



00 29093

ITU
NTE
ENCIC

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 00029093 00000000 Folios: 46
Fecha (AMD): 2000-04-19 16:27:32
Trámite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TRÁMITE: 02 EVENTO: 01 ACTUACION: 01

DATOS DEL SOLICITANTE

(71) Nombres y Apellidos o Razón Social

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH

No. de identificación

Representante Legal (Persona Jurídica)

País de Domicilio

Alemania

Departamento o Estado

Dirección

Ingelheim am Rhein

Ciudad

D-55216

(74) DATOS DEL APODERADO

Nombre

EMILIO FERRERO

Dirección y Domicilio

Carrera 4 No. 72-35 Piso 4o.

Ciudad

Bogotá, Colombia

DATOS DEL INVENTOR

(72) Nombre del Inventor(es)

1- Dr. Mark Stephen ROGERS

2- Dr. Matthias GIESE

Identificación

Dirección

1- Oaklodge, IE-Glencree, Wicklow, Irlanda

2- Am Honigberg 2c, D-55545 Bad Kreuznach, Alemania.

Ciudad

DATOS DE LA PATENTE DE INVENCION

(54) Título de la Invención

**PROCEDIMIENTO PARA EL DIAGNOSTICO DE
ENCEFALOPATIAS ESPONGIFORMES TRANSMISIBLES**

PRIORIDAD REIVINDICADA

SI ☒ NO ☐ TIPO DE PRIORIDAD ANDINA ☐ UNIONISTA ☒

(33) País

Fecha

No. Solicitud

DE.

21 de Abril de 1999

199 18 141.1

Convención de París

Para Publicar a los

☐ 6 meses

☐ 12 meses

☒ 18 meses a partir de la fecha de la presente solicitud

Colo: 04484-801-006-0

RCB/mrm-50

(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL

19 ABR 2000

RESUMEN CON EL OBJETO Y LA FINALIDAD DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a un procedimiento para el diagnóstico preclínico y clínico de encefalopatías espongiformes transmisibles, caracterizado porque se determina la expresión modificada de una proteína marcadora. En formas de realización particulares, en el procedimiento conforme al invento la proteína marcadora medida es la proteína de priones PrP-sen o interferón gamma (IFNy) o el receptor de laminina (LR) o el precursor del receptor de laminina (LRP). El invento se refiere también a un estuche de ensayo con utilización de anticuerpos que son específicos para la proteína marcadora conforme al invento. El invento se refiere además a un estuche de ensayo con utilización de oligonucleótidos que son capaces de hibridarse en condiciones rigurosas con el ácido nucleico que codifica la proteína marcadora conforme al invento. El invento se refiere además a la utilización de anticuerpos u oligonucleótidos, que son específicos para las proteínas marcadoras antes mencionadas, en un procedimiento conforme al invento. El invento se refiere además a la utilización del estuche de ensayo para el diagnóstico de encefalopatías espongiformes transmisibles.

ANEXOS DE LA SOLICITUD

Certificado de Existencia y Representación Legal cuando el solicitante sea Persona Jurídica	☒
Los poderes debidamente otorgados, o mención de su protocolización ante la SIC	☒
Recibo de la tasa respectiva	☒
Recibo de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación	☐
Si se reivindica prioridad Andina:	
Copia de la primera solicitud	☐
Traducción oficial	☐
Si se reivindica prioridad Unionista:	
Copia certificada de la primera solicitud:	☐
Nota: Debe presentarse dentro de los tres (3) meses contados a partir de la fecha de radicación de la solicitud posterior	
Traducción simple	☐
Capítulo descriptivo	☒
Dibujos, planos necesarios	☒
Capítulo reivindicatorio	☒
Tarjeta archivo propietarios según formato	☒
Tarjeta archivo temático según formato	☒
Extracto para publicación según formato	☒
Arte final 12 x 12 cms Y 6x6 cms	☐
Otros Documentos	☐

SOLICITO LA CONCESION DE LA PATENTE DE INVENCION Y DECLARO QUE LA INVENCION ES NUEVA Y DE MI PROPIEDAD

FIRMA

Emilio Ferrero

NOMBRE EMILIO FERRERO

CC. 438.019 de Usaquén

T.P.No. 31.929

Procedimiento para el diagnóstico de encefalopatías espongiformes transmisibles

El invento se refiere a un procedimiento para el diagnóstico de encefalopatías espongiformes transmisibles, así como a un estuche de ensayo para diagnóstico
5 mediando utilización de anticuerpos específicos para proteínas de priones y receptores de laminina. El invento se refiere además a la utilización del procedimiento o del estuche de ensayo para diagnosticar encefalopatías espongiformes transmisibles.

Ya hace más de 250 años se descubrió una enfermedad de corderos, que iba
10 acompañada por nerviosismo, prurito y ataxia y que finalmente terminaba con entumecimiento, parálisis y muerte. La enfermedad es conocida hoy en día como "*scrapie* (rascazón)" en países de lengua inglesa (puesto que los animales se frotan en postes y árboles, con el fin de reprimir el prurito), "*la trembrante* (la tembladera)" en Francia y "*Traberkrankheit* (enfermedad de trotones)" en Alemania. Estos nombres
15 reflejan la amplitud y diversidad de los síntomas. La rascazón fue investigada como el prototipo de un grupo de enfermedades, que atacan no solamente a los animales sino también a los seres humanos: las encefalopatías espongiformes transmisibles (del inglés *transmissible spongiform encephalopathies* = TSE). Las TSE's son enfermedades neurodegenerativas que evolucionan hasta la muerte (fatales), que
20 pueden atacar a un gran número de animales mamíferos.

La encefalopatía espongiforme bovina (BSE) es una enfermedad neurodegenerativa de animales bovinos y está relacionada con la rascazón en corderos y cabras y con la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob en seres humanos. Una glicoproteína asociada con membranas, codificada por el hospedante, de función desconocida, la
25 denominada proteína de priones PrP, desempeña un papel de importancia primordial en la patogénesis de estas enfermedades. Esta isoforma celular es expresada de modo especialmente fuerte en células neuronales, pero también se puede detectar con diversa frecuencia en células no neuronales. Esta proteína membranal es sensible (PrP-sen) a la digestión con enzimas (proteasas) específicas. Sin embargo, la forma
30 maligna soluble de la PrP (PrP-res), es resistente a proteasas y se acumula en los cerebros de animales infectados por BSE para formar placas amiloides. Esta forma de PrP-res está asociada exclusivamente con todas las enfermedades del tipo de TSE, inclusive la BSE, y puede ser extraída a partir de un tejido cerebral infectados con TSE/BSE.

Las desacostumbradas propiedades del patógeno de rascazón/BSE dieron lugar a especulaciones en una primera fase temprana de que el patógeno consiste exclusivamente en un ácido nucleico o en proteínas, o de que no contiene ni ácido nucleico ni proteínas y es un polisacárido o un fragmento de membrana. Los conceptos discutidos en máximo grado en el momento actual son la hipótesis de "sólo-proteína" y la hipótesis de virus/virino:

La hipótesis de "sólo-proteína" se basa en que el prión infeccioso PrP-res no contiene ningún ácido nucleico y es auto-replicante. Se especula sobre que una PrP-res se fija a una PrP-sen y convierte a ésta con ello en la forma maligna. La conformación de esta isoforma maligna está señalada por estructuras de hojas plegadas en beta, mientras que en la isoforma celular predominan las hélices alfa. La hipótesis de virus/virino se basa en que el agente infeccioso consta de un ácido nucleico vírico (posiblemente ácido ribonucleico = ARN) y en que la proteína de priones es una envoltura para el genoma del virus. El origen en un hospedante de la envoltura de priones explicaría la ausencia de reacciones inmunológicas e inflamatorias. La existencia de un ácido nucleico explicaría adicionalmente las aproximadamente 20 diferentes cepas de rascazón de ratones que se han descrito hasta el momento actual.

La isoforma celular PrP-sen está glicosilada en dos posiciones con asparagina, tiene un peso molecular de 33-35.000 Da y está anclada en la superficie externa de la membrana plasmática por un glicolípido del tipo de fosfatidil-inositol, que está fijado a su aminoácido terminal de carboxi. El máximo régimen de expresión de la PrP-sen se mide en el cerebro, pero el gen es expresado también en un tejido embrional no neuronal y de adultos. La función biológica de la proteína es hasta hoy en día todavía confusa. Se cree, entre otras cosas, que la PrP podría ser un receptor para factores de diferenciación neurotróficos. También esta proteína es puesta en relación con el ritmo de sueño y vigilia. Sin embargo, la PrP podría ser también un receptor para virus neurotróficos.

La isoforma celular normal de la proteína es degradada completamente por proteasas (PrP-sen). Por el contrario, la isoforma maligna (PrP-res) es degradada por proteasas para dar un fragmento de 27-30.000 Da, que todavía es completamente infeccioso (PrP-res). A la PrP-res le faltan los primeros 67 aminoácidos de la proteína PrP-sen madura. Un proceso posterior a la transcripción está conectado con la conversión de la PrP-sen en la PrP-res, y se sospecha que la única diferencia entre

la PrP-sen y la PrP-res es una diferencia en la estructura espacial tridimensional. Parece no existir ninguna diferencia bioquímica entre las formas normal y anormal de la proteína. Esto explica también que las dos isoformas no presenten ninguna diferencia antigénica. Además, la PrP-sen y la PrP-res tienen una secuencia común de aminoácidos. La PrP es codificada por una copia individual de un gen cromosomal y está conservada en alto grado en animales mamíferos. La secuencia completa que codifica la PrP está contenida en un único exón.

Al contrario que la PrP-sen, que es expresada en la superficie, la PrP-res se acumula en vesículas citoplasmáticas, de las que muchas son lisosomas secundarios.

Las enfermedades del tipo de TSE se caracterizan por un largo tiempo de incubación, durante el cual no se observa ningún síntoma clínico. Le sigue una corta fase clínica, que conduce inevitablemente a la muerte.

La rascazón y la BSE eran diagnosticadas hasta ahora usando métodos histopatológicos, clínicos y epidemiológicos, puesto que los animales infectados de un modo natural probablemente no reaccionan de modo serológico a la PrP-res y el diagnóstico por inoculación de animales de laboratorio puede necesitar hasta 18 meses. El diagnóstico clínico se efectúa *post mortem* por examen histopatológico del cerebro. El estado en cuanto a BSE es clasificado en: positivo para BSE, negativo para BSE y sospechoso de BSE. Los animales que se consideran como sospechosos de BSE presentan los mismos signos clínicos que los animales positivos para BSE. Sin embargo, en el momento del examen, la evidencia histopatológica de la BSE es (todavía) negativa en el momento de la investigación. No obstante, este estado "sospechoso de BSE" puede ser un estado "pre-positivo para BSE", aunque en algunos casos se haga un diagnóstico alternativo o el animal pueda no tener BSE.

Los complejos métodos de diagnóstico, que antes se han mencionado, implican la investigación con microscopio de, por ejemplo, vacuolos específicos para BSE en las neuronas y el neurópilo, astrocitosis, pérdida neuronal y la deposición de acumulaciones anormales de PrP-res, también conocidas como fibrillas asociadas con rascazón (SAF, de *Scrapie-associated fibrils*). Las SAF se pueden determinar *in situ* por inmuno-histoquímica de histo-borrones (*histoblots*) y en extractos tratados del cerebro atacado mediante transferencia de borrones Western (*Western blotting*), motas-borrones (*dot-blots*), o como acumulaciones típicas de fibrillas por coloración negativa en la microscopía electrónica de transmisión.

Otro enfoque para diagnosticar indirectamente la BSE consiste en analizar el

líquido cefalorraquídeo o cerebroespinal. Las enfermedades neurológicas van acompañadas por modificaciones cualitativas y cuantitativas en el metabolismo de proteínas dentro del sistema nervioso central (SNC o CNS de *central nervous system*) y éstos se reflejan en una composición modificada del líquido cerebroespinal (LCE = CSF de *cerebrospinal fluid*). Mediando utilización de la electroforesis en gel bidimensional es posible encontrar proteínas marcadoras que se correlacionen con la enfermedad. Posibles marcadores de este tipo (sólo una indicación indirecta de una BSE) fueron determinados por primera vez en una fase tardía del período de incubación de una BSE experimental. Sin embargo, a partir de experimentos comparativos con muestras obtenidas de pacientes de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob es sabido que este marcador se puede encontrar también en pacientes de la enfermedad de Alzheimer. La enfermedad de Alzheimer es considerada como una encefalopatía espongiforme no transmisible.

