

52 65

CAVELIER
ABOGADOS

WEB SITE: www.caveller-abogados.com
E-MAIL: caveller@colomsat.net.co

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTÁ 8, COLOMBIA

TELÉFONO: (57) (1) 347-3611
TELÉFAX: (57) (1) 217-9211 (57) (1) 310-4995

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

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 00091439 00000003 Folios: 29
Fecha (CMD): 2001-05-15 17:11:37
Trámite : 002 PATENTES y 1 REGISTRO/ 444 REPUESTA
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Referencia : Expediente No.00.091.439

Solicitante : BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH

Asunto : Solicitud de patente para: "VIRUS ATENUADOS E INOCUOS DE LA DIARREA VÍRICA BOVINA PARA USO EN VACAS GESTANTES".

Fecha de la solicitud : 29 de noviembre de 2000

TRAMITE:002 - EVENTO:001 - ACTUACION:444

1. Yo, Emilio FERRERO, obrando como apoderado del solicitante en el asunto antes identificado, me refiero al oficio número 0302, notificado por fijación en lista de fecha de 15 de febrero de 2001.

Para atender a la providencia anterior solicité un plazo por medio de mi memorial número 00.091.439 00000002 radicado el 10 de abril de 2001.

2. Mediante el oficio número 0302 se puso en conocimiento del solicitante el informe que contiene las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente. Atiendo a las observaciones de la manera siguiente:

2.1. Descripción: Se presenta un nuevo capítulo descriptivo como lo sugiere ese Despacho.

2.2. Documento de cesión de inventores. Presento junto con este escrito el documento en que consta la cesión del derecho a la patente otorgado por el inventor al solicitante, junto con su respectiva traducción. Me permito informarle que la dirección correcta del inventor Dr. Knut ELBERS es Caprino-Veronese-Str.4a,55435 Gau-Algesheim, Alemania.

Adicionalmente presente nuevo petitorio en donde aparece la correcta dirección del inventor.

2.3. Dirección del solicitante. Me permito informarle que la dirección del solicitante es:

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH

Binger Strasse 173

D-55216 Ingelheim am Rhein

Alemania

2.4. Recibos. presento junto este escrito, el recibo por 73,440 pesos por concepto de modificaciones en solicitud pendiente.

3. Puesto que se han atendido a cabalidad las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente, atentamente solicito que se continúe su tramitación.

Bogotá, 15 MAYO 2001

Señora Jefe,



EMILIO FERRERO

T.P.A. No. 31.929

COLO 04484-801-007-8

ASNASN-69

para uso en vacas gestantes

Campo de la invención

La presente invención se refiere al uso de virus de la diarrea vírica bovina, BVD (del inglés Bovine Viral Diarrhea) vivos y específicamente atenuados para la preparación de una vacuna para uso en la prevención y/o el tratamiento de infecciones por virus de la diarrea vírica bovina, BVDV (del inglés, Bovine Viral Diarrhea Virus) en ganado vacuno reproductor, vacas gestantes y para la protección fetal en vacas gestantes.

La invención también se refiere a un método de tratamiento y/o prevención de infecciones BVDV en el grupo referido anteriormente de ganado vacuno.

Antecedentes de la invención

El virus de la diarrea vírica bovina (BVDV) es el agente causante de BVD y de la enfermedad de las mucosas en el ganado vacuno (Baker, 1987; Moennig y Plageman, 1992; Thiel y col., 1996). La infección fetal durante la gestación puede dar como resultado la resorción del feto, abortos así como el nacimiento de terneros inmunotolerantes que se infectan pertinazmente con BVDV. Estos terneros carecen de títulos de anticuerpos neutralizantes o los tienen en muy bajo nivel y están esparciendo continuamente altas cantidades de virus. Junto con los toros con infección aguda o pertinaz, estos terneros son la principal fuente para la propagación del virus y, por lo tanto, tienen una importancia fundamental en la epidemiología de esta enfermedad. El principal impacto económico de la BVD procede del alto porcentaje de abortos y elevado índice de mortinatalidad, resorción fetal, momificación, malformaciones congénitas y nacimiento de terneros débiles y con un peso inferior al normal. Para un análisis detallado de la patogénesis se hace aquí referencia al artículo de Moennig y Liess de 1995 en toda su extensión.

