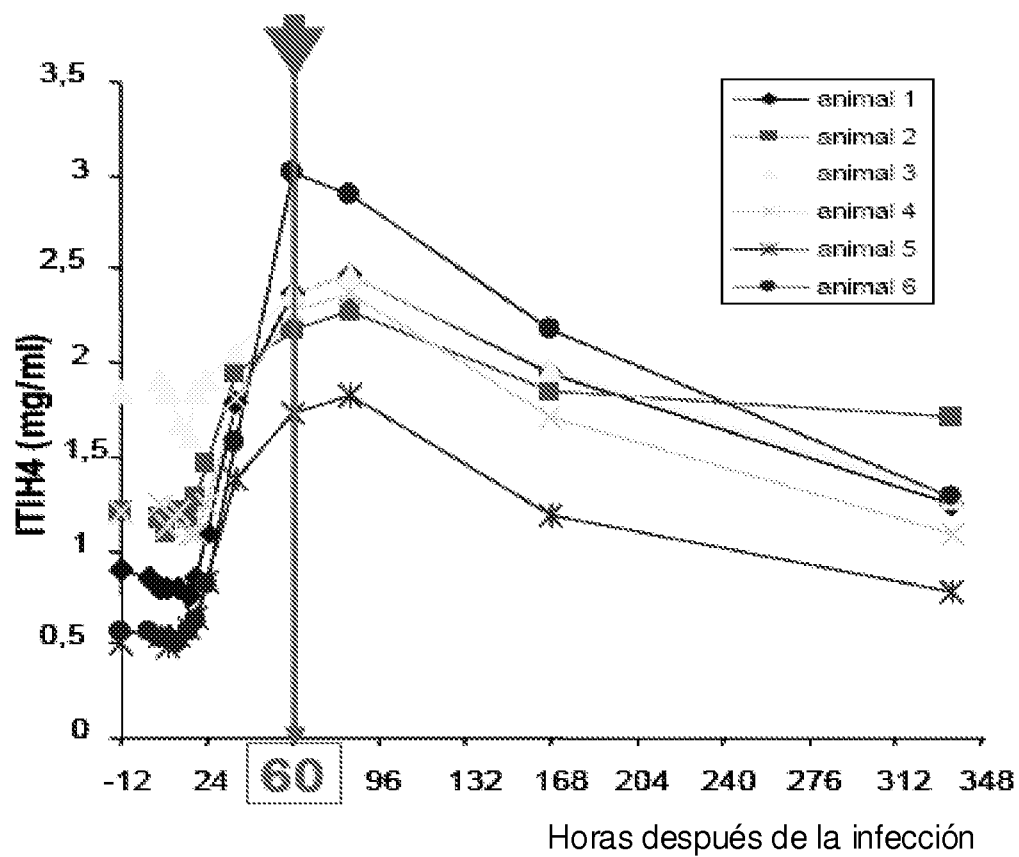


FIG. 1 (Cont.)

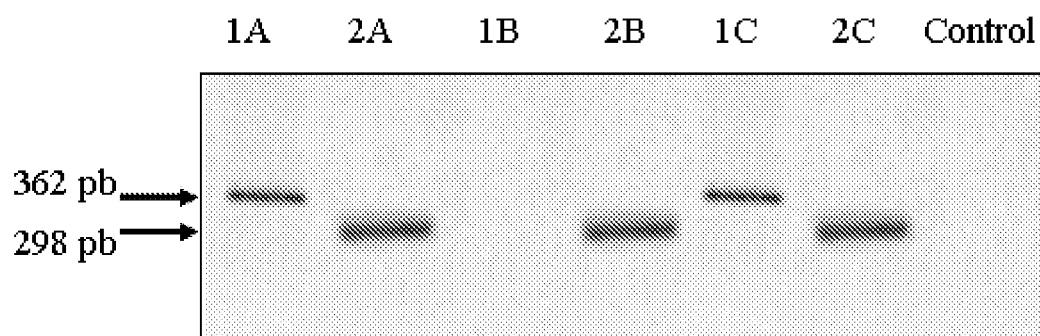


FIG. 2

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Zaragoza

5 <120> Nuevo biomarcador, ITIH4, para la detección de la predisposición a una patología mamaria no tumoral

