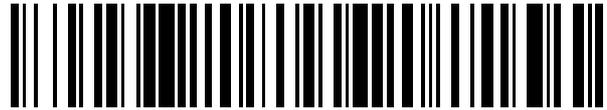


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 552**

21 Número de solicitud: 201301179

51 Int. Cl.:

**C07K 16/18** (2006.01)

**G01N 33/569** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**20.12.2013**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**22.06.2015**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDADE DE VIGO (100.0%)**  
**Campus Universitario s/n**  
**36310 Vigo (Pontevedra) ES**

72 Inventor/es:

**GARCÍA ESTÉVEZ , José Manuel;**  
**IGLESIAS BLANCO, Raúl y**  
**RODRÍGUEZ QUIROGA, Juan José**

54 Título: **Anticuerpo monoclonal que reconoce Enteromyxum scophthalmi, procedimiento y kit de diagnóstico de la enteromixosis del rodaballo**

57 Resumen:

La presente invención hace referencia a un anticuerpo monoclonal que reconoce Enteromyxum scophthalmi, procedimiento y kit de diagnóstico de la enteromixosis del rodaballo. La presente invención tiene como objeto el anticuerpo monoclonal VIE1 que reconoce de forma específica, epítomos presentes en las diferentes fases de desarrollo del mixosporidio patógeno del rodaballo. Esta invención también se refiere al procedimiento de diagnóstico de la enteromixosis del rodaballo producida por Enteromyxum scophthalmi, que comprende la adición del anticuerpo a una muestra obtenida de un rodaballo y la detección de dicho anticuerpo. En otro aspecto la invención se refiere a un kit de diagnóstico de la enteromixosis del rodaballo.

ES 2 538 552 A1

**ANTICUERPO MONOCLONAL QUE RECONOCE *ENTEROMYXUM SCOPHTHALMI*,  
PROCEDIMIENTO Y KIT DE DIAGNÓSTICO DE LA ENTEROMIXOSIS DEL RODABALLO**

**DESCRIPCIÓN**

5

**CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención tiene como objeto el anticuerpo monoclonal específico VIE1, para ser utilizado mediante técnicas inmunológicas en el diagnóstico de la enteromixosis del rodaballo producida por *E. scopthalmi*. La técnica se incluye dentro del ámbito de la acuicultura y, además de su utilidad en el diagnóstico de la enfermedad, el anticuerpo puede  
10 ayudar en la caracterización inmunoquímica de los epítomos reconocidos, y a la localización de moléculas que puedan ser de aplicación en la inmunoprotección frente al parásito.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

15 La enteromixosis es una enfermedad parasitaria emergente causada por mixosporidios pertenecientes al género *Enteromyxum* y que está considerada como la enfermedad más grave que afecta a la piscicultura marina en España. En el rodaballo, está causada por la especie *E. scopthalmi* que produce un cuadro progresivo de enteritis catarral y emaciación progresiva (*síndrome de cabeza hundida*) que se encuentra asociado a elevadas  
20 mortalidades.

El desarrollo de la infección, en los peces, provoca la destrucción progresiva del epitelio intestinal, lo que se traduce en un estado de desnutrición extrema (caquexia) que lleva finalmente a la muerte del hospedador.

25

Para realizar un correcto diagnóstico de las enfermedades producidas por mixosporidios se depende de la identificación por microscopía de las formas morfológicas del parásito (esporas) originadas en la fase final de su desarrollo ya que no siempre es fácil observar los estadios intracelulares característicos de su desarrollo.

30

En el caso de *E. scopthalmi*, la escasez de esporas en el contenido intestinal de los peces enfermos y la dificultad para diferenciar sus formas plasm<sub>o</sub>diales iniciales condiciona la aplicación de estas técnicas de diagnóstico microscópico sencillas si no se dispone de un adecuado entrenamiento, y aun teniéndolo, es extremadamente difícil diagnosticar con  
35 fiabilidad las infecciones leves o iniciales. A día de hoy, no existe tampoco la posibilidad de utilizar técnicas de cultivo para amplificar la presencia del parásito en las muestras

diagnósticas, ya que, hasta el momento, no se ha podido establecer ningún procedimiento que permita el cultivo de mixosporidios. Este último aspecto, junto con la imposibilidad para aislar correctamente el parásito de las muestras intestinales, condiciona también la posibilidad de establecer y ensayar estrategias de inmunoprofilaxis frente a la infección, para la cual, aunque se han realizado algunos estudios preliminares, no existe todavía ningún tratamiento farmacológico efectivo aplicable a gran escala en explotaciones de acuicultura.

Entre los factores fundamentales que determinan la gravedad de la enteromixosis en el rodaballo están su lento periodo de incubación, que puede llegar a ser de varios meses, acompañado de la dificultad para el diagnóstico en etapas iniciales de la infección, así como su transmisión directa. Por eso cuando se detecta un pez clínicamente enfermo, es altamente probable que el parásito esté ya diseminado por toda la explotación.