Se han descrito dos grupos antigénicos principales de BVDV (tipo I y II) (Becher y col., 1999) que exhiben reacciones cruzadas limitadas con anticuerpos neutralizantes (Ridpath y col., 1994).

BVDV y otros pestivirus tienen en común su capacidad para atravesar la

58
55

placenta de los animales hospedantes en estado de gestación. Las actuales vacunas BVDV vivas atenuadas también atraviesan la placenta de las novillas seronegativas y dan como resultado síntomas clínicos de las infecciones BVDV de tipo silvestre (véase Moennig y Liess, Orban y col., 1983; Liess y col., 1984).

- 5 Las actuales vacunas para la prevención y el tratamiento de infecciones BVDV poseen todavía inconvenientes (Oirschot y col., 1999).

Las vacunas muertas (virus enteros inactivados) o las vacunas subunitarias (proteínas víricas purificadas convencionalmente o proteínas víricas purificadas y expresadas heterológamente) son en su mayor parte inferiores a las vacunas vivas en
10 lo que se refiere a eficacia para producir una respuesta inmunológica protectora completa, incluso en presencia de coadyuvantes.

Con mucha frecuencia, las vacunas BVDV vivas, aunque atenuadas, están asociadas a graves problemas de seguridad. Como se ha mencionado anteriormente, atraviesan la placenta de las vacas gestantes y producen manifestaciones clínicas en
15 el feto y/o la inducción de terneros pertinazmente infectados. Por lo tanto, no pueden aplicarse a manadas reproductoras en las que hay vacas gestantes. Las vacas gestantes deben permanecer aisladas del ganado vacunado para proteger a los fetos y no pueden ser vacunadas en ese estado. Más aún, los BVDV vivos atenuados que experimentan reversión plantean una seria amenaza para el ganado vacuno. Para virus
20 atenuados obtenidos convencionalmente, en los que la atenuación es producida por múltiples pasos convencionales, el origen molecular así como la estabilidad genética permanece desconocida y el estallido de virus que reversionan es impredecible.

Ciertas vacunas vivas con mutaciones definidas como base para su atenuación permitirían evitar las desventajas de la presente generación de vacunas
25 atenuadas. Una ventaja adicional de dichas mutaciones atenuantes radica en su exclusividad molecular que permite utilizarlas como marcadores característicos para pestivirus atenuados y distinguirlos de los pestivirus del campo.

En la Solicitud PCT N° PCT/EP 99/03642, se describen pestivirus de este tipo, vivos y específicamente atenuados, con un alto potencial para inducir inmunidad
30 así como una base definida de atenuación que también puede distinguirse de los pestivirus patógenos. En esta solicitud se ha demostrado que los pestivirus pueden ser atenuados específicamente por inactivación de la actividad RNasa que reside en la glicoproteína E^{ANS}. Los autores de la invención describen que este principio de atenuación es universal para todos los pestivirus y particularmente adecuado para

BVDV.

Esta solicitud describe una vacuna viva atenuada que es superior a las vacunas subunitarias y muertas en lo que se refiere a su eficacia de inducción de inmunidad, además de ser superior a las vacunas convencionalmente atenuadas, que
5 no están definidas molecularmente, no están marcadas y son impredecibles con respecto a sus mutantes. A partir de la técnica anterior, un experto asociaría de modo natural el riesgo de infección BVDV fetal cuando se vacunan con un virus vivo atenuado vacas gestantes o ganado vacuno en una relación de vecindad con las vacas gestantes. Esto sigue siendo un grave inconveniente que limita el uso de una vacuna
10 de esta clase.

Por lo tanto, el problema técnico que es la razón fundamental de esta invención era proporcionar vacunas BVDV vivas y atenuadas inocuamente que puedan utilizarse para la preparación de una vacuna viva para uso en la prevención y/o el tratamiento de infecciones BVDV de vacas gestantes, o de ganado vacuno en
15 presencia de vacas gestantes.

