

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 571 302**

21 Número de solicitud: 201400942

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

**24.11.2014**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**24.05.2016**

Fecha de la concesión:

**14.11.2016**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**21.11.2016**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**PATIÑO ÁLVAREZ, Lucía Cristina;  
FERNANDEZ BRIERA, Almudena y  
GIL MARTÍN, Emilio**

54 Título: **Procedimiento para la valoración secuencial por western-blot en una misma muestra de la proteína NCAM y de su cola de ácido polisiálico (PSA)**

57 Resumen:

La proteína NCAM presenta la peculiaridad de estar unida por covalencia a una cola de ácido polisiálico, cuya presencia y grado de elongación son vitales en su biología funcional. Los estudios sobre la expresión de esta proteína deben acompañarse, por tanto, del análisis de su grado de polisialilación. El procedimiento de invención consiste en la valoración inmunoquímica sobre una misma muestra biológica de la forma polisialilada de la proteína NCAM, PSA-NCAM, concatenando sendas etapas de western-blot (para la inmunodetección seriada por quimioluminiscencia de NCAM y PSA, o viceversa) separadas por una fase de borrado (stripping). El procedimiento se completa con una segunda fase de borrado y la realización del preceptivo control de carga proteica. Este método consigue el ahorro de muestra biológica y además preserva el mantenimiento de similares condiciones de ensayo durante el análisis de ambas moléculas.

ES 2 571 302 B2

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la valoración secuencial por *western-blot* en una misma muestra de la proteína NCAM y de su cola de ácido polisialico (PSA).

5

### Sector de la Técnica

El procedimiento objeto de invención se inscribe en el ámbito de la biología molecular, con utilidad tanto en la investigación básica de la proteína PSA-NCAM como en  
10 potenciales estudios de investigación aplicada (clínica) que incluyan su valoración.

### Estado de la técnica: Antecedentes

*Perfil estructural de la NCAM.* La Molécula de Adhesión de Células Neuronales (conocida por su acrónimo internacional NCAM o CD56) fue la primera proteína de adhesión celular perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF) en ser caracterizada (Rutishauser *et al.*, 1976, Nature Rev Neurosci 9:26-35; Thiery *et al.*, 1977, J Biol Chem 252:6841-6845). Codificada por un único gen estructural (en posición 11q23 en el genoma humano; Nguyen *et al.*, 1986, J Cell Biol 102:711-715), cuya transcripción está  
15 bajo el control de un característico promotor doméstico (Barton *et al.*, 1990, Biochem J 268:161-168), sin embargo, mediante procesos de *alternative splicing* da lugar a una multiplicidad de variantes estructurales de la proteína (Reyes *et al.*, 1991, Mol Cell Biol 11:1654-1661). De entre todas estas variantes o isoformas de la NCAM destacan 3, conocidas como *isoformas principales*, que en los mamíferos se distinguen por sus  
20 masas moleculares aparentes; 120 kDa, 140 kDa y 180 kDa (Barbas *et al.*, 1988, EMBO J 7:625-632). Las dos isoformas mayores, al igual que el resto de integrantes de la IgSF, son proteínas transmembrana de tipo I, constituidas por un dominio citoplasmático e-terminal pequeño (140 kDa) o grande (180 kDa), un dominio transmembrana (TM) de paso único y un gran dominio extracelular (ectodominio) con el extremo N-terminal. La  
25 isoforma menor, por su parte, carece de dominio TM y en su lugar presenta un grupo glicosilfosfatidilinositol para el anclaje a la membrana.

Como suele ser también habitual en la IgSF, el ectodominio de la NCAM está dotado de una estructura modular (Shapiro *et al.*, 2007, Annu Rev Neurosci 30:451-474) formada  
35 por la repetición en tándem de cinco motivos de plegamiento de tipo inmunoglobulina (IgI-IgV) en la porción distal (N-terminal) y dos de fibronectina de tipo III (FNI-II), que proporcionan las conexiones con la membrana, en la región proximal.