Recientemente, el gran impulso experimentado por las tecnologías moleculares, ha permitido el desarrollo de métodos de detección por sondas moleculares basadas en la tecnología del ADN o con anticuerpos policlonales.

Al tratarse de un parásito del tracto digestivo, los principales problemas que presentan las técnicas de biología molecular se encuentran en la presencia de inhibidores de la polimerasa en las muestras fecales, o que la conservación de las muestras biológicas degraden el ADN, o inhiban la PCR. Además, sigue resultando una técnica laboriosa, que requiere cierto equipamiento y el coste continúa siendo alto.

Por otro lado, el empleo de anticuerpos policlonales presenta algún que otro inconveniente como que la mezcla de anticuerpos producida es heterogénea, existe variación en los lotes, el suministro es limitado y la respuesta no es reproducible en otro animal.

Por este motivo, se hace indispensable disponer de un método de diagnóstico rápido, fiable y precoz que permita detectar el parásito en fases tempranas de la infección para poder aplicar rápidamente las oportunas medidas de control. Se hace necesario buscar una solución más económica y menos laboriosa para el diagnóstico de la enteromixosis del rodaballo por *E. scophthalmi*.

#### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Una realización de la invención es un anticuerpo monoclonal VIE1 que reconoce de forma específica epítomos presentes en el mixosporidio patógeno del rodaballo *Enteromyxum*

*scophthalmi*, producido por el hibridoma con número de depósito DSM ACC3197, en adelante anticuerpo de la invención.

5 El hibridoma DSM ACC3197 ha sido depositado el 04-04-2013 en la autoridad internacional de depósito *Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*, con dirección en *Inhoffenstr. 7 B, 38124 Braunschweig*, Alemania, por la Universidad de Vigo, con dirección en Campus Universitario 36310 Vigo, Pontevedra, España.

10 El hibridoma ha sido identificado por el depositante mediante la referencia P-VI E1 y recibió el número de depósito DSM ACC3197 por la autoridad internacional de depósito.

15 El hibridoma DSM ACC3197, productor del anticuerpo monoclonal de ratón VIE1, se ha generado empleando ratones BALB/c inmunizados con formas infectivas del parásito *E. scophthalmi*.

20 Como es sabido en el estado de la técnica, los hibridomas secretan, de forma continua e ilimitada, anticuerpos monoclonales específicos (mAbs) con actividad biológica conocida y especificidad constante. La aplicación de estos mAbs puede permitir un diagnóstico rápido por procedimientos metodológicamente sencillos, como la inmunofluorescencia directa o la inmunocromatografía. Los anticuerpos monoclonales cuentan además con una ventaja con respecto a las técnicas moleculares, puesto que pueden ser aplicados directamente a las muestras, sin requerir una extracción previa del ADN.

25 El anticuerpo monoclonal VIE1 reconoce, de forma específica, epítomos presentes en las diferentes fases de desarrollo del mixosporidio *E. scophthalmi* en el rodaballo. Por tanto, VIE1 reconoce las esporas de *E. scophthalmi* y también detecta a este parásito en otras fases iniciales de su desarrollo en el rodaballo (formas/estadios plasmodiales iniciales), permitiendo realizar un diagnóstico temprano de la enfermedad, a diferencia de otros procedimientos diagnósticos del estado de la técnica.

30 En segundo lugar, VIE1 no reconoce a otros mixosporidios de peces como *Myxidium* sp., *Ceratomyxa* sp., *Kudoa* sp. y *Şinuolinea scophthalmi*. Consecuentemente, el mAb no presenta reactividad cruzada.

Otra realización de la invención es el anticuerpo de la invención unido a una molécula marcadora. De forma particular, dicha molécula marcadora es isotiocianato de fluoresceína o peroxidasa.

5 Otra realización de la invención es un procedimiento de diagnóstico de la enteromixosis del rodaballo producida por *Enteromyxum scophthalmi*, que comprende:

(a) añadir el anticuerpo monoclonal VIE1 producido por el hibridoma con número de depósito DSM ACC3197 a una muestra obtenida de un rodaballo y

10 (b) detectar la presencia de dicho anticuerpo en dicha muestra, donde la presencia de dicho anticuerpo indica que el rodaballo sufre enteromixosis, en adelante procedimiento de la invención.

Otra realización es el procedimiento de la invención, donde dicha muestra de rodaballo está seleccionada del grupo compuesto por raspado de intestino, ciegos pilóricos y fluido  
15 intestinal.

Otra realización es el procedimiento de la invención, donde dicho anticuerpo se detecta utilizando una técnica seleccionada del grupo compuesto por inmunofluorescencia directa, inmunofluorescencia indirecta, inmunocromatografía, ELISA, *Western Blot* y *microarrays*.