<130> ES1510.32

10 <160> 3

<170> PatentIn version 3.5

15 <210> 1

<211> 914

<212> PRT

20 <213> *Bos taurus*

<400> 1

25	Met	Lys	Thr	Pro	Ala	Pro	Gly	Arg	Ile	His	Ser	Ile	Val	Leu	Val	Leu	1		5		10				15		
	Leu	Ser	Leu	Ala	Val	Leu	Gln	Thr	Ser	Lys	Ala	Gln	Lys	Val	Gln	Asn				25				30			
30	Asp	Ile	Asp	Ile	Tyr	Ser	Leu	Thr	Val	Asp	Ser	Lys	Val	Ser	Ser	Arg				40				45			
35	Phe	Ala	His	Thr	Val	Ile	Thr	Ser	Arg	Val	Val	Asn	Lys	Ala	Asp	Ala				55				60			
40	Val	Arg	Glu	Ala	Thr	Phe	Gln	Met	Glu	Leu	Pro	Lys	Lys	Ala	Phe	Ile	65		70		75					80	
	Thr	Asn	Phe	Ser	Met	Val	Ile	Asp	Gly	Val	Thr	Tyr	Pro	Gly	Asn	Ile				85				90		95	
45	Lys	Glu	Lys	Ala	Ala	Ala	Gln	Glu	Gln	Tyr	Ser	Ala	Ala	Val	Ala	Arg				100				105		110	
50	Gly	Glu	Ser	Ala	Gly	Leu	Val	Arg	Ala	Thr	Gly	Arg	Lys	Thr	Glu	Gln				115				120		125	
	Phe	Gln	Val	Ser	Val	Ser	Val	Ala	Pro	Ala	Ala	Lys	Val	Thr	Phe	Glu				130				135		140	
55	Leu	Val	Tyr	Glu	Glu	Leu	Leu	Ala	Arg	His	Leu	Gly	Ala	Tyr	Glu	Leu				145				150		155	
60	Leu	Leu	Lys	Val	Arg	Pro	Gln	Gln	Leu	Val	Lys	His	Leu	Gln	Met	Asp				165				170		175	
65	Ile	His	Ile	Phe	Glu	Pro	Gln	Gly	Ile	Ser	Phe	Leu	Glu	Thr	Glu	Ser				180				185		190	

ES 2 355 461 B1

	Thr	Phe	Met 195	Thr	Asn	Lys	Leu	Ala 200	Glu	Ala	Leu	Thr	Thr 205	Ser	Gln	Asn
5	Lys	Thr 210	Lys	Ala	His	Val	Arg 215	Phe	Lys	Pro	Thr	Leu 220	Ser	Gln	Gln	Gln
10	Lys 225	Tyr	Pro	Glu	Lys	Gln 230	Asp	Thr	Val	Ile	Asp 235	Gly	Ser	Phe	Ile	Val 240
15	Arg	Tyr	Asp	Val	Asp 245	Arg	Pro	Leu	Ser	Gly 250	Gly	Ser	Ile	Gln	Ile 255	Glu
20	Asn	Gly	Tyr	Phe 260	Val	His	Tyr	Phe	Ala 265	Pro	Asp	Ser	Leu	Ser 270	Thr	Ile
25	Pro	Lys	Asn 275	Val	Ile	Phe	Val	Ile 280	Asp	Lys	Ser	Gly	Ser 285	Met	Met	Gly
30	Arg	Lys 290	Ile	Lys	Gln	Thr	Arg 295	Glu	Ala	Leu	Ile	Lys 300	Ile	Leu	Asp	Asp
35	Leu 305	Ser	Pro	His	Asp	Gln 310	Phe	Asp	Leu	Ile	Ser 315	Phe	Ser	Ser	Glu	Ala 320
40	Thr	Thr	Trp	Lys	Pro 325	Leu	Leu	Val	Pro	Ala 330	Ser	Thr	Glu	Asn	Val 335	Asn
45	Glu	Ala	Lys	Ser 340	Tyr	Ala	Thr	Gly	Ile 345	Gln	Ala	Gln	Gly	Gly 350	Thr	Asn
50	Ile	Asn	Asp 355	Ala	Met	Leu	Met	Ala 360	Val	Gln	Leu	Leu	Glu 365	Lys	Ala	Asn
55	Gln	Glu 370	Glu	Leu	Leu	Pro	Glu 375	Gly	Ser	Ile	Thr	Leu 380	Ile	Ile	Leu	Leu
60	Thr 385	Asp	Gly	Asp	Pro	Thr 390	Val	Gly	Glu	Thr	Asn 395	Pro	Leu	Asn	Ile	Gln 400
65	Lys	Asn	Val	Arg	Lys 405	Ala	Ile	Asn	Gly	Gln 410	His	Ser	Leu	Phe	Cys 415	Leu
	Gly	Phe	Gly	Phe 420	Asp	Val	Ser	Tyr	Ala 425	Phe	Leu	Glu	Lys	Met 430	Ala	Leu
	Glu	Asn	Gly 435	Gly	Leu	Ala	Arg	Arg 440	Ile	Tyr	Glu	Asp	Ser 445	Asp	Ser	Ala