A esta riqueza estructural de la NCAM lograda por procesos de regulación post-transcripcional se le suma la lograda mediante las modificaciones post-traduccionales (Walmod *et al.*, 2004, Annu Rev Neurosci 30:451-474), entre las que se encuentran la N-y O-glicosilación, la sulfatación, fosforilación, palmitoilación y, muy especialmente, la polisialilación. Esta última es una modalidad de N-glicosilación consistente en la transferencia de residuos de ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico),  
40 unidos mediante enlaces  $\alpha(2,8)$ , a dos sitios específicos de N-glicosilación (en IgV) con una fuerte selectividad regional (van der Ohe *et al.*, 2002, Glycobiology 12:47-63). El resultado es la incorporación a la NCAM de un homopolímero lineal de  $\approx 50$ -200 unidades, o más, conocido como ácido polisialico o PSA (Inoue & Ionue, 2001, Biochimie 83:605-613; Nakata & Troy, 2005, J Biol Chem 280:38305-38316).

50

La polisialilación destaca del resto de modificaciones post-traduccionales *i)* por el gran impacto que tiene sobre la estructura y actividad biológica de la proteína y *ii)* por su carácter atípico entre los mamíferos, ya que no más de 6 proteínas la experimentan (Rothbard *et al.*, 1982, J Biol Chem 257:11064-11069; Finne *et al.*, 1983, Biochem Biophys Res Commun 112:482-487; Mendiratta *et al.*, 2005, J Biol Chem 280:32340-32348), entre ellas las dos enzimas polisialiltransferasas responsables de la síntesis del PSA, ST8Siall y IV (Muhlenhoff *et al.*, 2001, J Biol Chem 276:34066-34073).

*Perfil funcional de la NCAM.* Como proteína de adhesión, su función es mediar en el reconocimiento de la superficie celular estableciendo contactos homofílicos independientes del Ca<sup>2+</sup> (Edelman, 1986, Annu Rev Cell Dev Biol 2:81-116) con otras moléculas de NCAM de la misma célula (uniones en *cis*) o de una célula distinta (uniones en *trans*) (Rutishauser *et al.*, 1982, Proc Natl Acad Sci USA 79:685-689). Ejerciendo dicha misión aparece en las células embrionarias tempranas, entre las cuales facilita la interacción y agregación y de este modo contribuye a la morfogénesis de los tejidos (Cunningham *et al.*, 1987, Science 236:799-806). Tras el desarrollo se expresa asimismo en diversos tejidos diferenciados y continúa ejerciendo un papel central en, por ejemplo, el establecimiento de contactos entre las neuronas o en las uniones neuromusculares (Thiery *et al.*, 1977, J Biol Chem 252:6841-6845).

No obstante lo anterior, el intenso trabajo desarrollado a lo largo de los últimos años ha revelado que la NCAM, aparte de establecer contactos con otras moléculas análogas de la misma membrana (*cis*) o de la membrana de una célula vecina (*trans*), es capaz también de interactuar mediante contactos heterofílicos con una variedad creciente de otras moléculas, tanto intracelulares como extracelulares. Así, a través de su ectodominio NCAM establece contactos, entre otros, con integrantes de su misma familia estructural (L1, PrP o TAG-1), componentes de la matriz extracelular (proteoglicanos, colágeno, etc) o receptores de factores de crecimiento (FGFR, GDNF) (Nielsen *et al.*, 2010, Adv Exp Med Biol 663:23-53). Por otro lado, a través del dominio citoplasmático se han caracterizado contactos con al menos cinco ligandos proteicos intracelulares (Büttner & Horstkorte, 2010, Adv Exp Med Biol 663:55-66). De esta forma se ha pasado de conceptuar el papel biológico de la NCAM como el de una sencilla proteína de adhesión celular a considerarla un versátil transductor de señales, participe en la mediación de una multiplicidad de procesos biológicos, entre los que cabe mencionar el crecimiento, mielinización y regeneración nerviosa, la plasticidad sináptica, la migración celular, el aprendizaje y la memoria o la propagación de ciertos tipos tumorales (Cavallaro & Christofori, 2001, Biochim Biophys Acta 1552:39-45; Schauer, 2009, Curr Opin Struct Biol 19:507-514).