20

Otra realización es un kit de diagnóstico de la enteromixosis del rodaballo producida por *Enteromyxum scophthalmi*, que comprende el anticuerpo monoclonal VIE1 producido por el hibridoma con número de depósito DSM ACC3197.

## 25 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Curvas de titulación del mAb VIE1 por ELISA. (cuadrado) mAb VIE1 sin acoplar; (círculo) mAb VIE1 acoplado a peroxidasa y (asterisco) mAb VIE1 acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC, *Sigma-Aldrich*). En ordenadas se representan los valores de  
30 densidad óptica (DO) y en abscisas la dilución.

Figura 2. Estudio de la reactividad mediante ELISA del mAb VIE1 frente a antígenos de otros mixosporidios de peces.

Figura 3. Reconocimiento mediante inmunofluorescencia directa con el mAb VE1 acoplado a isotiocianato de fluoresceína de los plasmodios (A) y las esporas (C) de *E. scophthalmi*. En B y D observación de las formas de *E. scophthalmi* en contraste de fases.

5 Figura 4. Gráfica que ilustra la especificidad del método para detectar antígenos de *E. scophthalmi* en muestras de intestino de rodaballo basado en un test ELISA-sandwich. Las muestras positivas fueron confirmadas por microscopía óptica. Se tomó como valor del punto de corte una DO de tres veces la desviación estándar.

## 10 MODOS DE REALIZACIÓN PREFERENTE

### Ejemplo 1. Inmunización de los ratones

15 Mediante un análisis por microscopía se detectaron rodaballos infectados de los que se recogió fluido intestinal en tampón fosfato salino (PBS: 0,15 M NaCl, 0,015M tampón fosfato sódico, pH 7,4), que se homogeneizó por sonicación en frío y posterior centrifugación a 16.000 g durante 5 minutos (min), preparándose un extracto soluble del parásito que contenía una concentración proteica de 0,625 mg/ml, con el que fueron inmunizados los ratones.

20

En la obtención de anticuerpos monoclonales, tanto el protocolo de inmunización como la especie animal empleada como donante de linfocitos son dos factores importantes para conseguir fusiones celulares efectivas. Asimismo, el número y la frecuencia de las inmunizaciones, la cantidad de antígeno, la vía de inmunización y el tipo de adyuvante 25 empleados, son factores a tener en cuenta en la inmunización de los animales.

30

Para la inmunización empleamos ratones de la estirpe BALB/c, por presentar una elevada histocompatibilidad con la línea de mieloma X63-Ag8.653 ya que deriva de la misma cepa animal, lo que favorece la estabilidad de los híbridos obtenidos en las fusiones celulares.

35

La inmunización se hizo de acuerdo al siguiente protocolo: dos ratones hembra (de 6 semanas de edad) se inmunizaron, por vía subcutánea, con una dosis de 200 µg de antígeno/ratón emulsionado (1:1) en Adyuvante Completo de Freund (*Sigma-Aldrich*). A los 28 días los ratones fueron reinmunizados por vía intraperitoneal con la misma dosis de antígeno sin adyuvante. Finalmente, 4 días antes de la fusión, a los ratones se les inyectó,

por vía intravenosa, una dosis de recuerdo del antígeno (200 µg/ratón) para estimular las células esplénicas.

5 Para poder garantizar una correcta inmunización y una buena producción de anticuerpos frente al antígeno inoculado, antes de cada inmunización se obtenían sueros policlonales mediante la extracción de sangre por punción de la vena submaxilar (0,2 ml de sangre por ratón). Los sueros policlonales obtenidos se titularon mediante ELISA indirecto para estudiar la respuesta humoral de cada ratón y conocer el nivel de anticuerpos producidos.

#### 10 Ejemplo 2. Obtención del hibridoma DSM ACC3197 y del anticuerpo monoclonal VIE1

Para la producción del hibridoma se utilizó el método *ClonaCell®-HY Hybridoma Cloning Kit* (Stem Cell Technologies, Inc., Vancouver, British Columbia, Canadá) que es una formulación a base de metilcelulosa que contiene factores de crecimiento y los suplementos  
15 de medios de cultivo optimizados para apoyar la selección y el crecimiento de clones de hibridomas. El método *ClonaCell®-HY Hybridoma Cloning Kit* está diseñado para seleccionar y clonar hibridomas inmediatamente después de la fusión, haciéndose de manera simultánea y en una sola etapa, tanto el crecimiento en un medio selectivo de hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT) como la clonación de los hibridomas, lo que se  
20 traduce en un ahorro de tiempo y se minimiza la contaminación.

#### Obtención de los esplenocitos

Tras el sangrado y muerte por dislocación cervical de los ratones inmunizados, se extrajeron los bazo y se disgregaron para la obtención de los esplenocitos. Los esplenocitos se  
25 lavaron en Medio B *ClonaCell®-HY* centrifugándose tres veces a 400 g, durante 10 min a temperatura ambiente. Tras el lavado final, las células se resuspendieron en medio B.