Descripción de la invención

La solución del problema técnico anterior se encuentra en esta descripción y en las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

20 Se ha encontrado de modo sorprendente que BVDV (virus de la diarrea vírica bovina) vivos, en los que la actividad RNasa que reside en su glicoproteína E^{RNS} está inactivada, no producen transmisión placentaria al feto cuando las vacas gestantes se vacunan con dicho virus. No son apreciables signos clínicos de ninguna clase en los terneros cuando se utiliza una cepa de BVDV con dicha característica para
25 exponer vacas gestantes a dicha cepa..

Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención se refiere al uso inesperado de un BVDV vivo, en el que la actividad RNasa que reside en su glicoproteína E^{RNS} está inactivada, para la preparación de una vacuna viva para uso en la prevención y/o el tratamiento de infecciones BVDV en ganado vacuno reproductor.

30 De modo todavía más inesperado, las propias vacas gestantes pueden ser vacunadas con dicho BVDV específicamente atenuado. En consecuencia, en una realización preferida, la presente invención se refiere al uso de dicho BVDV para la preparación de una vacuna viva para uso en la prevención y/o el tratamiento de infecciones BVDV en vacas gestantes.

60
5X

Esto permite, por primera vez, prevenir y proteger al propio feto contra las infecciones BVDV empleando una vacuna viva. En una realización más preferida, la presente invención se refiere al uso de dicho BVDV para la preparación de una vacuna viva para inducir protección fetal contra infecciones BVDV en vacas gestantes.

5 El término "vacuna", en el sentido utilizado aquí, se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un componente inmunológicamente activo que induce una respuesta inmunológica en un animal y posiblemente, aunque no es necesario, uno o más componentes adicionales que intensifican la actividad inmunológica de dicho componente activo. Una vacuna puede comprender adicional-
10 mente otros componentes típicos de las composiciones farmacéuticas. El componente inmunológicamente activo de una vacuna puede comprender organismos vivos completos, ya sea en su forma original o como organismos atenuados en lo que se conoce como una vacuna viva modificada (MLV, del inglés Modified Live Vaccine) u organismos inactivados por métodos apropiados en lo que se conoce como una
15 vacuna muerta (KV, del inglés Killed Vaccine). En otra forma, el componente inmunológicamente activo de una vacuna puede comprender elementos apropiados de dichos organismos (vacunas subunitarias), siendo generados estos elementos, o bien por destrucción del organismo entero o de los cultivos de crecimiento de estos organismos y subsiguientes etapas de purificación que producen la o las estructura(s)
20 deseada(s), o bien por procedimientos de síntesis inducidos por una manipulación apropiada de un sistema adecuado tal como, pero sin limitarse a ellos, bacterias, insectos, mamíferos u otras especies, además de procedimientos subsiguientes de aislamiento y purificación o por inducción de dichos procedimientos de síntesis en el animal que necesita una vacuna por incorporación directa de material genético
25 utilizando composiciones farmacéuticas adecuadas (vacunación con polinucleótidos). Una vacuna puede comprender uno o simultáneamente más de uno de los elementos descritos anteriormente.

Los componentes adicionales que intensifican la respuesta inmunológica son constituyentes normalmente conocidos como coadyuvantes, como por ejemplo
30 hidróxido de aluminio, aceites minerales o de otra clase o moléculas auxiliares añadidas a la vacuna o generadas por el cuerpo después de la inducción respectiva por los componentes adicionales de ese tipo, tales como, pero sin limitarse a ellos, interferones, interleuquinas o factores de crecimiento.

Una "composición farmacéutica" está constituida esencialmente por uno o

61
58

más ingredientes capaces de modificar las funciones fisiológicas, por ejemplo inmunológicas, del organismo al que se administra, o de los organismos que viven en su interior o en su superficie, tales como, pero sin limitarse a ellos, antibióticos o antiparasitarios, así como otros constituyentes que se le añaden con objeto de producir otros objetivos determinados como, pero sin limitarse a ellos, características de procesamiento, esterilidad, estabilidad, posibilidad de administrar la composición por rutas entéricas o parenterales tales como ruta oral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica u otra ruta adecuada, tolerancia después de la administración, o propiedades de liberación controlada.

10 Una vacuna de la invención se refiere a una vacuna como se ha definido anteriormente, en la que un componente inmunológicamente activo es un BVDV vivo, en el que la actividad RNasa en su proteína E^{RNS} está inactivada.