#### 40 *Importancia de la polisialilación en la estructura y función de la NCAM*

La unión del PSA a la NCAM le acarrea profundos cambios estructurales. De un lado, aumenta la microheterogeneidad de las formas moleculares de la proteína - según el número y longitud de las cadenas de PSA que se le unan - y, de otro, la alta densidad de carga negativa aportada por los grupos carboxílicos del PSA conlleva una fuerte retención de agua e iones y el correspondiente aumento del radio hidrodinámico del dominio extracelular de la molécula (Hildebrandt *et al.*, 2010, Adv Exp Med Biol 663:95-109).

50 La polisialilación de la NCAM acarrea también singulares repercusiones sobre la función de la proteína. Las voluminosas cadenas de PSA actúan como espaciadores entre las

células, que debilitan los contactos homofílicos y heterofílicos de la NCAM (Kolkova, 2010, *Adv Exp Med Biol* 663:213-225) y, en consecuencia, interfieren dinámicamente tanto en su papel en la adhesión celular (Rutishauser & Landmesser, 1996, *Trends Neurosci* 19:422-427; Kiss & Rougon, 1997, *Curr Opin Neurobiol* 7:640-646; Bruses & Rutishauser, 2001, *Biochimie* 83:635-643; Rutishauser, 2008, *Nature Rev Neurosci* 9:26-35) como en la señalización mediada por ella (Rutishauser & Landmesser, 1996, *Trends Neurosci* 19:422-427). En este sentido lo más sugestivo es que la polisialilación parece provocar un cambio cualitativo en la actuación de la NCAM, promoviendo el abandono de su función como proteína de adhesión para pasar a desempeñar un papel activo en la señalización celular (Kiselyov *et al.*, 2005, *J Neurochem* 94:1169-1179). De aquí la importancia de mantener bajo un estricto control la homeostasis del PSA, que se trasluce en la estrecha regulación regional y temporal observada en los niveles de expresión de PSA-NCAM (Schauer, 2009, *Curr Opin Struct Biol* 19:507-514). Así, el pico de expresión de PSA durante los primeros momentos del desarrollo tendría por objeto reducir la interacción entre células, actuando como un "aislante" de las acciones prematuras o inadecuadas a las que podrían verse expuestas. Prosiguiendo el desarrollo ontogénico, sin embargo, la expresión de PSA-NCAM decae progresivamente hasta prácticamente desaparecer de los tejidos adultos, en los que prevalecería el potencial de la NCAM como estabilizador de los contactos célula-célula y mediador de señalización. No obstante, la polisialilación de la NCAM persiste en los tejidos de origen neuroectodérmico, especialmente en aquéllos que mantienen plasticidad neuronal, así como en tejidos no neurales, en los que el PSA actuaría como promotor de cambios en la posición, forma o estado de activación de ciertos tipos celulares.