#### Células de mieloma

Las células de mieloma X63-Ag8.653 fueron cultivadas en Medio A *ClonaCell®-HY* durante  
30 una semana antes de la fusión, posteriormente se recogieron por centrifugación a 300 g durante 10 min a temperatura ambiente, lavándose 3 veces en medio B, y resuspendiendo el sedimento celular en medio B.

Para la fusión, selección y clonaje se ha seguido el Método B descrito en el manual de la  
35 técnica *ClonaCell® HY* (Stemcell Technologies, 2009).

### Fusión

Volúmenes conteniendo  $2 \times 10^7$  células de mieloma y  $1 \times 10^8$  esplenocitos viables se mezclaron y centrifugaron durante 10 min a 400 g a temperatura ambiente. El sedimento celular fue disgregado golpeando suavemente el fondo del tubo, y se le añadieron gota a  
5 gota 0,5 ml de solución de polietilenglicol *ClonaCell®-HY-PEG*. La mezcla se centrifugó durante 3 min a 133 g a temperatura ambiente y tras aspirar todo el polietilenglicol se añadieron, primero 5 ml de medio B y posteriormente 5 ml de Medio C *ClonaCell®-HY*.

### Selección y clonación

10 Después de incubar 24 horas a 37 °C en 5% de CO<sub>2</sub>, la suspensión celular fusionada se transfirió a un tubo cónico y se centrifugó durante 10 min a 400 g a temperatura ambiente. Las células se resuspendieron en medio C hasta un volumen total de 10 ml, que se mezcló con 90 ml de Medio D *ClonaCell®-HY*, repartiéndose esta mezcla en placas de Petri que se incubaron a 37 °C en 5% de CO<sub>2</sub>.

15

Transcurridos 10 días se examinaron las placas. Las colonias crecidas se pipetearon y se resuspendieron individualmente en placas de cultivo de 96 pocillos con Medio E *ClonaCell®-HY*, incubándose las placas a 37 °C en 5% de CO<sub>2</sub>.

20 Como método de selección de hibridomas productores de anticuerpos específicos, se utilizó un ELISA indirecto, enfrentando los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas al antígeno soluble, utilizando como control un homogeneizado procedente de contenido intestinal de rodaballos no parasitados. Una vez seleccionados los hibridomas secretores de inmunoglobulinas que reconocen específicamente antígenos de *E. scophthalmi*, se les fue  
25 sustituyendo el medio E por medio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, *Sigma-Aldrich*) suplementado con 10% suero fetal bovino (*Sigma-Aldrich*).

Mediante esta técnica se seleccionó el hibridoma productor del mAb VIE1.

30 Empleando un *Iso Quick™ Strips* (*Sigma-Aldrich*) se realizó la determinación del isotipo de las inmunoglobulinas secretadas por el mAb VIE1 revelando que se corresponden con el isotipo IgG3/k.

### Amplificación

35 La producción a pequeña escala de los anticuerpos se efectuó inoculando los hibridomas positivos correspondientes en la cavidad peritoneal de ratones hembras BALB/c,

previamente estimulados con pristano (2,6,10,14-tetramethylpentadecane, *Sigma-Aldrich*) y haciéndolos crecer como un tumor mielomatoso obteniéndose los anticuerpos en forma de líquido ascítico.

5 Los procedimientos se realizaron siguiendo las normas establecidas en el Real Decreto 233/1988 del 14 de Marzo sobre protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos que transcribe la Directiva del Consejo 86/609 CEE y han sido evaluados y aprobados por el Comité Ético de Bienestar Animal (CEBA) de la Universidad de Vigo.

10

Ejemplo 3. Detección del anticuerpo por inmunofluorescencia (IF) en muestras de rodaballo

La IF se realizó sobre extensiones de raspados de intestinos de rodaballos parasitados, secadas al aire y fijadas con acetona fría.

15

Los frotis se incubaron con el mAb VIE1 al que previamente se le había acoplado FITC. La incubación se realizó con una dilución 1:1000 del mAb, durante 30 min a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Tras tres lavados de 5 min con PBS, los frotis se montaron en glicerol-PBS (1:1) y se examinaron en un microscopio de fluorescencia, lo que permitió

20 comprobar que mAb VIE1 reconocía tanto antígenos o epítomos presentes en la espora de *E. scophthalmi* como en los plasmodios, estadios de desarrollo previos a la formación de la misma.