La expresión "vacuna viva" se refiere a una vacuna que comprende un componente activo vivo, en particular un componente activo vírico vivo.

15 El término "BVDV" como se utiliza aquí, se refiere a todos los virus que pertenecen a las especies BVDV 1 y BVDV 2 del género pestivirus dentro de la familia Flaviviridae (Becher y col., 1999).

Las cepas más clásicas de BVDV de tipo I y las cepas más reconocidas recientemente de BVDV de tipo II exhiben algunas diferencias limitadas pero
20 características en las secuencias de nucleótidos y aminoácidos. Estas diferencias son inmunológicamente distinguibles por los anticuerpos monoclonales. El principio de atenuación de inactivar la actividad RNasa en la proteína E^{RNS} como se ha descrito en la Solicitud Internacional citada anteriormente es universalmente aplicable y se mantiene verdadero para BVDV tanto de tipo I como de tipo II. La característica
25 sorprendente de que estos BVDV atenuados de esa manera no atraviesan la barrera placentaria y no conducen a manifestaciones clínicas de infecciones BVDV en el feto, se aplica a todos los tipos de BVDV. Por lo tanto, en una realización aún más preferida, la presente invención se refiere al uso de dicho BVDV para la preparación de una vacuna viva para el tratamiento y/o la prevención de infección fetal, vacas
30 gestantes y ganado vacuno reproductor.

La expresión "actividad RNasa" como se utiliza aquí, se refiere a la capacidad de la glicoproteína E^{RNS}, que es una proteína inherente a todos los pestivirus naturales tales como BVDV, para hidrolizar el ARN.

Hay que señalar que la expresión "glicoproteína EO" se utiliza frecuentemente

62
59

como sinónimo de la expresión glicoproteína E^{RNS} en algunas publicaciones.

La expresión "inactivación de la actividad RNasa que reside en dicha glicoproteína" se refiere a la incapacidad o capacidad reducida de una glicoproteína E^{RNS} modificada para hidrolizar ARN, en comparación con el tipo silvestre no
5 modificado de dicha glicoproteína E^{RNS}.

La inactivación de la actividad RNasa que reside en la glicoproteína E^{RNS} se puede producir mediante delecciones y/o mutaciones de al menos un aminoácido de dicha glicoproteína, como se demuestra en la Solicitud Internacional PCT/EP99/03642 y por Hulst y col., (1998). Por lo tanto, en una realización muy preferida, la
10 presente invención se refiere al uso de BVDV vivo, donde dicha actividad RNasa está inactivada por delecciones y/o mutaciones de al menos un aminoácido de dicha glicoproteína.

La secuencia de aminoácidos para la cepa CP7 de BVDV está disponible, con fines de referencia, en el banco de datos GenBank/EMBL (número de acceso
15 U63479). Dos regiones de aminoácidos están altamente conservadas en la glicoproteína E^{RNS} así como en algunas proteínas RNasa activas de plantas y hongos (Schneider y col., 1993). Estas dos regiones son de particular importancia para la actividad enzimática RNasa. La primera región está constituida por la región de los aminoácidos entre la posición 298 y 310 y la segunda región está constituida por los
20 aminoácidos situados en las posiciones 341 a 360 de dicha poliproteína vírica como se ilustra para la cepa CP7 de BVDV (numerando de acuerdo con la secuencia deducida de aminoácidos de la cepa CP7; véase la Figura 1 para conocer la secuencia de aminoácidos de la glicoproteína E^{RNS} de CP7). Los aminoácidos de particular importancia para la actividad RNasa, como se ha mencionado anteriormente, no se
25 limitan en absoluto a la posición exacta que se ha definido para la cepa CP7 de BVDV sino que simplemente se utilizan de manera ilustrativa para señalar los aminoácidos preferidos que están en esa posición o que corresponden a esa posición en cepas BVDV ya que están altamente conservados. Para pestivirus BVDV diferentes, la numeración de las posiciones de los aminoácidos preferidos podría ser diferente pero
30 cualquier experto en el campo de la biología molecular de los pestivirus identificaría fácilmente estos aminoácidos preferidos por su posición relativa a los aminoácidos altamente conservados de dicha glicoproteína.