ES 2 355 461 B1

	Leu	Gln	Leu	Gln	Asp	Phe	Tyr	Gln	Glu	Val	Ala	Asn	Pro	Leu	Met	Thr
	450						455					460				
5	Ser	Val	Ala	Phe	Glu	Tyr	Pro	Ser	Asn	Ala	Val	Glu	Ser	Val	Thr	Gln
	465					470					475					480
10	Asp	Thr	Phe	Arg	Val	Phe	Phe	Lys	Gly	Ser	Glu	Leu	Val	Val	Ala	Gly
					485					490					495	
15	Lys	Leu	Arg	Glu	Gln	Ser	Pro	Asp	Val	Leu	Leu	Ala	Gln	Ile	Arg	Gly
				500					505					510		
20	Gln	Leu	His	Arg	Glu	Asn	Ile	Thr	Tyr	Met	Met	Met	Ser	His	Val	Ala
			515					520					525			
25	Glu	Gln	Glu	Glu	Met	Phe	Arg	Ser	Pro	Lys	Tyr	Ile	Phe	His	Ser	Phe
		530					535					540				
30	Ile	Glu	Arg	Leu	Trp	Ala	Tyr	Leu	Thr	Ile	Gln	Gln	Leu	Leu	Glu	Gln
	545					550					555					560
35	Met	Val	Ser	Ala	Leu	Asp	Ala	Glu	Lys	Gln	Ala	Leu	Glu	Ala	Arg	Ala
					565					570					575	
40	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Tyr	Ser	Phe	Val	Thr	Pro	Leu	Thr	Ser	Met
				580					585					590		
45	Val	Ile	Thr	Lys	Pro	Glu	Gly	Gln	Glu	Gln	Ser	Gln	Val	Ala	Glu	Lys
			595					600					605			
50	Pro	Val	Glu	Asp	Glu	Ser	Arg	Gly	Ser	Arg	Val	Tyr	Leu	Gly	Pro	Met
		610					615					620				
55	Arg	Phe	Gly	His	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Thr	Ser	Arg	Lys	Pro	Gly	Gly
	625					630					635					640
60	Gly	Leu	Lys	Leu	Leu	Asn	Gly	Thr	Pro	Leu	Phe	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro
					645					650					655	
65	Pro	Ala	Ala	Ala	Ser	Pro	Phe	His	Arg	Met	Thr	Ser	Arg	Leu	Val	Leu
				660					665					670		
70	Pro	Glu	Leu	Met	Ser	Pro	Leu	Ala	Pro	Ala	Ser	Ala	Pro	Ser	Pro	Thr
			675					680					685			
75	Ser	Gly	Pro	Gly	Gly	Ala	Ser	His	Asp	Thr	Asp	Phe	Arg	Ile	Lys	Gly
		690					695					700				
80	Thr	Thr	Pro	Thr	Ala	Leu	Pro	Phe	Ala	Pro	Val	Gln	Ala	Pro	Ser	Val
	705					710					715					720