20

Ejemplo 4. Reconocimiento por inmunohistoquímica (IH)

25

La IH se realizó sobre cortes (4 µm) de intestino de rodaballo a los que se les había diagnosticado la enfermedad. Las secciones se incubaron con una dilución 1:500 del mAb VIE1, acoplado a peroxidasa, durante 60 min a temperatura ambiente (t.a.) y en cámara húmeda. Tras posteriores lavados de 5 min con PBS, se reveló con diaminobencidina

30 (*Sigma-Aldrich*). Una vez parada la reacción los cortes se montaron en glicerol-PBS (1:1) y se examinaron al microscopio, lo que nos permitió corroborar los resultados obtenidos en la IF.

30

Ejemplo 5. Ensayos en planta

35

Las pruebas sobre las muestras previamente diagnosticadas por microscopía, se contrastaron mediante un ensayo ELISA-sandwich, en el que se puso en contacto una muestra procedente de raspado intestinal de los rodaballos a analizar con el mAb VIE1 fijado a un soporte sólido que reconoce antígenos de *E. scophthalmi*, añadiendo posteriormente el mAb VIE1 marcado con peroxidasa que reconoce antígenos de *E. scophthalmi* y revelando la reacción mediante la adición de ortofenilendiamina (*Sigma-Aldrich*). Los resultados obtenidos muestran una total concordancia con los datos de parasitación de los que se disponía.

Una vez recopiladas todas las muestras que han sido determinadas como positivas o negativas claras mediante microscopía, se calculó la sensibilidad y especificidad del test ELISA-sandwich para el diagnóstico de la enteromixosis del rodaballo (Tabla 1), siendo un método habitual para las estimaciones de estos valores analizar unas muestras de referencia, y tabular de forma cruzada los resultados categóricos de la prueba en una tabla de 2 x 2.

Tabla 1. Estimación de la sensibilidad y especificidad diagnóstica del test ELISA-sandwich calculada a partir de muestras analizadas de rodaballos con un estado de infección conocido (determinado por microscopía), muestras de poblaciones infectadas y muestras de poblaciones no infectadas.

		Animales con estado de infección conocido	
		Infectados (n= 28)	No infectados (n= 86)
Resultado del test ELISA-sandwich	Positivo	28	0
	Negativo	0	86

PV= positivos verdaderos; PF= positivos falsos; NF= negativos falsos; NV= negativos verdaderos.

Sensibilidad del diagnóstico test ELISA-sandwich:  $PV/(PV+NF)= 28/(28+0)= 100\%$

Especificidad del diagnóstico test ELISA-sandwich:  $NV/(NV+PF)= 86/(86+0)= 100\%$

## REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo monoclonal VIE1 que reconoce de forma específica epítomos presentes en el mixosporidio patógeno del rodaballo *Enteromyxum scophthalmi*, producido por el  
5 hibridoma con número de depósito DSM ACC3197.
2. Anticuerpo según la reivindicación 1, caracterizado por que dicho anticuerpo está unido a una molécula marcadora.
3. Anticuerpo según la reivindicación 2, caracterizado por que dicha molécula marcadora es isotiocianato de fluoresceína o peroxidasa.
- 10 4. Procedimiento de diagnóstico de la enteromixosis del rodaballo producida por *Enteromyxum scophthalmi*, que comprende:  
(a) añadir el anticuerpo monoclonal VIE1 producido por el hibridoma con número de depósito DSM ACC3197 a una muestra obtenida de un rodaballo y  
(b) detectar la presencia de dicho anticuerpo en dicha muestra, donde la presencia de  
15 dicho anticuerpo indica que el rodaballo sufre enteromixosis.
5. Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado por que dicha muestra de rodaballo está seleccionada del grupo compuesto por raspado de intestino, ciegos pilóricos y fluido intestinal.
- 20 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 4 ó 5, caracterizado por que dicho anticuerpo se detecta utilizando una técnica seleccionada del grupo compuesto por inmunofluorescencia directa, inmunofluorescencia indirecta, inmunocromatografía, ELISA, *Western Blot* y microarrays.
7. Un kit de diagnóstico de la enteromixosis del rodaballo producida por *Enteromyxum scophthalmi*, que comprende el anticuerpo monoclonal VIE1 producido por el hibridoma  
25 con número de depósito DSM ACC3197.