Incluso aunque se han desarrollado métodos más sencillos para su detección, es improbable que tales ensayos sean ventajosos para diagnosticar una BSE preclínica.

En el estado de la técnica se describen procedimientos para la preparación de polipéptidos sintéticos con determinantes antigénicos de la proteína de priones (WO 93/11155, WO 93/23432), anticuerpos específicos para la proteína de priones de rascazón nativa (WO 97/10505), así como métodos para la detección de la rascazón en corderos (WO97/37227). Korth y colaboradores (1997, Nature 390: 74-77) describen un anticuerpo monoclonal procedente de ratones, que es capaz de distinguir entre la isoforma celular (PrP^c) y la isoforma de rascazón (PrP^{sc}).

La misión del presente invento es poner a disposición un procedimiento para diagnosticar encefalopatías espongiformes transmisibles preclínicas o clínicas.

El problema planteado por esta misión se pudo resolver con el presente invento dentro del marco de la memoria descriptiva y de las reivindicaciones, mediante un procedimiento para diagnosticar encefalopatías espongiformes transmisibles preclínicas o clínicas.

Conforme al invento, el procedimiento está caracterizado porque

- a) se extrae una muestra de sangre de un mamífero vivo
- b) se concentran las células a partir de esta muestra de sangre, denominándose a estas células como células dianas
- c) se determina en las células dianas la expresión de una proteína marcadora

para encefalopatías espongiformes transmisibles

d) el resultado obtenido se compara con un valor testigo.

En una forma de realización particular del procedimiento conforme al invento, se homogeneizan las células dianas.

5 La fase preclínica de las encefalopatías espongiformes transmisibles es el largo período de tiempo de incubación después de una infección con la proteína de priones sin síntomas clínicos externos. El presente invento hace posible, en particular, diagnosticar encefalopatías espongiformes transmisibles durante esta fase sin
10 síntomas clínicos externos. Por consiguiente, el presente invento hace posible también efectuar un diagnóstico en mamíferos, en los que se sospechan encefalopatías espongiformes transmisibles, pero en los que sin embargo los hallazgos histopatológicos en el momento del ensayo son (todavía) negativos (sospechoso de TSE, véase también la descripción anterior para una BSE). La fase clínica es la breve fase de síntomas clínicos que sigue a la fase preclínica y que hasta ahora ha
15 conducido inevitablemente a la muerte de los mamíferos infectados debido a la ausencia de tratamientos de cualquier tipo. También durante esta fase, usando la enseñanza técnica del presente invento, se pueden diagnosticar encefalopatías espongiformes transmisibles. Entre las encefalopatías espongiformes transmisibles (TSE, de *transmissible spongiform encephalopathies*) se incluyen en particular la
20 enfermedad de rascazón de los corderos, la encefalopatía espongiforme bovina (BSE, de *bovine spongiform encephalopathy*) de animales bovinos así como la enfermedad de Kuru-Kuru y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob en seres humanos.

El concepto de determinar la expresión de una proteína marcadora significa que la mencionada proteína marcadora aumenta o disminuye demostrablemente
25 frente a un valor testigo. El concepto "demostrablemente" significa, por ejemplo, que la proteína marcadora es expresada en un grado mayor o menor en 50 hasta 100 % con respecto al valor testigo, o es aumentada o disminuida de modo estadísticamente significativo. Un valor testigo o un patrón se puede determinar por ejemplo usando células de mamíferos no infectados y se usa para la calibración del procedimiento
30 conforme al invento. Son conocidos por los expertos en la materia procedimientos para hacerlo.

Las proteínas marcadoras pueden ser cualesquiera de las proteínas conocidas por un experto en la materia, que se hayan aumentado o disminuido demostrablemente en el caso de encefalopatías espongiformes transmisibles preclínicas o clínicas. Se

da este caso, por ejemplo, cuando la proteína marcadora no es detectable en el testigo y puede ser identificada inequívocamente con los métodos seguidamente mencionados en mamíferos infectados o en mamíferos que sean sospechosos de tener una encefalopatía espongiforme transmisible.

5 En una forma especial de realización, el procedimiento conforme al invento está caracterizado porque la proteína marcadora es la proteína de priones PrP^{sen}. La proteína de priones PrP^{sen} conforme al invento es la isoforma celular de la proteína de priones, que es designada frecuentemente también como PrP^c. La PrP^{sen} (sen = sensible) es degradada totalmente por proteasas.

10 En otra forma especial de realización, el procedimiento está caracterizado porque la proteína marcadora es el interferón gamma (IFN γ). En todavía otra forma especial de realización, el procedimiento está caracterizado porque la proteína marcadora es interferón gamma (IFN γ) bovino. El IFN γ (p.ej. compárese Vilcek, J. y Oliveira, I.C. Int. Arch. Allergy Immunol., 1994, 104:311-316) así como el IFN γ bovino (Keefe R.G. y colaboradores, Vet. Immunol. Immunopathol., 1997, 56: 39-51)

15 son conocidos por los expertos en la materia.

 En otra forma especial de realización, el procedimiento está caracterizado porque la proteína marcadora es el receptor de laminina (LR, de Laminin-Receptor) o el precursor del receptor de laminina (LRP de *Laminin-Receptor-Precursor*). El receptor de laminina (p.ej. compárese Grosso, L.E., y colaboradores Biochemistry, 20 1991, 30: 3.346-3.350) y el precursor del receptor de laminina (p.ej. compárese Castronovo, V. y colaboradores J. Biol. Chem., 1991, 266: 20.440-20.446) son conocidos en el sector de la técnica. En otra forma de realización incluso más especial, el procedimiento está caracterizado porque la proteína marcadora es el

25 receptor de laminina (LR) bovino o el precursor del receptor de laminina (LRP) bovino.

 Las mencionadas proteínas marcadoras se pueden detectar usando - cualesquiera procedimientos que sean conocido por un técnico experto con conocimientos medios.

 En una forma preferida de realización, la proteína marcadora se determina por

30 un ensayo inmunitario. Un ensayo inmunitario utiliza anticuerpos monoclonales o antisueros policlonales que son específicos para la proteína marcadora, que están disponibles en el estado de la técnica. Por ejemplo, para la proteína marcadora PrP^{sen} se pueden emplear el anticuerpo monoclonal 13 o también el anticuerpo monoclonal 142 (Harmeyer S. y colaboradores, J Gen Virol 1998, véase la Figura 1). Los

ensayos inmunitarios incluyen los procedimientos de detección conocidos por un experto en la materia tales como el ensayo ELISA (en inglés: *enzyme-linked immunosorbent assay* = análisis de inmuno-sorbente enlazado a enzima) o el denominado ensayo de *sandwich*-ELISA, = ELISA en emparedado, *Dot-Blots*, *immunoblots* (borrones inmunes), ensayos radioinmunológicos (*radioimmunoassay*, RIA), el ensayo de Ouchterlony basado en la difusión, o análisis de inmunofluorescencia con proyectiles (*rocket immunofluorescent assays*). Otro ensayo inmunitario es el denominado borrón de Western (también designado como proceso de transferencia de Western o emborronamiento de Western). La misión de un borrón de Western es transferir proteínas o polipéptidos que se han separado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida a un filtro de nitrocelulosa u otro soporte apropiado, y al mismo tiempo mantener las posiciones relativas de las proteínas o los polipéptidos que se han obtenido a partir de la electroforesis en gel. El borrón de Western es luego incubado con un anticuerpo que se fija específicamente a la proteína o al polipéptido que se toma en consideración. Estos procedimientos de detección pueden ser utilizados por un técnico con experiencia intermedia para la realización del invento aquí descrito. Se enumeran a continuación citas bibliográficas, en las que un experto en la materia podrá encontrar los procedimientos de detección antes mencionados así como otros: *An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam. Países Bajos (1986); Bullock y colaboradores, *Techniques in Immunocytochemistry*, Academic Press, Orlando, FL (Florida) Volumen 1 (1982), Volumen 2 (1983), Volumen 3 (1985); Tijssen, *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Países Bajos (1985).

En otra forma de realización, muy especial, las células dianas se incuban con anticuerpos que son específicos para la proteína marcadora, y se determina el complejo de antígeno y anticuerpo que se ha formado.

En una forma especialmente preferida de realización del procedimiento conforme al invento, se determina por métodos de biología molecular la expresión modificada de la proteína marcadora para encefalopatías espongiformes transmisibles. El concepto de procedimientos de biología molecular significa procedimientos de detección que incluyen, por ejemplo, la reacción en cadena de polimerasa (PCR) o pueden ser borrones de transferencia de Northern o Southern, que un experto en la materia puede encontrar en las obras clásicas de referencia (p.ej. Sambrook y

colaboradores (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, y Bertram, S. y Gassen, H.G. *Gentechnische Methoden*, Editorial G. Fischer, Stuttgart, Nueva York, 1991).

5 En otra forma preferida de realización del procedimiento conforme al invento, la proteína marcadora para encefalopatías espongiformes transmisibles se determina por una reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR, de *Reverse Transcriptase-Polymerase-Chain Reaction*). En esta forma especial de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) se aísla antes de nada el ARN total, éste se
10 transcribe inversamente usando la enzima "transcriptasa inversa" en el ADNc con el que se lleva a cabo luego la reacción PCR. Este procedimiento de detección es conocido por los expertos en la materia y se ha publicado en obras clásicas de referencia (p.ej. Sambrook y colaboradores (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva
15 York, y Bertram, S. y Gassen, H.G. *Gentechnische Methoden*, Editorial G. Fischer, Stuttgart, Nueva York, 1991).

Ejemplos de "mamíferos vivos" son conocidos por un experto en la materia de conocimientos intermedios e incluyen, por ejemplo, seres humanos así como corderos, cabras, cerdos, bovinos, corzos, conejos, hámster, ratas y ratones.

20 En una forma especial de realización, el procedimiento está caracterizado porque el mamífero vivo es un miembro de todas las familias de bóvidos, de modo sumamente preferido una vaca o un cordero. Aunque la solicitud se refiere en especial a procedimientos para diagnosticar encefalopatías espongiformes transmisibles en animales bovinos, la enseñanza técnica es aplicable igualmente a
25 cualquier animal que pueda ser atacado y afligido por el patógeno de las mencionadas encefalopatías, y es incluido por lo tanto en el presente invento.

Las células contenidas en la muestra de sangre abarcan todas las células sanguíneas que proceden de una célula tronco hematopoyética, p.ej. linfocitos, trombocitos, plaquetas o eritrocitos.

30 En otra forma especial de realización, el procedimiento está caracterizado porque las células dianas son leucocitos. El término leucocitos incluye, por ejemplo, leucocitos polimorfonucleares y mononucleares, células cebadas, células B o linfocitos B, células T o linfocitos T y células asesinas naturales (células NK = *natural killer*).

En una forma muy especial de realización, el procedimiento está caracterizado porque las células dianas son leucocitos mononucleares. El término de leucocitos mononucleares se refiere en particular a monocitos y macrófagos, células dendríticas y células de Langerhans.

5 En otra forma especial de realización, el procedimiento está caracterizado porque las células dianas son leucocitos polimorfonucleares. Los leucocitos polimorfonucleares incluyen los granulocitos eosinófilos, neutrófilos y basófilos.

10 El invento se refiere además a un estuche de ensayo para diagnóstico con el fin de detectar encefalopatías espongiformes, que contiene todos los elementos necesarios para la detección de la expresión modificada de una proteína marcadora para encefalopatías espongiformes transmisibles usando un procedimiento conforme al invento.

15 El invento se refiere además, en particular, a un estuche de ensayo para diagnóstico, que contiene anticuerpos específicos para una proteína marcadora para encefalopatías espongiformes transmisibles.

 El invento se refiere además, en particular, a un estuche de ensayo para diagnóstico para diagnóstico, caracterizado porque los anticuerpos conformes al invento son policlonales.