Mención aparte merece el intrincado papel desempeñado por la NCAM y su grado de polisialilación en tejidos tumorales de diverso origen, aspecto intensamente estudiado los últimos años y aún pendiente de dilucidarse por completo (Zecchini & Cavallaro, 2010, *Adv Exp Med Biol* 663:319-333). En este sentido, por ejemplo, es sabido que la expresión de NCAM por sí misma reduce la agresividad tumoral de algunos tipos de cáncer, mientras que en otros actúa como un factor facilitador de la progresión tumoral. En otros, por el contrario, la transformación maligna cursa con la transición de la isoforma más frecuente en los tejidos del adulto (120 kDa) a las embrionarias (140 y 180 kDa). Causa de todo ello es el gran espectro de funciones desempeñadas por esta proteína en la célula (también en la tumoral), que van desde el control de sus propiedades (anti)adhesivas hasta las de modulación del tráfico de información con su entorno. Para mayor complejidad, el papel asignado a la polisialilación de la NCAM resulta asimismo intrigante, pues mientras en algunos tipos tumorales reduce el crecimiento tumoral, en otros la propagación y agresividad corren parejas al grado de polisialilación de la proteína (Seifert *et al.*, 2012, *Arch Biochem Biophys* 524:56-63).

En base a las anteriores consideraciones, los trabajos que hemos realizado sobre la NCAM (Fernández-Briera *et al.*, 2010, *Oncology* 78:196-204) han contemplado siempre la valoración en paralelo de su estado de polisialilación, cautela que nos ha permitido advertir del riesgo de malinterpretar la biología funcional de la proteína.

El procedimiento objeto de invención, en este sentido, es una estrategia diseñada para facilitar la valoración conjunta, en óptimas condiciones de determinación y al menor coste de la proteína NCAM y de su estado de polisialilación.

### Explicación de la invención

5 La presente invención tiene por objeto la mejora de los análisis de expresión de PSA-NCAM en muestras biológicas disponibles en pequeñas cantidades o de acceso restringido (como es el caso de las humanas, especialmente si son de origen hospitalario).

10 El procedimiento a seguir consiste en la valoración inmunoquímica con anticuerpos monoclonales específicos sobre la misma muestra biológica, en sendos ensayos consecutivos de *western-blot* acoplados a detección por quimioluminiscencia, del nivel de expresión de la proteína NCAM y de su cola de ácido polisialílico, o viceversa, seguidos del preceptivo control de carga.

15 Este método proporciona un valor añadido en términos de eficiencia a las modalidades habituales de análisis inmunoquímico independiente de NCAM y PSA, ya que comporta la disminución a la mitad del consumo de muestra por ensayo (también del resto de consumibles), ahorra tiempo, limita la magnitud del error experimental al preservar similares condiciones fisicoquímicas y de manipulación durante la valoración de ambas moléculas y el mismo análisis permite conocer la expresión de la proteína y su estado de  
20 polisialilación, una información vital sobre su estructura molecular y clave para desentrañar su desempeño funcional.

25 Entre la extensa literatura concerniente al estudio de la expresión, estructura y función de la NCAM, abundan los estudios que omiten el análisis en paralelo de su estado de polisialilación. Sin embargo, la trascendencia de este último sobre la estructura y funcionalidad de la molécula está firmemente respaldada desde que en 1983 se asociara por vez primera la polisialilación con la NCAM de cerebro de ratón (Finne *et al.*, 1983, Biochem Biophys Res Commun 112:482-487). Tal es el caso que uno de los aspectos más intrigantes de la NCAM es la aparente dualidad de biología funcional entre su forma  
30 polisialilada y no polisialilada, ya que el repertorio de funciones desplegadas por la proteína depende de la presencia del PSA. Así las cosas, cumple conocer el estado de polisialilación de la NCAM en cualquier estudio que verse sobre el papel biológico de esta proteína.

35 La invención se refiere al diseño de un procedimiento para realizar la valoración conjunta de la expresión de NCAM y PSA sobre una misma muestra biológica. El procedimiento consiste en la realización secuencial sobre esta muestra única de dos ensayos inmunoquímicos con los respectivos anticuerpos monoclonales específicos, mediante sendos *western-blots* acoplados a detección por quimioluminiscencia, uno para la  
40 proteína y otro para su cola de PSA, seguidos del preceptivo control de carga. Para ello, tras el ensayo de la primera de las moléculas analizadas se retira de la membrana su sistema de inmunodetección mediante un lavado químico de borrado (o *stripping*), que elimina las uniones reversibles de los anticuerpos y de sus sistemas de detección, quedando disponible la membrana de *blot* para iniciar el ensayo de la segunda molécula.  
45 Completado este último y repitiendo un nuevo ciclo de borrado, puede realizarse el control de carga proteica que debe acompañar todo análisis mediante *western-blot*.