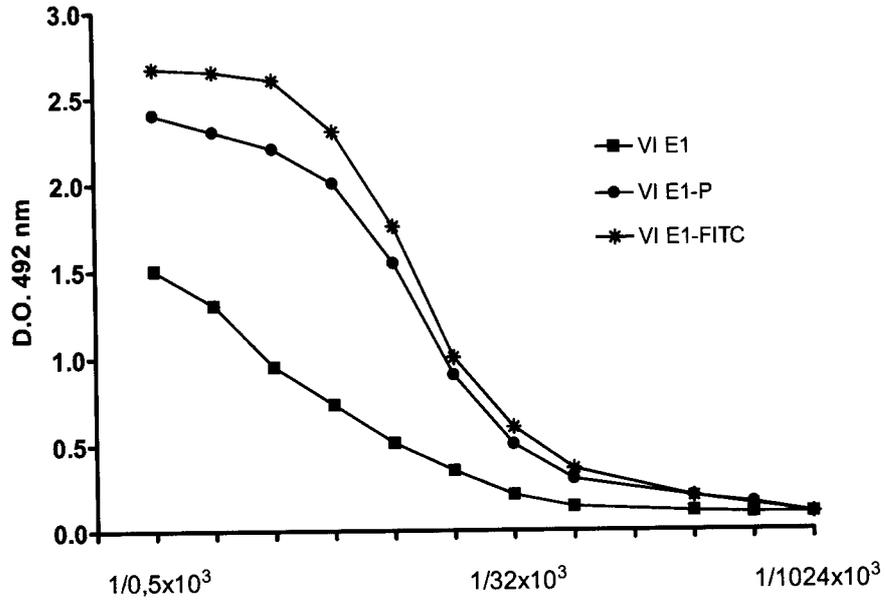


Fig. 1

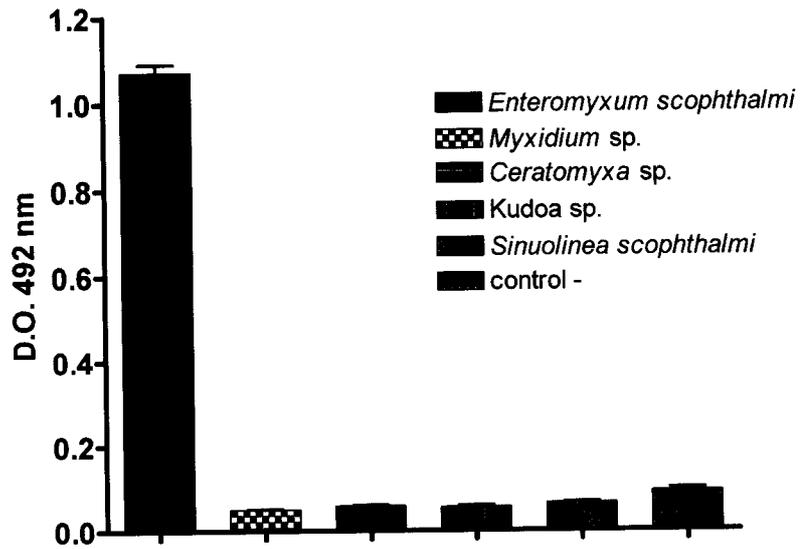


Fig. 2

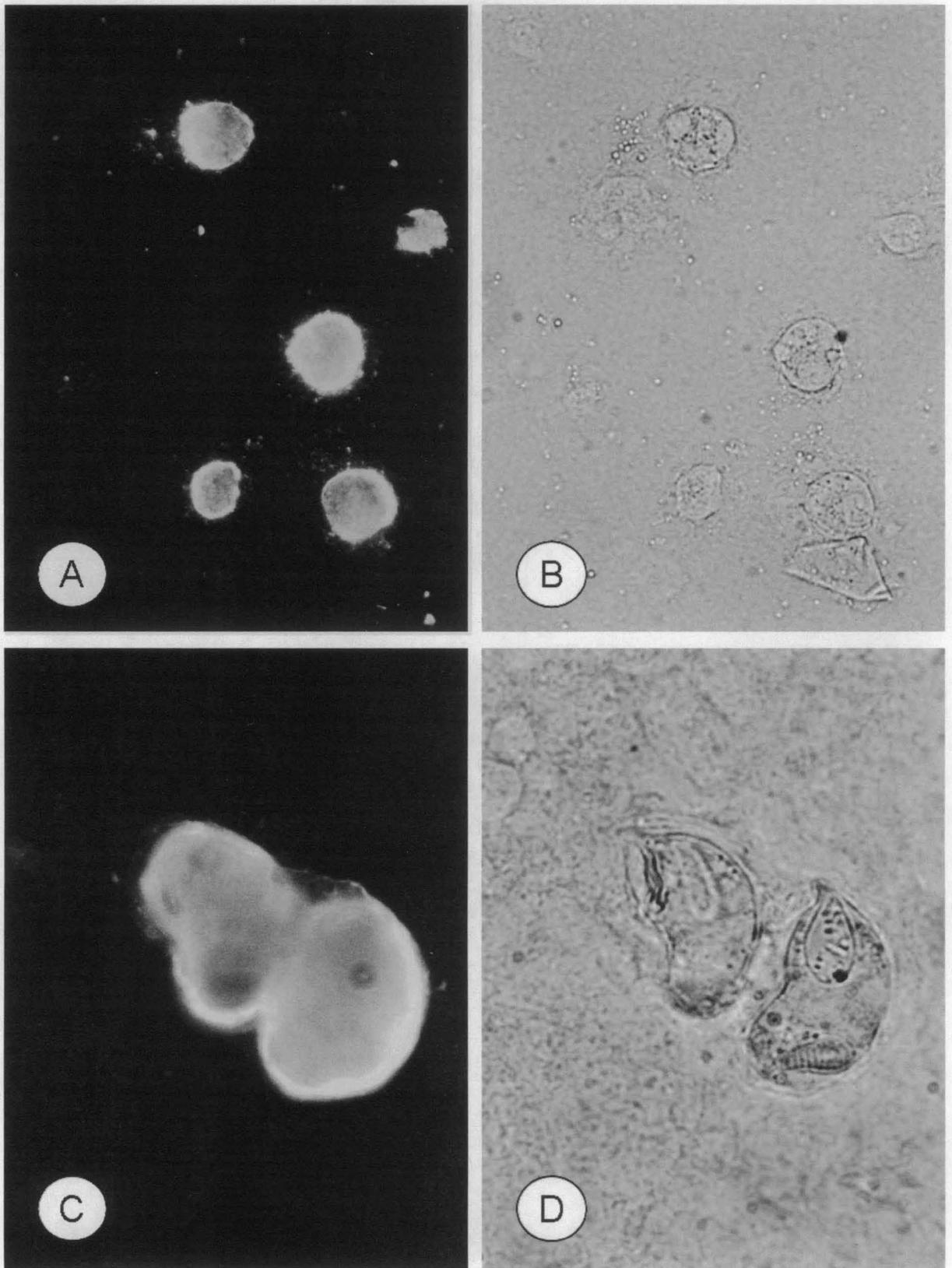


Fig. 3

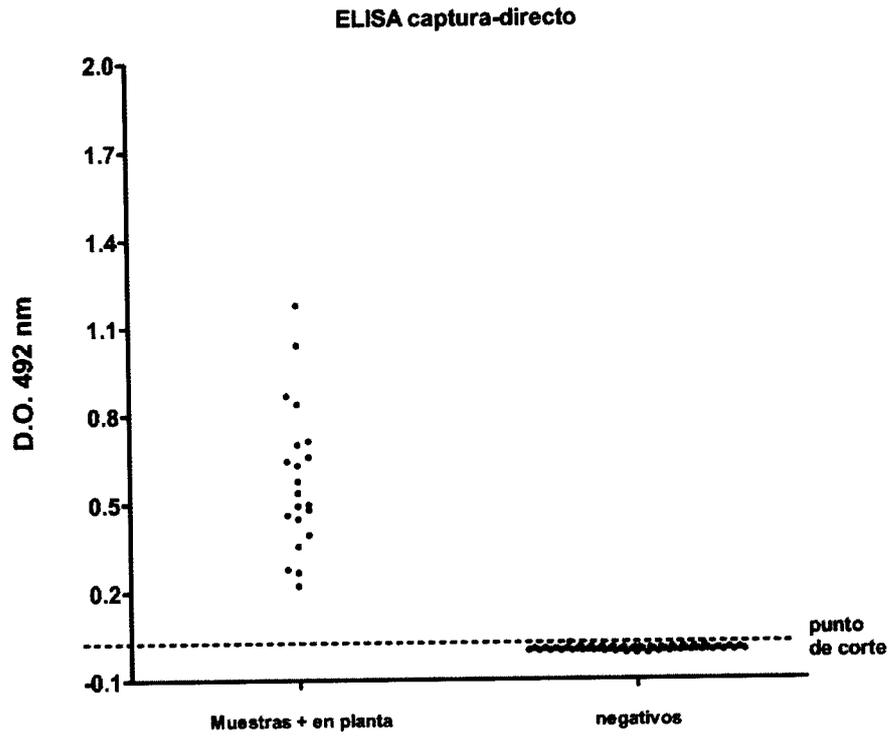


Fig 4



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA

- ②① N.º solicitud: 201301179  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 20.12.2013  
③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C07K16/18** (2006.01)  
**G01N33/569** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ESTENSORO, I et al. Immunohistochemical characterization of polyclonal antibodies against <i>Enteromyxum leei</i> and <i>Enteromyxum scophthalmi</i> (Myxozoa: Myxosporea), intestinal parasites of fish. <i>Journal of Fish Diseases</i> . 20.08.2013 [on line], Vol. 37, páginas 785-796, <doi:10.1111/jfd.12168>, especialmente resumen; páginas 789, 791-793; figura 3.	1-8
A	SITJÀ-BOBADILLA, A et al. Development of immunohistochemistry and enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of circulating antibodies against <i>Enteromyxum scophthalmi</i> (Myxozoa) in turbot ( <i>Scophthalmus maximus</i> L.). <i>Fish and Shellfish Immunology</i> 17. 2004, Vol. 17, páginas 335-345, todo el documento.	1-8