20 El invento se refiere además, en particular, a un estuche de ensayo para diagnóstico, caracterizado porque los anticuerpos conformes al invento son monoclonales.

25 El invento incluye también un estuche de ensayo para diagnóstico conforme al invento, que está caracterizado porque contiene todos los elementos necesarios para detectar expresión modificada de la proteína marcadora PrP-sen. con un procedimiento conforme al invento.

 El invento incluye también un estuche de ensayo para diagnóstico conforme al invento, que está caracterizado porque contiene todos los elementos necesarios para detectar la expresión modificada de la proteína marcadora, IFN γ , con un procedimiento conforme al invento.

30 El invento incluye también un estuche de ensayo para diagnóstico conforme al invento, que está caracterizado porque contiene todos los elementos necesarios para detectar la expresión modificada de la proteína marcadora, IFN γ bovino, con un procedimiento conforme al invento.

 El invento incluye también un estuche de ensayo para diagnóstico conforme

al invento, que está caracterizado porque contiene todos los elementos necesarios para detectar la expresión modificada de la proteína marcadora, receptor de laminina (LR), o de la proteína marcadora, precursor del receptor de laminina (LRP), con un procedimiento conforme al invento.

5 El invento se refiere además, en particular, a un estuche de ensayo para diagnóstico que es apropiado para la realización de un ensayo inmunitario *in situ*.

Un estuche de ensayo para diagnóstico es una colección de todos los componentes para un procedimiento de diagnóstico conforme al invento. Algunos ejemplos (que no constituyen una lista exhaustiva) de otros elementos con el fin de
10 realizar un procedimiento conforme al invento, incluyen recipientes tales como placas de 96 pocillos o placas de microtitulación, tubos de ensayo, otros apropiados recipientes, superficies y sustratos, membranas tales como filtros de nitrocelulosa, reactivos para lavar y tampones. Un estuche de ensayo para diagnóstico puede contener también reactivos que pueden detectar anticuerpos fijados, tales como por
15 ejemplo anticuerpos secundarios marcados, cromóforos, enzimas (p.ej. conjugadas con anticuerpos) y sus sustratos u otras sustancias que son capaces de fijar anticuerpos.

El invento se refiere además a un estuche de ensayo para diagnóstico destinado a detectar encefalopatías espongiformes transmisibles, que contiene
20 oligonucleótidos, capaces de hibridarse en condiciones rigurosas con el ácido nucleico que codifica una proteína marcadora para encefalopatías espongiformes transmisibles, así como los demás elementos necesarios para ejecutar un procedimiento conforme al invento.

El invento se refiere además a un estuche de ensayo para diagnóstico conforme al invento, que está caracterizado porque contiene todos los elementos necesarios para llevar a cabo una reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa
25 inversa (RT-PCR). Dicho estuche puede contener, pero no se limita además de a tubos de ensayo o placas de 96 pocillos o placas de microtitulación, otros apropiados recipientes, superficies y sustratos, membranas tales como filtros de nitrocelulosa, reactivos para lavar y tampones de reacción /que pueden variar en el pH y las
30 concentraciones de magnesio), agua estéril, un aceite mineral, BSA (*bovine serum albumin* = albúmina de suero bovino), $MgCl_2$, $(NH_4)_2SO_4$, DMSO (dimetil-sulfóxido), mercaptoetanol, nucleótidos (dNTPs), enzimas, tales como polimerasa de *Taq* y la transcriptasa inversa y, como la matriz de ADN, la secuencia de ADN de la proteína

marcadora o partes de ella, oligonucleótidos específicos para una proteína marcadora conforme al invento, una plantilla de control o testigo, DEPC-agua, DNAsa, RNAsa y compuestos adicionales conocidos por un profesional experto.

5 Los oligonucleótidos conformes al invento son cortas moléculas de ácidos nucleicos con una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 100 nucleótidos, que se fijan en condiciones rigurosas con la secuencia de ácido nucleico que es complementaria con una proteína marcadora. Por condiciones rigurosas un experto en la materia entiende condiciones que seleccionan una homología de más de 85 %, preferiblemente más de 90 % (compárense Sambrook y colaboradores
10 (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, y Bertram, S. y Gassen, H.G. Gentechnische Methoden, Editorial G. Fischer, Stuttgart, Nueva York, 1991).

El invento se refiere además a un estuche de ensayo para diagnóstico conforme al invento, que contiene oligonucleótidos, que son capaces de hibridarse
15 en condiciones rigurosas con el ácido nucleico que codifica la PrP-sen.

El invento se refiere además a un estuche de ensayo para diagnóstico conforme al invento, que contiene oligonucleótidos, que son capaces de hibridarse en condiciones rigurosas con el ácido nucleico que codifica el IFNy.

El invento se refiere además a un estuche de ensayo para diagnóstico conforme al invento, que contiene oligonucleótidos, que son capaces de hibridarse
20 en condiciones rigurosas con el ácido nucleico que codifica el IFNy bovino.

El invento se refiere además a un estuche de ensayo para diagnóstico conforme al invento, que contiene oligonucleótidos, que son capaces de hibridarse en condiciones rigurosas con el ácido nucleico que codifica el receptor de laminina
25 (LR) o el precursor del receptor de laminina (LRP).

En otra forma de realización, el presente invento se refiere al uso de un anticuerpo que es específico para PrP-sen en un procedimiento conforme al invento.

En otra forma de realización, el presente invento se refiere al uso de un anticuerpo que es específico para IFNy en un procedimiento conforme al invento.

30 En otra forma de realización, el presente invento se refiere al uso de un anticuerpo que es específico para IFNy bovino en un procedimiento conforme al invento.

En otra forma de realización preferida, el presente invento se refiere al uso de un anticuerpo que es específico para el receptor de laminina (LR) o el precursor del

receptor de laminina (LRP) en un procedimiento conforme al invento.

En otra forma de realización preferida, el presente invento se refiere al uso de oligonucleótidos que son capaces de hibridarse en condiciones rigurosas con el ácido nucleico que codifica IFN γ en un procedimiento conforme al invento.

5 En otra forma de realización preferida, el presente invento se refiere al uso de oligonucleótidos que son capaces de hibridarse en condiciones rigurosas con el ácido nucleico que codifica IFN γ bovino en un procedimiento conforme al invento.

En otra forma de realización preferida, el presente invento se refiere al uso de oligonucleótidos que son capaces de hibridarse en condiciones rigurosas con el ácido nucleico que codifica el receptor de laminina (LR) o el precursor del receptor de laminina (LRP) en un procedimiento conforme al invento.

Otra forma de realización preferida es el uso del estuche de ensayo para diagnóstico conforme al invento para detectar encefalopatías espongiformes transmisibles en el diagnóstico de encefalopatías espongiformes humanas y animales o para medidas de control epidemiológicas de BSE o rascazón endémica.

Explicaciones acerca de las figuras

Figura 1: Determinación de la proteína marcadora PrP^{sen} en un "borrón de Western"

20 La Figura muestra la determinación de la proteína marcadora PrP^{sen} en leucocitos mononucleares (MN) de animales bovinos infectados con BSE y animales testigos negativos para BSE en un "borrón Western" mediante anticuerpos monoclonales /42.

25 Las células fueron homogeneizadas en sarcosilo al 2 %. La preparación homogeneizada se aplica al gel en una concentración de 60 μ g/pocillo.

Pista 1: Marcador del peso molecular

Pista 2: Cerebro con BSE (testigo positivo, que es positivo para BSE),

Pista 3: Animal bovino n° 058193 (positivo para BSE)

30 Pista 4: Animal bovino n° 5061 (positivo para BSE)

Pista 5: Animal bovino n° 2819 (positivo para BSE)

Pista 6: Animal bovino n° 279046 (testigo negativo, que es negativo para BSE)

Pista 7: Animal bovino n° 4751 (positivo para BSE)

Todas las muestras de MN se obtienen de animales bovinos infectados con BSE, con la excepción del animal bovino nº 279046. La expresión de PrP^{sen} es positiva en todos los animales bovinos infectados con BSE en comparación con el testigo negativo. El animal bovino nº 5061 (pista 4) expresa en este caso PrP^{sen} con menos intensidad, pero claramente por encima del testigo negativo.

Figura 2: Determinación de la proteína marcadora IFN γ con una RT-PCR

La Figura muestra la determinación de la proteína marcadora IFN γ con una RT-PCR en animales bovinos infectados con BSE y animales testigos negativos para BSE.

Pista 1: Testigo con GAPDH, animal bovino nº 4372 (positivo para BSE)

Pista 2: IFN γ , animal bovino nº 4372 (positivo para BSE)

Pista 3: Testigo con GAPDH, animal bovino nº 441 (negativo para BSE)

Pista 4: IFN γ , animal bovino nº 441 (negativo para BSE)

Figura 3: Determinación de la proteína marcadora receptor de laminina con una RT-PCR

La Figura muestra la medición de la proteína marcadora receptor de laminina (LR) con una RT-PCR en animales bovinos infectados con BSE, animales bovinos en los que se sospechaba la BSE, así como animales testigos negativos para BSE.

Parte A)

Pista 1: Animal bovino nº 4471 (positivo para BSE)

Pista 2: Animal bovino nº 58193 (positivo para BSE)

Pista 3: Animal bovino nº 462 (testigo negativo)

Pista 4: Animal bovino nº 5621 (sospechoso de BSE)

Pista 5: Animal bovino nº 5054 (sospechoso de BSE)

Pista 6: Testigo con ADN diana

Pista 7: Vacía

Pista 8: Marcador del peso molecular

Parte B)

Para cada pista en la *Parte A)* hay una correspondiente RT-PCR de D-gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) como un testigo para la actividad

diferencial de la transcriptasa inversa.

El invento se describe con mayor detalle con ayuda del siguiente Ejemplo.

Ejemplo 1: Diagnóstico de BSE mediante la expresión aumentada de proteínas marcadoras específicas en leucocitos aislados

El siguiente Ejemplo describe el diagnóstico de una BSE en animales bovinos por determinación de la expresión aumentada de las proteínas marcadoras PrP^{sen} o IFN γ o del (precursor del) receptor de laminina (LR(P)) en leucocitos mononucleares (MN) o polimorfonucleares (PMN) aislados.

Aislamiento de leucocitos mononucleares (MN) y polimorfonucleares (PMN) procedentes de sangre entera de bovino

Estas células especiales de la sangre se aíslan por dos etapas de centrifugación, siendo la última una centrifugación en gradiente de densidad con el fin de obtener el denominado "buffy coat" = (revestimiento anteado), seguido por la lisis de los eritrocitos.

Etapas 1: Muestras de sangre

Las muestras de sangre (en un volumen de aproximadamente 400 ml) se extraen de los animales y se colocan directamente en un recipiente especial. Este recipiente ya está provisto de una mezcla de glucosa y citrato: glucosa 68 mM, citrato de tri-sodio 37,4 mM, ácido cítrico 17,4 mM, ajustado a pH 7,3, como anticoagulante. La sangre y el anticoagulante están en una relación de 6:1. Las muestras de sangre se envían inmediatamente al laboratorio para el aislamiento de las células.

Etapas 2: Concentración de los leucocitos

1ª centrifugación

Exactamente 40 ml de sangre entera de un animal bovino, tratada con un anticoagulante, se colocan en un tubo de ensayo para centrifugación de 50 ml de capacidad, estéril y cerrable herméticamente, y se centrifuga a 800 x g durante 20 minutos a la temperatura ambiente en una centrífuga rotatoria sin freno. La centrifugación debería prolongarse durante 5 minutos por cada hora (hasta 3 horas) en que se hayan almacenado las muestras de sangre después de su recogida.

Esta primera centrifugación conduce a la formación de tres bandas separadas:

Banda superior - suero

Banda central - leucocitos (los denominados "anteados")

Banda inferior - eritrocitos

5

Medio para centrifugación por densidad:

Con el fin de aislar los leucocitos se puede usar un medio comercial clásico. Los autores del invento hemos utilizado NYCOMED Lymphoprep®, con una densidad de 1,077 g/ml.

10

El suero es cuidadosamente retirado y congelado profundamente a -20°C para análisis ulterior. La capa de leucocitos es retirada y colocada en un nuevo tubo de ensayo para centrifugación.