ES 2 355 461 B1

Ile Leu Pro Leu Pro Gly Gln Ser Val Asp Arg Leu Cys Val Asp Leu
 725 730 735
 5 Arg Arg Pro Gln Glu Leu Val Asn Leu Leu Ser Asp Pro Asp Gln Gly
 740 745 750
 10 Val Glu Val Thr Gly His Phe Glu Thr Ala Lys Ala Arg Phe Ser Trp
 755 760 765
 15 Ile Glu Val Thr Phe Glu Asn Pro Gln Val Gln Ile His Ala Ser Pro
 770 775 780
 Glu His Val Val Met Thr Arg Asn Arg Arg Asn Ser Ala Tyr Lys Trp
 785 790 795 800
 20 Lys Glu Thr Leu Tyr Ser Val Met Pro Gly Leu Lys Val Thr Met Asp
 805 810 815
 25 Lys Glu Gly Leu Leu Leu Leu Ser Arg Pro Asp Arg Val Thr Ile Gly
 820 825 830
 30 Leu Leu Phe Trp Asp Gly Pro Gly Lys Gly Leu Arg Leu Leu Leu Gln
 835 840 845
 35 Asn Thr Asp Arg Phe Ser Ser His Val Ser Gly Thr Leu Gly Gln Phe
 850 855 860
 Tyr Gln Asp Val Leu Trp Gly Pro Leu Asp Thr Ala Asp Asp Ser Lys
 865 870 875 880
 40 Arg Thr Leu Lys Val Gln Gly Arg Asp Tyr Ser Ala Thr Arg Glu Leu
 885 890 895
 45 Lys Leu Asp Tyr Gln Glu Ser Pro Pro Gly Lys Glu Ile Ser Cys Trp
 900 905 910
 Ser Val
 50 <210> 2
 <211> 17
 <212> DNA
 55 <213> *Bos taurus*
 <400> 2
 60 ccgcttctcg tggattg
 <210> 3
 <211> 19
 65 <212> DNA
 <213> *Bos taurus*

<400> 3

ccttcagtggt tcgcttgct

19

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200930332

②② Fecha de presentación de la solicitud: 18.06.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	PIÑEIRO, M, <i>et al.</i> ITIH4 (inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4) is a new acute-phase protein isolated from cattle during experimental infection. Infection and immunity. Jul 2004. Vol. 72, nº 7, páginas 3777-3782. ISSN 0019-9567 (Impreso). Ver todo el documento.	1-22
A	BOEHMER, J.L., <i>et al.</i> Proteomic Analysis of Differentially Expressed Proteins in Bovine Milk During Experimentally Induced Escherichia coli Mastitis. Journal of Dairy Science. Nov 2008. Vol. 91, nº 4, páginas 4206-4218. ISSN 0022-0302. Ver todo el documento.	1-22
A	HOGARTH, C.J., <i>et al.</i> Differential protein composition of bovine whey: a comparison of whey from healthy animals and from those with clinical mastitis. Proteomics. Jul 2004. Vol. 4, nº 7, páginas 2094-2100. ISSN 1615-9853 (Impreso). Ver todo el documento.	1-22
A	ES 2077175 T3 (SANWA KAGAKU KENKYUSHO, CO., LTD) 26.02.1992, todo el documento.	1-22
A	ES 2190753 A1 (UNIVERSIDAD DE OVIEDO) 01.08.2003, todo el documento.	1-22
A	LEE, K-H, <i>et al.</i> Development of a novel biochip for rapid multiplex detection of seven mastitis-causing pathogens in bovine milk samples. Journal of veterinary diagnostic investigation. Jul 2008. Vol. 20, nº 4, páginas 463-471. ISSN 1040-6387 (Impreso). Ver todo el documento.	1-22

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
11.03.2011

Examinador
B. Pérez Esteban

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A01J5/013 (01.01.2006)**C07K14/47** (01.01.2006)**G01N33/04** (01.01.2006)

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

A01J, C07K, G01N

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, TXTUS0, TXTUS1, TXTUS2, TXTUS3, TXTEP1, TXTGB1, TXTWO1, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP, EBI (UniProt, Euro Patents, Japan Patents, Korea Patents, US Patents, EMBL All).