50 La razón de valorar PSA-NCAM sobre una misma muestra es mejorar el rendimiento de los estudios sobre la biología molecular de esta proteína, especialmente cuando partan del uso de material selecto, como ocurre con el de origen humano por las restricciones de acceso que impone la legislación y/o por la habitualmente pequeña entidad de los

especímenes disponibles. La posibilidad, por tanto, de completar sobre un mismo material la valoración de la expresión de la NCAM y de su cola de PSA hace de esta invención una mejora cuantitativa y cualitativa de la alternativa habitual de estudiar separadamente la proteína y su grado de polisialilación. De un lado, disminuye a la mitad la necesidad de muestra biológica y abarata el ensayo al reducir en la misma medida el consumo de tiempo y de ciertos consumibles (tampones, membranas de *western-blot*, etc). De otro, mejora la calidad de los ensayos al preservar condiciones (físicoquímicas y de manipulación) más homogéneas durante la valoración de ambas moléculas, que disminuyen la probabilidad de posibles errores de medida y con ello la variabilidad de las determinaciones. Se implementa así la calidad y, al duplicar la información obtenible de un solo procedimiento analítico, también el rendimiento de los ensayos.

### Descripción de un modo de realización

Tratándose de la valoración de una macromolécula proteica, el material biológico debe mantenerse congelado o ultracongelado (-20°C o -80°C, respectivamente) desde su obtención hasta el momento del ensayo y a una temperatura dentro del intervalo de seguridad (0°-4°C) durante el transcurso de éste. En caso de que el material tenga estructura celular, deberá mantenerse bajo condiciones de inhibición de la actividad de las proteasas endógenas (mediante la adición de algún cóctel de inhibidores) desde la rotura de las células hasta obtener la preparación de muestra para el ensayo.

El procedimiento propuesto requiere el procesamiento del material de partida para la obtención de una preparación purificada o enriquecida en la proteína de interés, PSA-NCAM. Para ello es preciso homogeneizar el material biológico mediante una técnica ajustada a la naturaleza (tejido sólido, cultivo celular, etc), tamaño y propiedades mecánicas de éste, hasta obtener un extracto crudo libre de células. Es generalmente aconsejable mejorar las condiciones de detectabilidad de la proteína (sea cual fuere la fuente biológica de la que se parta) procediendo a una (pre)purificación de la NCAM mediante inmunoprecipitación o alguna estrategia convencional de purificación de proteínas. Con tal propósito se llevarán a cabo las centrifugaciones o separaciones pertinentes del extracto inicial para disponer de una preparación (pre)purificada o bien de una fracción enriquecida en membrana citoplasmática o en membranas celulares totales. Es admisible aplicar la presente invención a fluidos biológicos (suero, semen, líquido cefalorraquídeo, etc), para los cuales, en caso de que también resulte preciso elevar la concentración relativa del analito, deberá adoptarse tras su recogida alguna estrategia de prefraccionamiento de la muestra.

Una vez obtenida la fracción final o muestra para el ensayo, se le realizará la valoración del contenido en proteínas totales por medio de un ensayo *ad hoc*. La cantidad de proteína total por ensayo depende de la concentración relativa de PSA-NCAM en la fuente de partida, y deberá ser estipulada para cada aplicación concreta. En el caso poco favorable de tejidos diferenciados de origen no neural de adulto humano (como, por ejemplo, el tejido colorrectal sano y tumoral empleado para el diseño de esta invención), se ha precisado generalmente una cantidad en torno a los 30-60 microgramos.