2ª centrifugación

15

Exactamente 15 ml de los leucocitos procedentes de la primera centrifugación se extienden sobre 35 ml de NYCOMED Lymphoprep®, con una densidad de 1,077 g/ml en un tubo de ensayo para centrifugación de 50 ml de capacidad, estéril y cerrable herméticamente.

Centrifugación: 800 x g/ 20 min - (a TA) en una centrifuga sin freno.

20

La centrifugación se debería prolongar en cada caso durante 5 minutos por cada hora (hasta 3 horas) en la que se hayan almacenado las muestras de sangre después de su recogida.

Esta 2ª centrifugación conduce a la formación de cuatro bandas separadas.

De arriba hacia abajo

25

1ª banda - suero (residual)

2ª banda - leucocitos mononucleares (monocitos y linfocitos = anteados)

3ª banda - interfase de medio

4ª banda - leucocitos polimorfonucleares y eritrocitos (residuales)

30

Etapa 3: Separación de los leucocitos mononucleares (MN)

La banda 2 contiene monocitos y linfocitos, y es succionada cuidadosamente mediante una pipeta estéril de Pasteur y transferida a un tubo de ensayo para centrifugación estéril, de 50 ml de capacidad. Las células se lavan dos veces con el mismo volumen de PBS (solución tamponada con fosfato - *phosphate-buffered*

17

saline) estéril y se centrifugan a 600 x g / durante 15 min / a 10°C. Las células sedimentadas se vuelven a suspender en HBSS (*Hanks balanced salt solution* = solución salina equilibrada de Hanks con NaHCO₃, sin rojo de fenol). La vitalidad y el número de células se determinan usando azul de Trypan.

5

Etapas 4: Separación de los leucocitos polimorfonucleares (PMN)

Después de que hubo sido separada con pipeta la banda 2, se retiran también por succión las bandas 1 y 3. La mezcla de PMN y eritrocitos se diluye luego a tres veces con un tampón estéril para lisis de eritrocitos (ELB, de *Erythrocyte Lysing Buffer*, a base de KHCO₃ 8,9 mM, NH₄Cl 154,9 mM y EDTA 0,01 mM), se mezcla cuidadosamente y se incuba durante 10 min a TA.

10

Centrifugación: 800 x g / 10 min / 10°C

El material sobrenadante se desecha y el sedimento se vuelve a suspender en 20 ml de tampón ELB, se mezcla, se incuba y se centrifuga de nuevo.

15

Centrifugación: 800 x g / 10 min / 10°C

El material sobrenadante se desecha y el sedimento se lava con 20 ml de HBSS (como antes, pero con la adición de MgCl₂ 1 mM).

Centrifugación: 800 x g / 8 min / 10°C.

El material sobrenadante se desecha y las células se vuelven a suspender en HBSS. La vitalidad y el número de células se determinan con azul de Trypan.

20

Resultados: Números de células

Tipo de células	Número de células/ml de sangre	Vitalidad
1. MN	2,25 x 10 ⁶	≥ 93 %
2. PMN	4,03 x 10 ⁶	≥ 98 %

25

Las siguientes mediciones se realizaron con los leucocitos MN y PMN aislados de animales infectados con BSE:

30

- I. Expresión aumentada de la isoforma celular de la proteína de priones, PrP^{sen}
- II. Expresión aumentada de la proteína interferón-gamma, IFNγ
- III. Expresión aumentada del (precursor del) receptor de laminina, LR(P)

I. Expresión aumentada de la isoforma celular PrP^{sen}

El régimen de expresión de PrP^{sen} en leucocitos aislados procedentes de animales testigos y de animales infectados con BSE se mide mediante un análisis por borrón de Western (Harmeyer S. y colaboradores, J. Gen Virol 1998, 79, 937-945).

Se usa un revelado cromógeno.

Disgregación de las células:

Los leucocitos aislados se homogeneizan en una solución de sarcosilo al 2 % (Sigma, St. Louis, EE. UU.) durante 10 min / 4°C. La preparación homogeneizada así obtenida se sedimenta a continuación a 15.000 x g / 40 min / 4°C. El material sobrenadante se filtra con succión y se almacena a -20°C.

Se determinó la concentración de proteína de la preparación homogeneizada y todas las muestras se normalizaron a un patrón de 6 mg/ml de proteína. Se cargaron exactamente 60 µg del material homogeneizado dentro de cada pocillo.

Para la detección se emplea o bien el anticuerpo monoclonal 13 o el anticuerpo monoclonal 142. Los anticuerpos se describen detalladamente en la publicación antes mencionada. La dilución del anticuerpo es en cada caso de 1:10.

El anticuerpo secundario usado en este lo constituyeron anticuerpos conjugados con AP en una dilución de 1:3.000.

Resultados:

Se mostró que la expresión de proteína de PrP^{sen} está aumentada manifiestamente en leucocitos tanto MN como también PMN de animales infectados con BSE en comparación con animales testigos sanos (véase también el borrón de Western de la Figura 1 con muestras de otros animales bovinos).

Caso nº/ muestra	Estado en cuanto a BSE	Expresión aumentada de PrP ^{sen}
4372	positivo	si
4471	positivo	si
4401	sospechoso	si
	Negativo	
Testigo	negativo	no
	negativo	

II. Expresión aumentada de IFN γ

La expresión aumentada es medida de dos maneras:

- medición de la proteína mediante ELISA
- medición del ARNm específico mediante RT-PCR

5

1. Medición de IFN γ mediante ELISA

Se usa un ELISA comercial producido por CSL Veterinary Ltd, Melbourne, Australia.

10

Resultados:

Estado de BSE	Número de los animales	IFN γ (pg/ml)
Positivo para BSE	9	314,0 $\pm$ 78,2
Sospechoso de BSE	9	504,0 $\pm$ 109,7
Negativo para BSE	13	0,0 $\pm$ 0,0

15

2. Medición del ARNm de IFN γ usando una RT-PCR

El aislamiento del ARN (procedente de la fracción total de leucocitos) y la subsiguiente RT-PCR se llevan a cabo de acuerdo con métodos clásicos (Yi-Jun Shi y Jing-Zhlong Liu, Genet. Anal. Tech. Appl., 1992, 9, 149-150; Izraeli S. y colaboradores, Nucl. Acid. Res. 1991, 21, 6051; Michel U. y colaboradores, Anal. Biochem. 1997, 249, 246-247) con las modificaciones descritas seguidamente.

20

Aislamiento del ARN:

Para aislar el ARN total se usa el Sistema Promega (nº de catálogo G3191).

25

ADNc (reacción con RT)

Muestras aisladas de ARN se transcriben inversamente usando el Sistema de Transcripción Inversa = "*Reverse Transcription System*" de Promega (nº de catálogo A3500).

Reacción de PCR:

30

Con el fin de determinar el ARNm específico se emplea una doble reacción en cadena de polimerasa ("*nested PCR*" = PCR anidada").

Los cebadores de IFN γ usados para esto fueron:

20

FW1 (IFNF1) 5'GGAGTATTTTAATGCAAGTAGCCC 3'
FW2 (IFNF2) 5'GTAGCTAAGGGTGGGCCTCT 3'
RV (IFNR1) 5'GCTCTCCGGGCCTCGAAAGAGATT 3'

El producto de PCR que es de esperar debería tener una longitud de 357 pares de bases (pb).

Resultados:

5 El ELISA del IFN γ es confirmado inequívocamente por esta RT-PCR, es decir que en los animales infectados con BSE el IFN γ ha sido aumentado claramente.

La Figura 2 representa la RT-PCR de un ARNm de los leucocitos totales en sangre entera con las muestras de los animales bovinos 4372 y 441.

10

III. Expresión aumentada del (precursor del) receptor de laminina, LR(P)

La expresión se midió a través de una RT-PCR. Esta reacción incluye también la detección de LRP así como también de LR.

15

La secuencia bovina de LRP o LR no ha sido todavía descrita. Sin embargo, está proteína está altamente conservada en mamíferos. Se compararon por lo tanto los datos publicados de secuencias de la LR humana así como también de la murina. Basándose en este análisis de los datos se estableció la siguiente secuencia de cebadores:

20

Cebadores

Hacia adelante 5' AAGAGGACCTGGGAGAAGCT 3'
Hacia atrás 5' CCTTCTCAGCAGCAGCCCTGC 3'
Producto esperado: 517 pb

25

Aislamiento del ARN

Como se ha descrito en el punto II.2

ADNc (reacción con RT)

Como se ha descrito en el punto II.2

30

Reacción PCR
Reacción sencilla correspondiente a los métodos clásicos

Resultados:

5

Caso nº/ muestra	Estado de BSE	Expresión aumentada de LRP/LR
4471	positivo	si
58193	positivo	si
5621	sospechoso	(si)
5054	sospechoso	si
Testigo (462)	negativo	no

10

Estos resultados se representan en la Figura 3.

15

IV. Clonación y expresión del (Precursor del) Receptor de Laminina, LR(P), para generar anticuerpos específicos contra LR.

Desarrollo de cebadores hacia LR:

20

Los cebadores hacia LR bovina se diseñan para amplificar el gen entero de LR (Nº de acceso al Genbank: S 374431). Los cebadores se diseñaron a partir del gen de la proteína c10 bovina (Nº de acceso al Genbank: M 64923).

En los cebadores para LR seguidamente definidos, sus sitios de restricción aparecen en una casilla. Basándose en estos sitios de restricción es posible una clonación directa en el seno de E.coli.

25

Los cebadores diseñados para LR se usarán para amplificar la LR procedente del ARN celular total aislado a partir de sangre bovina entera.

La secuencia para los tres cebadores se puede ver seguidamente:

- LRPF1 5' ATTTCTCGAGTGTCCGAGCCCTTGATGTCC 3'
- LRPR1 5' ATTGAATTCCTTACGACCACTCGGTGGTGGT 3'
- LRPR2 5' ATTTTCTAGAAACGACCACTCGGTGGTTCC 3'

Sitios de restricción: El cebador LRPF1 puede ser cortado por Xho, el cebador LRPR1 puede ser cortado por Eco R1, mientras que el cebador LRPR2 puede ser cortado por Xba 1.

5 *RT-PCR y clonación del gen de LR bovino*

Los cebadores para LR se suspenden de nuevo en agua estéril hasta una concentración final de 50 ng/ml.

El ARN de leucocitos bovinos se aísla a partir de fracciones de los leucocitos totales de sangre bovina entera.

10 5 μ g de ARN se tratan con DNasa (Gibco BRL) y se lleva a cabo una transcripción inversa usando un Estuche de Reverse Transcription Kit (Promega, N° de catálogo; A3500). Las Reacciones en Cadena de Polimerasa (PCR) se llevan a cabo usando LRPF1, LRPR1 y LRPR2.

PCR: 35 ciclos, temperatura de reanillado 50°C.

15 Los fragmentos amplificados obtenidos después de la PCR se hacen pasar por gel de agarosa al 1 % para determinar su tamaño de fragmentos. Las bandas resultantes se purifican en gel, se comprueban de nuevo en cuanto a su tamaño y los fragmentos se retiran desde la agarosa y se vuelven a suspender en 10 μ l de agua estéril.

20 Los fragmentos amplificados se ligan dentro del vector pGEM-T (Boehringer Mannheim *Ligation Kit*).

Todos los clones se secuencian y se ha demostrado que son del gen de LR.

Se ha llevado a cabo la subclonación dentro de los vectores de expresión pBAD_{gIII} y pTrcHis (ambos obtenidos de Invitrogen Ltd.) y los clones se están
25 examinando actualmente en cuanto a la presencia de insertos.

Diseño de péptidos para el desarrollo de anticuerpos para LR:

Se diseñan cuatro péptidos para utilizarlos en el desarrollo de anticuerpos para el Receptor de Laminina (LR).

30 Estos péptidos se diseñan usando la proteína c10 bovina N° de acceso al Genbank: M 64923; proteína Id. AAA62713.1)

Un programa de ordenador (Antheprot) que predice la estructura, y los sitios hidrófobos, hidrófilos y antigénicos de una proteína se usa para diseñar los péptidos.