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 11.03.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-22	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-22	SI
	Reivindicaciones	NO

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	PIÑEIRO, M, <i>et al.</i> Infection and immunity. Jul 2004. Vol. 72, nº 7, páginas 3777-3782. ISSN 0019-9567 (Impreso).	Jul 2004
D02	BOEHMER, J.L., <i>et al.</i> Journal of Dairy Science. Nov 2008. Vol. 91, nº 4, páginas 4206-4218. ISSN 0022-0302.	Nov 2008
D03	HOGARTH, C.J., <i>et al.</i> Proteomics. Jul 2004. Vol. 4, nº 7, páginas 2094-2100. ISSN 1615-9853 (Impreso).	Jul 2004
D04	ES 2077175 T3 (SANWA KAGAKU KENKYUSHO, CO., LTD)	26-02-1992
D05	ES 2190753 A1 (UNIVERSIDAD DE OVIEDO)	01-08-2003
D06	LEE, K-H, <i>et al.</i> Journal of veterinary diagnostic investigation. Jul 2008. Vol. 20, nº 4, páginas 463-471. ISSN 1040-6387 (Impreso).	Jul 2008

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

La presente solicitud de patente describe y reivindica un método para la detección de la predisposición a padecer una patología mamaria no tumoral (preferentemente mastitis). El método se basa en la detección en muestras de leche de la proteína biomarcadora ITIH4 (una proteína de fase aguda) o de un ácido nucleico que codifique dicha proteína, de forma que un aumento en la cantidad de la proteína o del ácido nucleico en las muestras de leche es indicativo de una predisposición a padecer la enfermedad.

No se ha encontrado en el estado de la técnica ningún documento en el que se emplee la proteína de la invención (ITIH4) como biomarcador de patologías mamarias no tumorales, por lo que la invención es nueva y tiene actividad inventiva según los artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes.

A continuación se resumen algunos documentos del estado de la técnica que se consideran cercanos a la solicitud, pero que no afectan su patentabilidad.

En el documento D01, citado en la solicitud de patente, se divulga la presencia de ITIH4 en suero sanguíneo de vaca, así como el aumento en la cantidad de proteína detectada en vacas a las que se ha inducido mastitis de forma experimental. Puesto que el método reivindicado en la solicitud se basa en la detección de la proteína en muestras de leche en lugar de en sangre, no se considera que el documento D01 afecte la novedad ni la actividad inventiva de la solicitud.

Los documentos D02 y D03 describen sendos análisis proteómicos de las proteínas que se expresan de forma diferencial en suero lácteo de vacas con mastitis y en suero de vacas sanas. En ambos documentos se comparan los perfiles proteicos obtenidos por electroforesis bidimensional, y se identifican los péptidos seleccionados mediante técnicas de MALDI-TOF. Entre las proteínas que aumentan su concentración en leche de vacas afectadas de mastitis, los autores describen proteínas procedentes de suero sanguíneo, que, presumiblemente, habrían pasado a la leche por el aumento en la permeabilidad de la barrera sangre-leche ocasionado por el proceso infeccioso. En el documento D02, el estudio revela que en sueros mastíticos la cantidad de alfa-1-glicoproteína ácida es mayor que en sueros normales; por tanto, esta proteína, que es una proteína de fase aguda (como ITIH4), podría emplearse como biomarcador de mastitis.

Los documentos D04, D05 y D06 divulgan métodos de detección de mastitis que, como el método de la invención, sirven para el diagnóstico precoz de la enfermedad (antes de que ésta muestre signos clínicos). El método descrito en D04 se basa en medir, mediante un reactivo colorimétrico, la concentración del ácido 3-hidroxiláctico en muestras de leche. El método de D05 consiste en emplear las medidas de permitividad eléctrica y de temperatura de la leche como indicadores de la concentración de células somáticas, dato que se emplea para determinar la presencia de mastitis en el animal. Finalmente, en el documento D06, la detección temprana de mastitis se realiza empleando un biochip mediante el cual se amplifica mediante PCR el ADN de 7 especies de microorganismos causantes de mastitis, cuya presencia se revela por una reacción colorimétrica.

Como se ha comentado antes, ninguno de los documentos citados en este informe afecta la novedad ni la actividad inventiva de la presente solicitud, puesto que no contienen información que pudiera inducir al experto en la materia a desarrollar el método reivindicado de forma evidente.