Tras los pasos anteriores, se inicia el procedimiento con la separación de las proteínas de la muestra mediante una electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) en condiciones estándar (Laemli, 1970, Nature 227:680-685) y acto seguido la electrotransferencia húmeda de las proteínas separadas en el gel a una membrana PVDF (polifluoruro de vinilideno) o equivalente de *western-blot*.

Para continuar el protocolo formal deben conocerse con antelación las concentraciones óptimas de los anticuerpos monoclonales primarios contra ambas moléculas (NCAM y PSA), así como de los anticuerpos secundarios, de modo que el sándwich de cada inmunoensayo rinda resultados evaluables con el mínimo consumo de estos reactivos. A los valores óptimos de anticuerpo debe llegarse mediante sendas titulaciones previas. Una vez conocidos dichos valores, puede comenzarse con el primer inmunoensayo específico (resulta indiferente que se trate de NCAM o de PSA). Las condiciones de ejecución (medio de bloqueo, tiempo y temperatura de incubación de los anticuerpos primario y secundario, etc) y revelado por quimioluminiscencia (lavados, tiempo de exposición, etc) deberán ajustarse para cada tipo de muestra mediante ensayos de puesta a punto.

Una vez completada la documentación de la membrana revelada para el primer epitopo, se procede a su borrado o *stripping* mediante sendos lavados de 15 min a temperatura ambiente con una disolución ácida (pH 2.2) a base de glicina al 1% (p/v), SDS al 0.1% (v/v) y el detergente *Tween*<sup>TM</sup>-20 al 1% (v/v). Completado el borrado, se elimina la solución por medio de dos lavados iniciales de 10 min con PBS y otros dos posteriores de 5 min con TBST (TBS y *Tween*<sup>TM</sup>-20 al 1%, v/v). Esta composición de la solución de borrado se muestra eficaz en la eliminación de las uniones reversibles de los anticuerpos y, sin embargo, respetuosa con las proteínas de la muestra fijadas a la membrana. A continuación se bloquea de nuevo la membrana y se procede con el segundo sándwich de inmunodetección.

Los resultados de *western-blot* resultan homologables, y susceptibles de ser utilizados en comparaciones de niveles de expresión entre muestras o grupos de muestras, si *i)* incorporan controles de carga proteica en el gel y *ii)* contemplan la realización de controles negativos de tinción.

Los primeros pueden llevarse a cabo sobre la membrana de *blot* en uso realizándole, tras el revelado y documentación del segundo inmunoensayo, un nuevo borrado con solución ácida de glicina, en condiciones similares a las descritas. Una vez eliminado el complejo anticuerpo 1<sup>o</sup>-2<sup>o</sup>-sistema de detección, la membrana queda lista para el bloqueo e incubación con el anticuerpo específico contra la proteína de carga elegida y proceder a su revelado y documentación posterior.

Para la realización de los controles negativos puede operarse de modo similar a la valoración secuencial de NCAM y PSA, esto es, desarrollar el mismo protocolo formal pero substituyendo el anticuerpo monoclonal primario por solución de bloqueo.

Resulta imprescindible mantener húmeda la membrana en todo momento del proceso para obtener resultados satisfactorios. Es asimismo aconsejable someter finalmente la membrana a un proceso de tinción de proteínas por algún procedimiento convencional (1 min en presencia de una solución de azul brillante de Coomassie al 0.1%, p/v, metanol al 20%, v/v, y ácido acético al 10%, v/v, por ejemplo), con la doble finalidad de comprobar el respeto del *stripping* por el bandeado proteico de la membrana y utilizar este último como comprobante de la eficiencia de la transferencia y como control de carga de proteína total, opción más representativa del conjunto de proteínas de la muestra (Aidridge *et al.*, 2008, J Neurosci Meth 172:250-254; Welinder & Ekblad, 2011, J Proteome Res 10:1416-1419).