Los parámetros principales que se concentran para la selección de dos de los

péptidos son hidrófilos y antigénicos, otros dos péptidos se escogen debido a su situación en las regiones terminales de C y N de la proteína.

Péptido 1141 MSGALDVLQMKEEDVLKFLAGC

5 (Terminal de Amino) Correspondiente a los residuos de aminoácidos 1-20 desde el extremo terminal de amino de la proteína.

Punto Isoeléctrico (pI) de 4,32.

Péptido 1142 RLLVVTDPRADHQPLTEASYGC

10 (Antigénico) Correspondiente a los residuos de aminoácidos 120 - 140 seleccionados a partir de una región antigénica de la proteína.

Punto Isoeléctrico (pI) de 5,38.

Péptido 1143 KKEEQAAEKAVTKEEFQGEWGC

15 (Hidrófilo y antigénico) Correspondiente a los residuos de aminoácidos 212-231 seleccionados a partir de una región hidrófila y antigénica de la proteína.

Punto Isoeléctrico (pI) de 4,48.

Péptido 1144 FTAAQPEVADWSEGVQVPSVGGC

20 (Terminal de Carboxi) Correspondiente a los residuos de aminoácidos 238-257 seleccionados a partir de la región terminal de carboxi de la proteína.

Punto Isoeléctrico (pI) de 3,58.

25 Cada péptido es conjugado con Imject[®] Proteína Portadora de Ovalbúmina Activada por Maleimida (Pierce Warner Ltd.) de la siguiente manera.

Los péptidos se disuelven hasta una concentración final de 10 mg/ml en Na₂HPO₄ 100mM (de pH 7,2).

Se disuelve Imject[®] Proteína Portadora de Ovalbúmina Activada por Maleimida hasta una concentración final de 10 mg/ml en agua estéril.

30 El péptido y la Ovalbúmina se dejan conjugar durante 2 horas a la temperatura ambiente.

Después de la conjugación la solución de proteína conjugada se dializará en un volumen 500 veces mayor de PBS (pH 7,4) y almacenará a -20°C hasta que se requiera.

Producción de anticuerpos policlonales y monoclonales

La producción anticuerpos policlonales y monoclonales se lleva a cabo de una manera similar a como lo describen p.ej., Harmeyer S. y colaboradores, J Gen Virol, 1998.

5 Expresado brevemente:

En el día 0: Se toman muestras de sangre pre-inmunes antes de la inyección para el examen de anticuerpos anti-LR.

En el día 0: Se inyectan por vía subcutánea 0,5 ml de péptido conjugado suspendido en Adyuvante Completo de Freund (Sigma-Aldrich, N° de catálogo: F-5881).

10 En el día 14: La primera inyección fomentadora de 0,5 ml de péptido conjugado suspendido en Adyuvante Completo de Freund (Sigma-Aldrich, N° de catálogo: F-5506)

En el día 21: La segunda inyección fomentadora de 1,0 ml de péptido conjugado en la ausencia de adyuvante.

15 En el día 31: Se toman muestras de Sangre de Ensayo para el control de los anticuerpos producidos.

Sistema ELISA para la medición de proteínas-marcadoras

20 La tecnología ELISA es especialmente apropiada para la medición de proteínas-marcadoras de BSE. En este caso especial serán separadas las células de la sangre que lleven estas marcadoras sobre la superficie celular.

Procedimiento de separación de las células

25 La subdivisión de sub-clases de leucocitos MN y PMN (células dianas) se conseguirá usando un agotamiento con glóbulos inmuno-magnéticos ((Dynabeads®). Los glóbulos serán revestidos con anticuerpos específicos para tipos de células de leucocitos bovinos.

30 Expresado brevemente:

- Se añaden a la muestra de sangre Dynabeads específicos para células.
- Se capturan inmunitariamente las células dianas.
- Se separan magnéticamente las células dianas.
- Se lavan y concentran células dianas puras.

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Procedimiento para el diagnóstico de encefalopatías espongiformes transmisibles preclínicas o clínicas, caracterizado porque
- a) se extrae una muestra de sangre de un mamífero vivo
- b) se concentran las células a partir de esta muestra de sangre, denominándose a estas células como células dianas
- 10 c) se determina en las células dianas la expresión de una proteína marcadora para encefalopatías espongiformes transmisibles
- d) el resultado obtenido se compara con un valor testigo.
- 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque las células dianas son homogeneizadas.
- 3.- Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque la
- 15 marcadora es la proteína de priones PrP-sen.
- 4.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la proteína marcadora es interferón gamma (IFN γ).
- 5.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la proteína marcadora es interferón gamma (IFN γ) bovino.
- 20 6.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque la proteína marcadora es el receptor de laminina (LR) o el precursor del receptor de laminina (LRP).
- 7.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque la proteína marcadora es el receptor de laminina (LR) bovino o el precursor del
- 25 receptor de laminina (LRP) bovino.
- 8.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque la proteína marcadora se determina con un ensayo inmunitario.
- 9.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque las células dianas se incuban con anticuerpos, que son específicos para la
- 30 proteína marcadora, y se determina el complejo de antígeno y anticuerpo que se ha formado.
- 10.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque se determina por métodos de biología molecular la expresión modificada de la proteína marcadora para encefalopatías espongiformes transmisibles.

- 11.- Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado porque la expresión modificada de la proteína marcadora para encefalopatías espongiformes transmisibles se determina por una reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).
- 5 12.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque el mamífero vivo es una vaca.
- 13.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque las células dianas son leucocitos.
- 14.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado porque las células dianas son leucocitos mononucleares.
- 10 15.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado porque las células dianas son leucocitos polimorfonucleares.
- 16.- Estuche de ensayo para diagnóstico con el fin de detectar encefalopatías espongiformes transmisibles, caracterizado porque contiene todos los elementos necesarios para la detección de la expresión modificada de una proteína marcadora para encefalopatías espongiformes transmisibles por un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 15.
- 15 17.- Estuche de ensayo para diagnóstico según la reivindicación 16, caracterizado porque contiene anticuerpos específicos para una proteína marcadora para encefalopatías espongiformes transmisibles.
- 20 18.- Estuche de ensayo para diagnóstico según la reivindicación 17, caracterizado porque los anticuerpos son policlonales.
- 19.- Estuche de ensayo para diagnóstico según la reivindicación 17, caracterizado porque los anticuerpos son monoclonales.
- 25 20.- Estuche de ensayo para diagnóstico según una de las reivindicaciones 16 a 19, caracterizado porque contiene todos los elementos necesarios para la detección de la expresión modificada de la proteína marcadora PrP-sen por un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 15.
- 21.- Estuche de ensayo para diagnóstico según una de las reivindicaciones 16 a 20, caracterizado porque contiene todos los elementos necesarios para la detección de la expresión modificada de la proteína marcadora IFN γ con un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 15.
- 30 22.- Estuche de ensayo para diagnóstico según la reivindicación 21, caracterizado porque contiene todos los elementos necesarios para la detección de

la expresión modificada de la proteína marcadora IFNy bovino por un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 15.

5 23.- Estuche de ensayo para diagnóstico según una de las reivindicaciones 16 a 22, caracterizado porque contiene todos los elementos necesarios para la detección de la expresión modificada de la proteína marcadora receptor de laminina (LR) o de la proteína marcadora precursor del receptor de laminina (LRP) por un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 15.

10 24.- Estuche de ensayo para diagnóstico según una de las reivindicaciones 16 a 22, caracterizado porque el estuche de ensayo es apropiado para la realización de un ensayo inmunitario *in situ*.

15 25.- Estuche de ensayo para diagnóstico destinado a la detección de encefalopatías espongiformes transmisibles, caracterizado porque contiene oligonucleótidos que son capaces de hibridarse en condiciones rigurosas con el ácido nucleico que codifica una proteína marcadora para encefalopatías espongiformes transmisibles, así como los demás elementos necesarios a fin de realizar un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 15.

20 26.- Estuche de ensayo para diagnóstico según la reivindicación 25, caracterizado porque el estuche de ensayo contiene todos los elementos necesarios para la realización de una reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).

27.- Estuche de ensayo para diagnóstico según la reivindicación 25 ó 26, caracterizado porque la proteína marcadora es PrP-sen.

28.- Estuche de ensayo para diagnóstico según una de las reivindicaciones 25 a 27, caracterizado porque la proteína marcadora es IFNy.

25 29.- Estuche de ensayo para diagnóstico según una de las reivindicaciones 25 a 28, caracterizado porque la proteína marcadora es IFNy bovino.

30 30.- Estuche de ensayo para diagnóstico según una de las reivindicaciones 25 a 29, caracterizado porque la proteína marcadora es el receptor de laminina (LR) o el precursor del receptor de laminina (LRP).

31.- Estuche de ensayo para diagnóstico según una de las reivindicaciones 25 a 30, caracterizado porque la proteína marcadora es el receptor de laminina (LR) bovino o el precursor del receptor de laminina (LRP) bovino.

32.- Utilización de un anticuerpo, que es específico para PrP-sen, en un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 15.

33.- Utilización de un anticuerpo, que es específico para IFN γ , en un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 15.

34.- Utilización de un anticuerpo, que es específico para IFN γ bovino, según una de las reivindicaciones 1 a 15.

5 35.- Utilización de un anticuerpo, que es específico para el receptor de laminina (LR) o el precursor del receptor de laminina (LRP), en un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 15.

10 36.- Utilización de oligonucleótidos, que son capaces de hibridarse en condiciones rigurosas con el ácido nucleico que codifica la PrP-sen, en un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 15.

37.- Utilización de oligonucleótidos, que son capaces de hibridarse en condiciones rigurosas con el ácido nucleico que codifica el IFN γ , en un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 15.

15 38.- Utilización de oligonucleótidos, que son capaces de hibridarse en condiciones rigurosas con el ácido nucleico que codifica el IFN γ bovino, en un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 15.

20 39.- Utilización de oligonucleótidos, que son capaces de hibridarse en condiciones rigurosas con el ácido nucleico que codifica el receptor de laminina (LR) o el precursor del receptor de laminina (LRP), en un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 15.

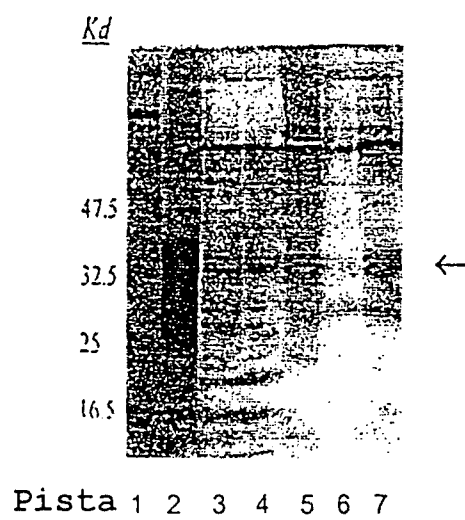
25 40.- La utilización del estuche de ensayo para detectar encefalopatías espongiformes transmisibles según una de las reivindicaciones 16 a 39 para diagnosticar encefalopatías espongiformes humanas y animales o para medidas de control epidemiológico de BSE o rascazón endémica.

RESUMEN

El invento se refiere a un procedimiento para el diagnóstico preclínico y clínico de encefalopatías espongiformes transmisibles, caracterizado porque se determina la expresión modificada de una proteína marcadora. En formas de realización particulares, en el procedimiento conforme al invento la proteína marcadora medida es la proteína de priones PrP-sen o interferón gamma (IFNy) o el receptor de laminina (LR) o el precursor del receptor de laminina (LRP). El invento se refiere también a un estuche de ensayo con utilización de anticuerpos que son específicos para la proteína marcadora conforme al invento. El invento se refiere además a un estuche de ensayo con utilización de oligonucleótidos que son capaces de hibridarse en condiciones rigurosas con el ácido nucleico que codifica la proteína marcadora conforme al invento. El invento se refiere además a la utilización de anticuerpos u oligonucleótidos, que son específicos para las proteínas marcadoras antes mencionadas, en un procedimiento conforme al invento. El invento se refiere además a la utilización del estuche de ensayo para el diagnóstico de encefalopatías espongiformes transmisibles.