#### 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  
17.12.2014

Examinador  
J. Collado Martínez

Página  
1/5

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

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, TXTUS, NPL, XPESP, BIOSIS, MEDLINE, GOOGLE ACADÉMICO

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 17.12.2014

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-7	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-7	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<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	ESTENSORO, I et al. Journal of Fish Diseases. 20.08.2013 [online], Vol. 37, páginas 785-796, <doi:10.1111/jfd.12168>	20.08.2013
D02	SITJA-BOBADILLA, A et al. Fish and Shellfish Immunology 17. 2004, Vol. 17, páginas 335-345	2004

**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 tiene por objeto un anticuerpo monoclonal (VIE1) dirigido contra *Enteromyxum scophthalmi*, agente causante de la enteromixosis del rodaballo. Se refiere también a un procedimiento para el diagnóstico *in vitro* de la enteromixosis empleando el anticuerpo de la invención y a un kit de diagnóstico de la enfermedad que comprende el anticuerpo.

El documento D01 divulga un anticuerpo policlonal contra *E. scophthalmi* útil para el diagnóstico de la enteromixosis del rodaballo (ver resumen; páginas 789, 791-793; figura 3).

El documento D02 divulga un estudio de la producción de anticuerpos en el rodaballo cuando éste es infectado por *E. scophthalmi* (ver todo el documento).

**1.- NOVEDAD (Art. 6.1, LP 11/1986).****Reivindicaciones 1-7**

El documento del estado de la técnica más cercano al objeto de la reivindicación independiente 1 es D01. Dicho documento divulga un anticuerpo policlonal (ap-Ab-Escoph) que reconoce de forma específica epítopos de *E. Scophthalmi* (D01: resumen; página 789; figura 3).

De lo anterior se desprende que D01 no divulga de forma idéntica el objeto de la reivindicación 1, ya que el anticuerpo VIE1 es un anticuerpo monoclonal que, en particular, es producido por el hibridoma con número de depósito DSM ACC3197.

En conclusión, el objeto de la reivindicación 1 y, como consecuencia, el de las reivindicaciones 2 a 7 satisface el requisito de novedad en los términos del artículo 6.1 de la LP 11/1986.

**2.- ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1, LP 11/1986).****Reivindicaciones 1-7**

Como ya se ha indicado, la diferencia entre D01 y el objeto de la reivindicación 1 de la presente solicitud estriba en que VIE1 constituye un anticuerpo monoclonal en contraste con el origen policlonal del anticuerpo ap-Ab-Escoph de D01. En ninguno de los dos casos se ha definido el antígeno particular contra el que van dirigidos los anticuerpos.

En relación con el hecho de que VIE1 sea un anticuerpo monoclonal producido por un hibridoma, se considera que esta característica no confiere por sí sola actividad inventiva a VIE1, dado que para el experto en la materia resultaría rutinario llegar a la producción mediante un hibridoma de un anticuerpo monoclonal dirigido contra *E. scophthalmi*, una vez conocida la capacidad antigénica que el parásito presenta sobre el hospedador y que queda patente en los documentos D01 y D02. Por ello, la evaluación de la actividad inventiva de VIE1 ha de basarse en las propiedades concretas de dicho anticuerpo en comparación con las propiedades de ap-Ab-Escoph.

El problema técnico que viene a resolver la presente solicitud es la falta de un anticuerpo que permita el inmunodiagnóstico de la enteromixosis del rodaballo producida por *E. scophthalmi* de una forma sencilla, rápida y específica, permitiendo la detección de diferentes fases de desarrollo del parásito, incluyendo las esporas. En este sentido, el anticuerpo ap-Ab-Escoph de D01 tiene como dianas distintos estadios proliferativos y esporogónicos del parásito (D01: página 789; figura 3). Además, ap-Ab-Escoph tiene una alta especificidad por los antígenos de *E. scophthalmi*, no presentando reacción cruzada con otros mixosporidios ni con los tejidos del hospedador (D01: página 789, 792-793). Sin embargo, los autores de D01 indican expresamente que el anticuerpo ap-Ab-Escoph se une de forma débil e inconsistente a las esporas de *E. scophthalmi* (D01: páginas 789, 791).

Teniendo en cuenta lo inmediatamente anterior, el experto en la materia enfrentado al problema de la inmunodetección fiable de las distintas formas o estadios de *E. scophthalmi*, incluidas las esporas, no encontraría obvio llegar a un solo anticuerpo con las mismas características de VIE1 a partir de lo divulgado en D01 y D02, donde también se indica que el marcaje con anticuerpos de las esporas es de menos intensidad y presenta variaciones según el estado de maduración de la spora (D02: página 339). Por ello, se considera que el anticuerpo objeto de la reivindicación independiente 1 cumple con el requisito de actividad inventiva establecido en el artículo 8.1 de la LP 11/1986 y confiere actividad inventiva a los procedimientos y kit objeto de las reivindicaciones 2 a 7.