5 La compleción del protocolo formal descrito facilita, gracias al análisis seriado de una única muestra, la valoración completa de la molécula PSA-NCAM. Su incorporación a los estudios sobre la biología molecular de esta proteína ahorra muestra biológica, recursos y tiempo de ensayo, además de proporcionar resultados homologables tanto de expresión de la proteína como de su grado de polisialilación.

10 La invención se refiere al procedimiento de análisis consistente en la concatenación de tres inmunoensayos consecutivos alternados con dos etapas de borrado o *stripping* de la membrana, cuya implementación comporta las ventajas referidas en el párrafo precedente. No resultan objeto de la invención los protocolos de los inmunoensayos o del *stripping*, los procedimientos de obtención y procesamiento de la muestra, como tampoco el resto de reactivos o procesos necesarios para la realización de los *western-blot*s.

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para realizar la valoración secuencial por *western-blot* de la proteína NCAM y de su cola de ácido polisiálico (PSA) en una sola muestra **caracterizado** por un protocolo formal que incluye los siguientes ensayos:
- 5
- a) valoración inmunoquímica mediante *western-blot* específico de una de las moléculas, NCAM o PSA
- 10 b) fase intermedia de borrado (*stripping*) de la membrana de *blot* para la eliminación del anticuerpo primario y secundario
- c) valoración inmunoquímica de la segunda molécula mediante *western-blot* específico
- 15 d) nueva fase de borrado de la membrana para la eliminación de los anticuerpos primario y secundario
- e) control de carga proteica mediante una proteína testigo valorada por medio de un inmunoensayo específico por *western-blot*
- 20 f) alternativamente al ensayo anterior o de modo complementario al mismo, el protocolo se completa con una tinción colorimétrica de las bandas proteicas de la membrana para el control de carga y el diagnóstico de la calidad de la transferencia.



- ②① N.º solicitud: 201400942  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 24.11.2014  
②③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N33/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑤⑥ Documentos citados   | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---|----------------------------|
| A         | KIM B. G., DAI H-N., MCATEE M., VICINI S., y BREGMAN B. "Remodeling of synaptic structures in the motor cortex following spinal cord injury." Experimental Neurology (2006) Vol. 198, páginas 401-415. Todo el documento.   | 1                          |
| A         | KIS J. Z., WANG C., OLIVE S., ROUGON G., LANG J., BAETENS D., HARRY D. y PRALONG W-F. "Activity-dependent mobilization of the adhesion molecule polysialic NCAM to the cell surface of neurons and endocrine cells." The EMBO Journal (1994) Vol. 13, páginas 5284-5292. Todo el documento.   | 1                          |
| A         | GEETHA L. POONGODI, NIMMAGADDA SURESH, SUBASH C. B. GOPINATH, TSCHINING CHANG, SADAKO INOUE y YASUO INOUE. "Dynamic change of NCAM polysialylation on human neuroblastoma (IMR-32) and rat pheochromocytoma (PC-12) cells during growth and differentiation." JBC The Journal of Biological Chemistry (05.2002). Todo el documento. | 1                          |
| A         | MAO X., SCHWEND T., y CONRAD G. W. "Expression and localization of neural cell adhesion molecule and polysialic acid during chick corneal development." Investigative Ophthalmology & Visual Science (2012) Vol. 53, páginas 1234-1243. Todo el documento.  | 1                          |
| A         | BARBEAU D., LIANG J. J., ROBITAILLE Y., QUIRION R., y SRIVASTAVA L. K. "Decreased expression of the embryonic form of the neural cell adhesion molecule in schizophrenic brains." Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America (1995) Vol. 92, páginas 2785-2789. Todo el documento.              | 1                          |