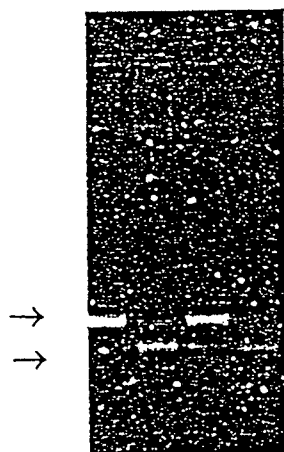
Figuras

Figura 1



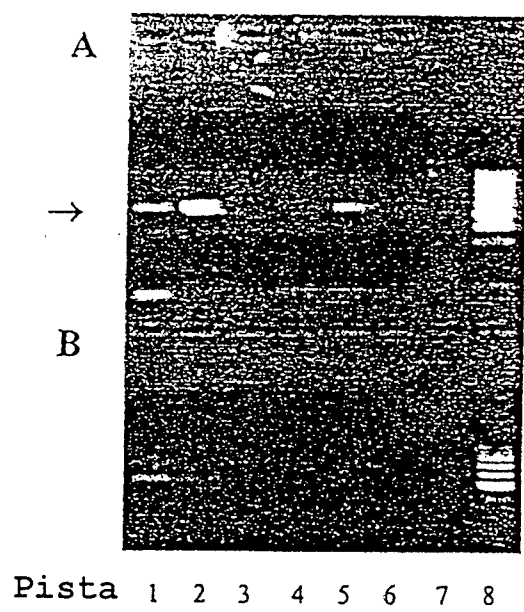
- 31 -

Figura 2



Pista 1 2 3 4

Figura 3



34

CAVELIER
ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4ª N° 72-35
BOGOTÁ, S. COLOMBIA

REPRESENTACION Y PODER	VERTRETUNG UND VOLLMACHT	448 056
------------------------	--------------------------	------------

ICH (wir) Unterzeichnende (r) / Yo (nosotros), abajo firmado (s)
BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH

wohnhaft in / domiciliado (s) en D-55216 Ingelheim am Rhein
Federal Republic of Germany

por el presente nombramos a GERMAN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO, tpa. 31929; y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1º del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos;

Für Patente, Modelle, Muster, Warenzeichen, Dienstleistungsmarken, Handelsnamen u. Embleme.

Para patentes, modelos y dibujos; marcas de fábrica y de servicios; nombres comerciales y enseñas.

ernenne(n) hiermit in Übereinstimmung mit Abs. 1 de Artikels 543 des Handelsgesetzbuches GERMAN CAVELIER (Rechtsanwaltsausweis Nr. 832), GONZALO PERDOMO (Rechtsanwaltsausweis Nr. 831), EMILIO FERRERO (Rechtsanwaltsausweis Nr. 31929) und LUZ CLEMENCIA DE PAEZ (Rechtsanwaltsausweis Nr. 23555), mit Geschäftssitz in Bogotá/Kolumbien, Carrera 4ª N° 72-35 zu meinen (unseren) Prozeßbevollmächtigten (Germán CAVELIER zur Hauptbevollmächtigten, die anderen - in der genannten Reihenfolge - zu seinen Stellvertretern) in allen Angelegenheiten, die das Gewerbliche Eigentum betreffen. Sie sind befugt, Zustellungen entgegenzunehmen und Prozeßbevollmächtigten und außergerichtliche Bevollmächtigte zu ernennen. Der erste Stellvertreter hat Herrn GERMAN CAVELIER bei dessen Abwesenheit oder im Falle einer vorübergehenden oder endgültigen Verhinderung zu vertreten. Dasselbe gilt, wenn der zweite Stellvertreter der ersten, oder aber der dritte den zweiten, zu vertreten hat. In diesen Fällen wird der Hauptvertreter, oder gegebenenfalls der erste oder zweite Stellvertreter, oder beide, in Form einer durch einen Notar (in Kolumbien) oder durch einen Notar oder sonstigen öffentlichen Beamten oder Konsul von Kolumbien (im Ausland) beglaubigten Erklärung seine Absicht, die Vertretung nicht auszuüben, zum Ausdruck bringen. Sollte eine Verhinderung der Grund dafür sein, ist die entsprechende Bescheinigung beizufügen. Sollte einer der Ernannten endgültig ausscheiden, nimmt der Nachfolgende seine Stelle ein. Bei Beendigung der Abwesenheit oder Verhinderung des Hauptvertreters oder seines ersten oder zweiten Stellvertreters, können GERMAN CAVELIER oder aber - je nach Fall die entsprechenden Stellvertreter, die Vertretung ohne weiteres wieder übernehmen und die jeweilige Stellvertretung gilt als aufgehoben.

Außerdem erteile ich (erteilen wir) den oben genannten Rechtsanwälten die Vollmacht, den Schutz meines (unseres) Gewerblichen Eigentums und bei Unlauterem Wettbewerb zu erlangen. Zu diesem Zweck ermächtigen wir die genannten Bevollmächtigten zur Vertretung vor sämtlichen Stellen oder Personen, gleichgültig, ob diese die entsprechende Gewalt ausüben oder nicht, vor allen Verwaltungsbehörden, vor der Verwaltungsgerichtsbarkeit und Gerichten, als auch vor den Schiedsgerichten und zwar in allen Fällen, die sich auf folgende Angelegenheiten beziehen: Erteilung von Patenten für Erfindungen, Gebrauchsmuster, Industriezeichnungen, die Eintragung von Warenzeichen, Verbandszeichen, Defensivmarken, Dienstleistungsmarken, Werbeslogans, Handelsnamen und Emblemen, Gemüsearten und

14 ABR 2008
NOTARIO
JUAN MANUEL BOTERO MEDINA

A la vuelta → Weiter →

acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

Herkunftsbezeichnungen, ihre Erneuerung, Übertragung, Änderung des Namens oder des Geschäftssitzes, der freiwilligen Verzicht und die Eintragung von Nutzungslizenzen für diese Rechte; b) Klagen wegen Unlauterem Wettbewerb, Verbraucherschutz, Widersprüchen und Einsprüchen, verwaltungsrechtlicher und gerichtlicher Löschung, Nichtigkeit, einstweiligen Verfügungen Konzessionen Lizenzen, der "tutela" und allgemein für zivil-, straf-, verwaltungsrechtlichen und verwaltungsgerichtlichen Prozessen, die mit diesen Rechten in Verbindung stehen und die wir betreiben oder die gegen uns anhängig gemacht werden. Wir ermächtigen sie ebenfalls dazu, in allen oben genannten Angelegenheiten einen Unterbeauftragten einzusetzen, Vergleiche abzuschließen, zu schlichten, Prozeßsachverhalte anzuerkennen, zurückzutreten, zu quittieren, in Empfang zu nehmen, Verzicht zu erklären und die Rechtsgeschäfte nicht bevollmächtigter Personen zu genehmigen.

Geschehen und unterzeichnet am/Dado y firmado hoy August 2, 1996

Ingelheim am Rhein

in/en

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH

ppa.

Unterschrift

Firma

Reinhold Fleschhut

Dr. Dieter Laudien

Managing Director

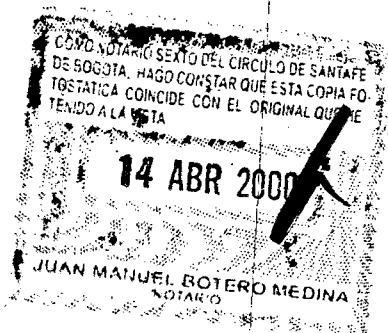
Director of Corporate Patent Department

LEGALIZACION

BEGLAUBIGUNG

Es necesaria la legalización con certificado consular sobre la existencia legal de la compañía, que éste ejerce su objeto social y que la persona que otorga el poder está autorizada para ello. A este efecto les solicitamos que muestren al Cónsul las pruebas que acreditan estos hechos.

Es wird eine Beglaubigung und eine Konsularbescheinigung darüber benötigt, daß die Gesellschaft rechtlich besteht, daß sie ihren Gesellschaftszweck erfüllt und daß die Person, die die Vollmacht erteilt, dazu rechtlich befugt ist. Zu diesem Zweck bitten wir Sie höflich, dem Konsul die entsprechenden Nachweise vorlegen zu wollen.



NOTA PARA EL SEÑOR CONSUL DE COLOMBIA: Según los artículos 65 del C. de P.C. y 480 del C. de Co., si el poderdante es una sociedad, el Señor Cónsul debe certificar que tuvo a la vista las pruebas de su existencia, que ejerce su objeto social y que quien confiere el poder es su representante.

Umseitige, vor mir gefertigte Namensunterschriften von:

1. Herrn (Dr.) Reinhold F l e s c h h u t, Dipl.-Chemiker, wohnhaft
in 55218 Ingelheim, Am Mühlborn 16,
2. Herrn Dr. Dieter L a u d i e n, Dipl.-Chemiker, wohnhaft in
55127 Mainz, Carl-Orff-Straße 11,

- mir vorgestellt durch die Sekretärin Frau Ingrid May, dienstansässig bei der Firma
Boehringer Ingelheim GmbH, die sich durch Vorlage ihres Führerscheines ausgewie-
sen hat -

beglaubige ich hiermit.

Aufgrund meiner heutigen Einsicht in das Handelsregister des Amtsgerichts
Bingen bescheinige ich hiermit:

Die Firma Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH mit Sitz in Ingelheim am Rhein
wurde am 12. Juni 1978 im Handelsregister unter HR B 1491 eingetragen und die
Herren (Dr.) Reinhold Fleschhut und Dr. Dieter Laudien sind gemeinsam zur Vertre-
tung der Gesellschaft berechtigt.

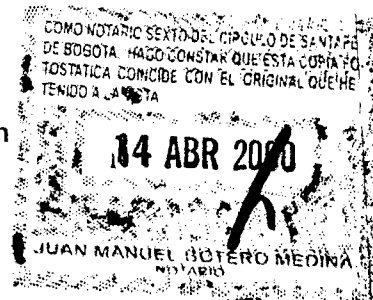
Weiter bescheinige ich, daß die Gesellschaft ihren Sitz in Ingelheim am Rhein hat.

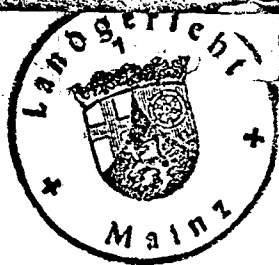
Gegenstand des Unternehmens ist die Entwicklung, die Herstellung und der Ver-
trieb von veterinärmedizinischen Präparaten und anderen Produkten zur Gesunder-
haltung von Tieren.

Ingelheim am Rhein, den 02. August 1996/hün



Notarassessor als amtlich bestellter Vertreter
des Notarassessors Dr. Peter Wirth als amtlich
bestelltem Notariatsverweser anstelle von
Notar Justizrat Prof. Weirich in Ingelheim





36

- 910 E 1 -

Die Echtheit vorstehender Unterschrift des Notarassessors Dr. Scholl als amtlich bestellter Vertreter des Notarassessors Dr. Peter Wirth - Notariatsverweser anstelle des Notars Prof. Dr. Weirich in Ingelheim und die Echtheit des beigedruckten Dienst-stempels-siegels werden hierdurch bestätigt. Zugleich wird bescheinigt, daß der Vorgenannte zur Vornahme der Amtshandlung gesetzlich befugt war.

Kostenberechnung:

Gebühr für Legalisation

(Wert: DM *1000,-*)

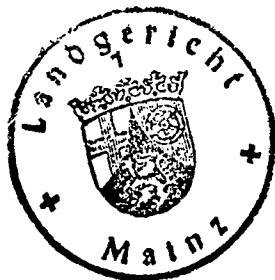
JVKostO. v. 26.7.1957

BGBI. I S. 861

DM *ab-*

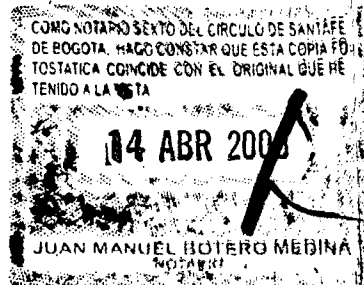
Mainz, den *8. AUG.* 1996

Amtsinspektor



Mainz, den neunten August neunzehnhundertsechszundneunzig
Der Präsident des Landgerichts

Dr. Hanns Paul Tüttenberg
(Dr. Hanns Paul Tüttenberg)



COLOMBIA
Nº 72-35
SOL
TER



CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA

MUNICH

Nr. 131

El sucrito Cónsul General de Colombia

CERTIFICA:

Que el señor(a) **Dr. HAS PAUL TÜTTENBERG**, quién autetica la firma del signatario en el presente documento, ejercía en la fecha allí indicada las funciones de Presidente del Tribunal Regional de Mainz.-----

Que la firma **BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH** está registrada en el Registro Mercantil del Juzgado Municipal 653 de Bingen / Rhein, bajo el **número HR B 1491** y que está constituida y ejerce su objeto social de conformidad con las Leyes de la República de Alemania.-----

Que el señor **Dr. DIETER LAUDIN** y el Señor **REINHOLD FLESCHHUT**, quién(es) firma(n) el presente documento tiene(n) facultad legal y suficiente para representar a la mencionada firma y otorgar poderes en su nombre.-----

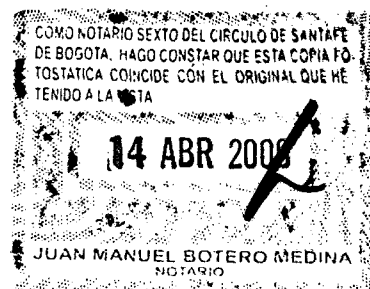
Que ha tenido a la vista la documentación que prueba lo anterior. -----

Munich, a 23 de agosto de 1996


RICARDO MOSQUERA MESA
Cónsul General de Colombia

Derechos para la Nación	US \$ 6.-
Fondo Rotatorio	US \$ 100.-
Tasa Consular	US \$ 1,00 = DM 1.60 = DM 169.60

PAGADO



BOEHNDINGER INGELHEIM VET MEDICA
G.R.B.H.

COLO 04484-801-004-5



NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD POR EL TEXTO

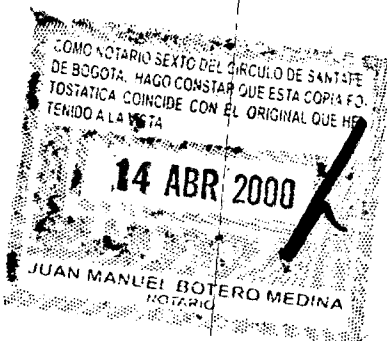
1996 SET - 1997 FEB 21

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

[Signature]
205408

[Signature]
CUYA FIRMA MANEJA
DOCUMENTO DESEMPEÑAR
LAS FUNCIONES INDICADAS



CUYA FIRMA MANEJA
DOCUMENTO DESEMPEÑAR
LAS FUNCIONES INDICADAS

MINISTERIO
RELACIONES
EXTERIORES

LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA

1-5 FEB 1997

ASISTENTE
AL SEÑOR DEL TEXTO

TRADUCCION OFICIAL No. 5446

de un documento escrito en Alemán, el cual para su identificación se sella con el sello de la traductora, lo mismo que la presente.-

(A continuación de la representación y el poder conferido a GERMAN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO tpa, 31929; y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa 23555; domiciliados en la Carrera 4 No. 72-35, Bogotá, Colombia, por la BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH, domiciliada en D-55216 Ingelheim am Rhein, RFA, a través de sus representantes los Srs. Reinhold Fleschhut y Dr. Dieter Laudien:)

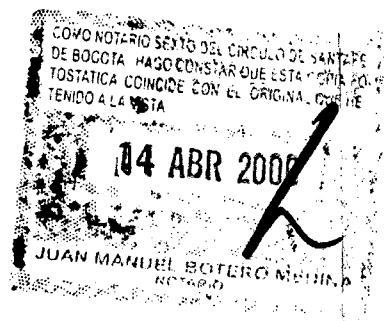
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
TRADUCTORA OFICIAL
Resolución No. 509 Minjustia

Legalización

Protocolo notarial No. 1656/96 V

Certifico la autenticidad de las firmas antecedentes puestas ante mí por los señores:

1. Reinhold F l e s c h h u t, Dipl.Chem. domiciliado en 55218 Ingelheim, Am Mühlborn 16,
2. Dr. Dieter Laudien, Dipl. Chim., domiciliado en 55127 Mainz, Carl-Orff-Straße 11,



-presentados por la secretaria señora Ingrid May, con domicilio comercial en la Boehringer Ingelheim GmbH, quien a su vez se identificó con su licencia de conducción-.

Igualmente certifico, por haber examinado en la fecha el Registro de Comercio del Juzgado Municipal de Bingen:

Que la firma Boehringer Vetmedica Ingelheim GmbH, domiciliada en Ingelheim am Rhein, fue inscrita bajo el No. HR B 1491 el 12 de junio de 1978 en el Registro de Comercio del Juzgado Municipal de Bingen y que los señores Reinhold Fleschhut y Dr. Dieter Laudien, están facultados para representar conjuntamente a la sociedad. Además certifico que el domicilio de la sociedad es Ingelheim am Rhein.

El objeto social es el desarrollo, producción y venta de preparados médico-veterinarios y otros productos para la salud animal.

Ingelheim am Rhein, 2 de agosto de 1996/hün

Fdo.: firma ilegible

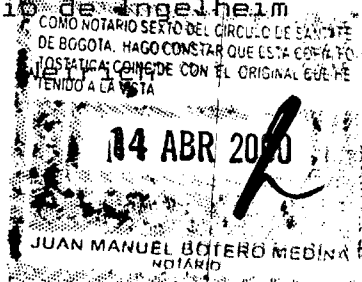
(Hilo y oblea roja en relieve:)

El notario suplente

El notario suplente - Ingelheim

del notario de Ingelheim

Prof. Dr.



COPIA
FOTOSTATICA
No. 509
Inclusión

VO

(dos sellos redondos en tinta del Tribunal Regional de Mainz y en
hojita adjunta)

910 E 1

Se certifica la autenticidad de la firma antecedente del Dr.
Scholl como notari suplente del Dr. Peter Wirth, notario suplente
del Prof. Dr. Weirich, notario de Ingelheim, y la del sello
oficial que la acompaña. Igualmente se certifica que el
mencionado notario estaba facultado para realizar ese acto
oficial.

Mainz, nueve de agosto de mil novecientos
noventa y seis

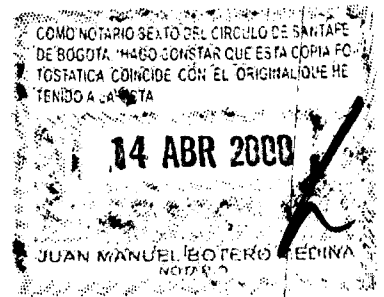
El Presidente del Tribunal Regional

(E) Fdo.: firma ilegible

(Dr. Hanns Paul Tüttenberg)

Costas

Derechos de legalización
(Valor:DM 5.000,-)
JVKostD del 26 de julio 1957
Gacetas Oficial I Pag. 861
DM 20,--
Mainz, 13 de diciembre de 1995
Fdo.: firma ilegible
Inspector



41

EN ESPAÑOL: La legalización de las firmas antecedentes por el Consulado de Colombia en Munich (Certificación) bajo el No. 131 del 23 de agosto de 1996, y por el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia bajo el No. 205408 del 6 de septiembre de 1996.

Pagados derechos y Fondo Rotatorio US\$ 106,--

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, de la cual se deja copia en los archivos de estas oficinas para su confrontación.

Santafé de Bogotá, 10 de septiembre de 1996.

LUZ ARRIBAGA DE HEREDIA

TRADUCCION E INTERPRETE OFICIAL

Resolución No. 599 Ministerio

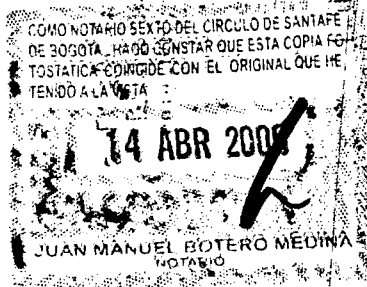
COMO NOTARIO SEXTO DE SANTAFE DE BOGOTA
HAGO CONSTAR QUE LA FIRMA DE _____

C. C. _____

COINCIDE CON LA REGISTRADA POR EL (ELLQS)
EN ESTA NOTARIA..

16 SET. 1996

SANTAFE DE BOGOTA, D.C.



Trabajos de limpieza y mantenimiento de la US# 101

0001/56 endosique et 01, et 02 et 03

44b SET 133A 11:32

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

HAGO CONSTAR QUE LA FIRMA DE
COMO NOTARIO SEXTO DE SANITATE DE BOGOTA

COPIA DE LA NOTICIA
COMUNICADA POR EL
MINISTERIO DE LA SALUD

4997 130 000

STATE OF TEXAS

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

La3 D2W D6A

28896

7 3 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100

CUYA FIRMA APARECE EN
DOCUMENTO DESENGAÑADO
LAS FUNCIONES DE LA

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE ESTA COPIA FO
TOSTATICA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE
TENIDO A LA VISTA

14 ABR 2000

GEL ROTERO MEDINA
NOTARIO

42

CAVELIER

ABOGADOS

TELEFAX: (57) (1) 2358850

CABLES CAVELEYES

TELEX: 45479

EDIFICIO SISKI

CARRERA 4ª, No. 72-35

BOGOTÁ 8, COLOMBIA

CORREO ELECTRONICO MUNDIAL: CAVE

TELEFONO: (57) (1) 2120100

Señor Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

Poderdante: BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH

Poder conferido el: 02-08-96

Yo, GERMAN CAVELIER, obrando en mi calidad de apoderado principal del poderdante arriba mencionado, atentamente manifiesto a Usted que sustituyo el poder que me ha sido conferido en la persona del doctor EMILIO FERRERO, Abogado con Tarjeta Profesional No. 31.929, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil ya que los otros sustitutos faltan en este momento.

Señor Jefe,



GERMAN CAVELIER

T.P.A. No. 832

C.C. No. 2.877.924 de Bogotá

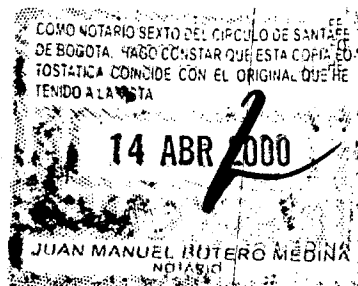
Acepto:



EMILIO FERRERO

T.P.A. No. 31.929

C.C. No. 438.019 de Usaquén



NOTARIA SEXTA DE BOGOTÁ
RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL

Santafé de Bogotá D. C.

08 SET 1999

Ante Mí JUAN MANUEL BOTERO MEDINA

NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE BOGOTÁ

Comparecieron personalmente,

[Signature]

[Signature]

quien(es) exhibió(eron) la(s) C. C.

438019

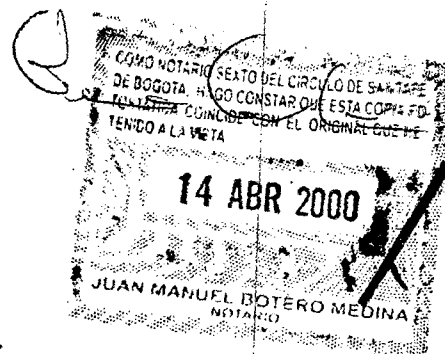
y la(s) Libreta(s) Militar(es):

2877924

77652

7721924

d. (la(s)) en Bogotá, y declaró(aron) que la(s) firma(s) que
aparece(n) en el presente documento es(son) la(s) suya(s) y que
el contenido del mismo es cierto.
En consecuencia se firma esta diligencia..