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  
23.02.2015

Examinador  
M. J. García Bueno

Página  
1/4

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

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

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 23.02.2015

**Declaración**

|   |                    |           |
|---|--------------------|-----------|
| <b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>            | Reivindicaciones 1 | <b>SI</b> |
|   | Reivindicaciones   | <b>NO</b> |
| <b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b> | Reivindicaciones 1 | <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       | KIM B. G., DAI H-N., MCATEE M., VICINI S., y BREGMAN B. "Remodeling of synaptic structures in the motor cortex following spinal cord injury." <i>Experimental Neurology</i> (2006) Vol. 198, páginas 401-415. Todo el documento.   | 2006              |
| D02       | KIS J. Z., WANG C., OLIVE S., ROUGON G., LANG J., BAETENS D., HARRY D. y PRALONG W-F. "Activity-dependent mobilization of the adhesion molecule polysialic NCAM to the cell surface of neurons and endocrine cells." <i>The EMBO Journal</i> (1994) Vol. 13, páginas 5284-5292. Todo el documento.   | 1994              |
| D03       | GEETHA L. POONGODI, NIMMAGADDA SURESH, SUBASH C. B. GOPINATH, TSCHINING CHANG, SADAKO INOUE y YASUO INOUE. "Dynamic change of NCAM polysialylation on human neuroblastoma (IMR-32) and rat pheochromocytoma (PC-12) cells during growth and differentiation." <i>JBC The Journal of Biological Chemistry</i> (05.2002). Todo el documento. | 2002              |
| D04       | MAO X., SCHWEND T., y CONRAD G. W. "Expression and localization of neural cell adhesion molecule and polysialic acid during chick corneal development." <i>Investigative Ophthalmology &amp; Visual Science</i> (2012) Vol. 53, páginas 1234-1243. Todo el documento.  | 2012              |
| D05       | BARBEAU D., LIANG J. J., ROBITAILLE Y., QUIRION R., y SRIVASTAVA L. K. "Decreased expression of the embryonic form of the neural cell adhesion molecule in schizophrenic brains." <i>Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America</i> (1995) Vol. 92, páginas 2785-2789. Todo el documento.              | 1995              |

**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 invención consiste en un procedimiento para realizar la valoración secuencial por western-blot de la proteína NCAM y de su cola de ácido polisialico (PSA) en un sola muestra (reivindicación 1).

El documento D01 consiste en un estudio para determinar si una lesión medular conduce a una remodelación de las estructuras sinápticas en la corteza motora mediante la visualización de las estructuras sinápticas mediante microscopía confocal y el examen de la densidad de la columna vertebral.

En este estudio se observó que dicha remodelación está acompañada de un aumento de la expresión de NCAM-PSA, ya que se examinaron los cambios correlativos de expresión de varias proteínas asociadas con la sinapsis en la corteza motora después de una lesión mediante inmunoblot (ver todo el documento).

El documento D02 consiste en un estudio sobre la exposición de PSA- NCAM en la membrana plasmática tras la activación celular. La detección de la proteína y su cola de ácido polisialico se midió mediante western-blot (ver todo el documento).

El documento D03 consiste en un estudio de la expresión de PSA y NCAM en diferentes líneas celulares (ver todo el documento).

El documento D04 consiste en un estudio de la expresión y localización de la molécula de adhesión celular (NCAM) y el ácido polisialico en la córnea del pollo durante el desarrollo embrionario y postnatal mediante PCR y western-blot (ver todo el documento).

El documento D05 consiste en una evaluación de la expresión de NCAM y PSA-NCAM en cerebros esquizofrénicos para el estudio del desarrollo del cerebro (ver todo el documento).

Ninguno de los documento D01-D05, o cualquier combinación relevante de ellos revela un procedimiento de valoración secuencial por western-blot seriado utilizando una única muestra.

Por lo tanto, los documentos D01-D05 son solo documentos que reflejan el estado de la técnica. En consecuencia, la invención es nueva y se considera que implica actividad inventiva y que tiene aplicación industrial según los artículos 6.1 y 8.1 Ley 11/1986.