[Signature]



**EXTRACTO PARA PUBLICACION
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION**

(21) No.SOLICITUD: (51) INT.CL.: A61B 019/000
(22) FECHA DE PRESENTACIÓN: (71) SOLICITANTE:
BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH
(30) PRIORIDAD: SI
(31) No.DE SOLICITUD: 199 18 141.1 (72) INVENTOR(ES):
1- Dr. Mark Stephen ROGERS
2- Dr. Matthias GIESE
(32) FECHA DE PRESENTACIÓN: 21 -IV- 1999
(33) PAÍS: DE.. (74). APODERADO: EMILIO FERRERO

(54) TÍTULO: **PROCEDIMIENTO PARA EL DIAGNOSTICO DE
ENCEFALOPATIAS ESPONGIFORMES TRANSMISIBLES**

REIVINDICACION:

(57) RESUMEN:

1. Procedimiento para el diagnóstico de encefalopatías espongiformes transmisibles preclínicas o clínicas, caracterizado porque
 - a) se extrae una muestra de sangre de un mamífero vivo.
 - b) se concentran las células a partir de esta muestra de sangre, denominándose a estas células como células dianas.
 - c) se determina en las células dianas la expresión de una proteína marcadora para encefalopatías espongiformes transmisibles.
 - d) el resultado obtenido se compara con un valor testigo.

NOTA: favor no publicar antes de los 18 meses a partir de la fecha de presentación de la solicitud.



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

NIT : 800176089-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 00029093 00000000 Folios: 46
Fecha (AMD): 2000-04-19 16:27:32
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 19,976
FECHA : MARZO 27 DE 2000

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	SUCURSAL	CUENTA	No. PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	BOGOTA	050-00024-9	960458	19,103,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	608,000.00
		TOTAL :	\$ 608,000.00

SON: SEISCIENTOS OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE :



RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Colo 00176089-001-0060

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5 y 10
Conmutador: 334 12 21
Fax: 281 31 25
Santa Fe de Bogotá, D.C., Colombia

REQUISITOS MINIMOS PARA ADM

Radicacion : 00029093 00000000 Folios: 46
Fecha (AMD): 2000-04-19 16:27:32
Trabite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAD
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION [☒]

MODELO DE UTILIDAD [☐]

- Nombre e identificación del Solicitante
- Nombre e identificación del Inventor
- Título o nombre de la Invención
- Descripción
- Reivindicaciones
- Resumen
- Comprobante de Pago

[☐]

[☐]

[☐]

[☐]

[☐]

[☐]

[☐]

COMPLETA [☒]

INCOMPLETA [☐]

DISEÑO INDUSTRIAL [☐]

- Nombre e identificación del peticionario
- Nombre e identificación del inventor o diseñador
- Indicación del género de productos para los cuales debe utilizarse
- Representación gráfica
- Comprobante de pago

[☐]

[☐]

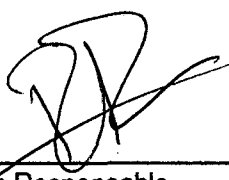
[☐]

[☐]

[☐]

COMPLETA [☐]

INCOMPLETA [☐]


Firma Responsable

Fecha: _____

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
PRIMER EXAMEN DE FORMA

430
2000-04-24

EXPEDIENTE 00-029093

Practicado el examen jurídico de acuerdo con lo establecido en el art. 21 de la Decisión 344 se determinó que esta solicitud de **Patente de Invención**:

- SI** ☒ **NO** ☐ **NO APLICABLE** ☐ Presentó los poderes necesarios en forma correcta (Decisión 344, art. 14-a).
- SI** ☒ **NO** ☐ **NO APLICABLE** ☐ Acreditó, en forma correcta, la existencia y representación de la persona jurídica solicitante (art. 14-c de la Decisión 344; literal g) del art. 4 del Decreto 117/94).
- SI** ☒ **NO** ☐ **NO APLICABLE** ☐ Presentó, en forma correcta el comprobante de pago por la tasa de presentación establecida (art. 13-f de la Decisión 344 y la Resolución 02 del 4 de enero del 2000).
- SI** ☒ **NO** ☐ **EXTEMPORANEAMENTE** ☐ Reivindicó prioridad, dentro del plazo y de acuerdo con lo previsto en el Artículo 4 del Convenio de París.
- SI** ☐ **NO** ☒ **NO APLICABLE** ☐ Presentó copia, certificada su conformidad por la Administración que recibió la solicitud de la cual reivindica prioridad, al momento de radicar la solicitud nacional.
- SI** ☐ **NO** ☒ **NO APLICABLE** ☐ Presentó la traducción del capítulo reivindicatorio de la solicitud de la cual se reivindica prioridad (Art. 4, D-3 Convenio de París; Concepto: 5 de enero de 1999 S.I.C.).
- SI** ☐ **NO** ☒ **CUMPLE LOS REQUISITOS JURIDICOS**

OBSERVACIONES JURIDICAS CONVENIO DE PARIS: En todo caso, deberá presentar copia certificada su conformidad por la Administración que recibió la solicitud de la cual reivindica prioridad, **en cualquier momento dentro del plazo de tres (3) meses**, contados a partir de la fecha de depósito de la solicitud posterior. La omisión de esta formalidad implicará la pérdida del derecho de prioridad.

En consecuencia, se conceptúa que esta solicitud:

- SI** ☐ **NO** ☒ Se ajusta a los aspectos **FORMALES** indicados en la Decisión 344 y por tanto,
- SI** ☐ **NO** ☒ Se recomienda **PUBLICAR** el extracto correspondiente.

Santafé de Bogotá, D.C., 24 de abril del 2000.


EXAMINADOR JURIDICO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Primer EXAMEN DE FORMA

Folio 47.

2000-⁴³⁰08-31

Radicación no 00-29093.

Concepto Técnico no 1418. Clasificación Internacional de Patentes G01N 33/53, C12Q 1/68,
AKK 49/00.

Practicado el examen de acuerdo a lo establecido en el Art. 21 de la Decisión 344 se determinó que esta solicitud de **Patente de Invención**:

- | | |
|--|--|
| SI ☒ NO ☐ | Contiene la identificación correcta del inventor (Art.8, Art.13-a). |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene la identificación correcta del solicitante (Artículo 13-a). |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene el resumen con el objeto y finalidad de la invención en forma correcta (Art.13-e). |
| SI ☐ NO ☒ | Contiene el título o nombre de la invención en forma correcta (Art.13-b). |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene la descripción clara y completa de la invención (Art.13-c). |
| SI ☐ NO ☒ | Contiene los dibujos correctos (Art.14-c junto con el literal d) del Art. 4 del Dto. 117 del 94). |
| SI ☐ NO ☒ | Contiene las unidades de medida en el sistema exigido (Art.14-c junto con el Decreto 3464 del 26 de diciembre de 1980). |
| SI ☐ NO ☒ | Contiene una o más reivindicaciones, en forma correcta, que precisen la materia para la cual se solicita la protección mediante la patente (Art.13-d). |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene el extracto de acuerdo con el literal c) del artículo 4 del Dto. 117 /94. |
| SI ☐ NO ☐ | Contiene el arte final del dibujo característico de acuerdo con el literal c) del artículo 4 y el artículo 27 del Dto. 117 /94. |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene la tarjeta del Archivo Temático [formato P-104] en forma correcta (Art.14-c junto con el literal b) del artículo 4 del Dto. 117 /94). |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene la tarjeta del Archivo de Propietarios [formato P-105] en forma correcta (Art.14-c junto con el literal b) del artículo 4 del Dto. 117 /94). |
| SI ☐ NO ☒ | CUMPLE LOS REQUISITOS TÉCNICOS |

OBSERVACIONES Y OTROS: SI ☒ NO ☐ ver hoja(s) anexa(s)

Santa Fe de Bogotá, D.C., 31 de Agosto de 2000

202016
EXAMINADOR TÉCNICO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
PRIMER EXAMEN DE FORMA

CONCEPTO TÉCNICO: 1418
EXPEDIENTE: 00029093
IPC: G01N 33/53, C12Q 1/68, A61K 49/00

Realizado el Primer Examen de Forma se hace la siguiente observación:

1. El título de la invención hace referencia a "Procedimiento..." Teniendo en cuenta que las reivindicaciones se refieren a un estuche de diagnóstico, se recomienda modificar el título de manera que se mencionen tanto el procedimiento como el estuche.
2. Las figuras 1 a 14 descritas en los Folios 48-50 no están presentes en la solicitud por lo cual deben ser anexadas. Sin ellas la descripción no está completa y no es clara.
3. Las unidades g significa gramos en el Sistema Internacional de Unidades, así que no es posible emplear esta sigla para expresar la frecuencia de rotación que es la magnitud que aquí nos concierne. Sírvase hacer las correspondientes conversiones y cambiar el valor de las cantidades expresadas en gravedades (g) por revoluciones por minuto, rpm.
4. Las figuras contenidas en los folios 31 a 33 no son lo suficientemente nítidas para permitir una buena copia a través de Offset o Scanner. Sírvase presentar una nueva copia que tenga mejor resolución.
5. La reivindicación 16 no es clara puesto que ella se refiere a un estuche de ensayo para diagnóstico definido en función de un procedimiento, en lugar de precisar los compuestos o composiciones que lo conforman ó caracterizan. En pro de establecer exactamente el objeto de la invención se requiere que se modifique esta reivindicación para que en ella se indique que el estuche... se caracteriza por comprender ... tales elementos.
6. Las reivindicaciones 17 a 19 no son claras. Lo anterior se afirma con base en el hecho de que el estuche es caracterizado por un compuesto que no ha sido definido exactamente puesto que los anticuerpos a los que se refieren estas reivindicaciones no han sido precisados. Decir que el estuche para diagnóstico de encefalopatías espongiformes transmisibles preclínicas o clínicas se caracteriza por contener anticuerpos específicos para una proteína (no definida) marcadora para encefalopatías espongiformes transmisibles no permite establecer ni de que proteína marcadora se está hablando, ni que anticuerpo es el que se enlaza a dicha proteína y menos saber cual es el estuche para diagnóstico que comprende dicho anticuerpo. Por consiguiente se requiere mencione que la proteína marcadora es...
7. Las reivindicaciones 20 a 23 y 26 y por ende las reivindicaciones 27 a 31 no son claras puesto que en ellas se dice que "se caracteriza porque contiene todos los elementos necesarios para la detección de una proteína marcadora determinada" y esta no es suficiente información para saber exactamente cual es el objeto sobre el cual se reclama protección. Sírvase definir el objeto de manera precisa, es decir, mediante la mención exacta de los elementos que constituyen el estuche y no mediante la indicación del objetivo que se logra mediante el empleo en conjunto de dichos elementos.
8. La reivindicación 25 no es clara puesto que los oligonucleótidos que caracterizan el estuche no han sido definidos. Decir que dichos nucleótido son capaces de hibridarse en condiciones rigurosas con el ácido nucleico que codifica una proteína marcadora para encefalopatías espongiformes transmisibles no es suficiente información para establecer cual es el estuche para

49
51

el cual se solicita protección. Sírvase indicar de manera exacta cuáles son los oligonucleótidos que caracterizan el estuche reivindicado.

9. En consecuencia a lo anterior, sírvase presentar nueva tarjeta temática, nueva tarjeta para el archivo de propietarios y nuevo extracto de publicación.

Santa Fe de Bogotá,

/202016

52
430
2000-09-07

EXPEDIENTE 00-029093

AUTO 1149

LA JEFE DE LA DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

DISPONE

ARTICULO PRIMERO: Reconocer personería al doctor Emilio Ferrero, como apoderado del solicitante, en los términos y para los efectos del poder conferido

ARTICULO SEGUNDO: Conforme lo establece el artículo 22 de la Decisión 344 de la Comisión del Acuerdo de Cartagena, requiérese al solicitante, para que dentro del plazo de treinta (30) días hábiles siguientes a la fecha de notificación del auto, presente respuesta a las observaciones o complemente los antecedentes señalados en el examen de forma.

ARTICULO TERCERO: Notificar por estado el presente auto, advirtiéndole que contra el no procede recurso alguno en la vía gubernativa.

NOTIFIQUESE Y CUMPLASE

05 SEP 2000

Dado en Santafé de Bogotá D.C., a los _____

LA JEFE DE LA DIVISION DE NUEVAS CREACIONES,

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL

NOTIFICADO POR ESTADO

Santafé de Bogotá D.C., **07 SET. 2000** notificado por anotación en estado de esta misma fecha.

VENCIMIENTO NOTIFICACION ESTADO

SOLICITO PRORROGA TERMINO SI _____ NO _____

VENCIMIENTO TERMINO PRORROGA