En consecuencia, la presente invención se refiere, en una realización más preferida, al uso de BVDV de acuerdo con la invención, donde dichas delecciones y/o

63
89

mutaciones inactivantes están situadas en los aminoácidos de las posiciones 298 a 310 y/o de las posiciones 341 a 360 de dicha glicoproteína, como se describe para la cepa CP7 de BVDV de una manera ilustrativa, y en posiciones correspondientes a ellas en otras cepas de BVDV.

5 En una realización muy preferida, la presente invención describe el uso de un virus BVD vivo de acuerdo con la invención, donde dicha actividad RNasa es inactivada por la delección del resto de histidina en la posición 349 como se describe para la cepa CP7 de BVDV de manera ilustrativa o correspondiente a ella en otras cepas de BVDV, de dicha glicoproteína.

10 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para la prevención y/o el tratamiento de infecciones BVDV en ganado vacuno reproductor, caracterizado porque una composición farmacéutica que comprende un virus BVD vivo, donde la actividad RNasa que reside en su glicoproteína E^{RNS} está inactivada, se aplica a un animal con necesidad de dicha profilaxis o tratamiento.

15 Para poner en práctica la invención es necesario preparar un BVDV de acuerdo con la invención. Esto puede hacerse con cualquier BVDV disponible que sea adecuado para efectuar sobre él una modificación recombinante. Un ejemplo de cómo obtener un virus de esta clase de acuerdo con la invención se da más adelante en el Ejemplo 2. El ejemplo demuestra la preparación de un virus para un uso de acuerdo
20 con la invención de una manera ilustrativa y de ningún modo es limitante. Un experto en el campo de la virología o de la biología molecular puede conseguir esto por métodos clásicos que están abundantemente descritos en la técnica.

La aplicación de los virus vivos preferidos de acuerdo con la solicitud al grupo preferido de animales es idéntica a los métodos de aplicación que son asequibles y
25 se practican para otros virus atenuados vivos en la técnica.

Referencias

1. Baker, J.C. 1987. Bovine viral diarrhea virus: a review. J. Am. Vet. Med. Assoc. 190: 1449-1458.
- 30 2. Becher, P., Orlich, M., Koenig, A., König, M., Baroth M., Thiel H.J., 1999. Genetic Diversity of Pestivirus: Identification of Novel Groups and Implications for Classification. Virology 262: 64-71.
3. Fuerst T.R. et al. 1986. Eukaryotic transient expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase.

64
61

- Proc. Nat. Acad. Sci. 83: 8122-8126.
4. Hulst, M.M., F.E. Panoto, A. Hoekmann, H.G.P. van Gennip., and Moormann, R.J.M. 1998. Inactivation of the RNase activity of glycoprotein E^{ns} of classical swine fever virus results in a cytopathogenic virus, *J. Virol.* 72: 151-157.
 - 5 5. Kunkel, T. A., J. D. Roberts, and R. A. Zakour. 1987. Rapid and efficient sitespecific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol.* 154:367-392.
 6. Meyer, G., Tautz, N., Becher, P., Thiel, H.-J., & Kümmeler, B.M. 1996b. Recovery of cytopathogenic and noncytopathogenic bovine viral diarrhea viruses from cDNA constructs. *J. Virol.*, 70: 8606-8613.
 - 10 7. Meyers, G., Thiel, H.-J., and Rümenapf, T. 1996a. Classical swine fever virus: Recovery of infectious viruses from cDNA constructs and generation of recombinant cytopathogenic swine fever virus. *J. Virol.* 67:7088-709526.
 8. Moennig, V. and Plagemann, J. 1992. The pestiviruses. *Adv. Virus Res.* 41: 53-15 91.
 9. Moennig, V. and Lless, B. 1995. Pathogenesis of Intrauterine Infections with Bovine Viral Diarrhea Virus. 11: (3), 477-487.
 10. Olirschot van, J.T., Bruschke, C.J.M., Rijn van, P.A., 1999. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhea. *Veterinary Microbiology*, 64: 169-183.
 - 20 11. Sandvik, T., Paton D.J., Lowings P.J. 1997. Detection and Identification of ruminant and porcine pestiviruses by nested amplification of 5' untranslated cDNA regions. *J. Virol Methods* 64: (1) 43-56.
 12. Schneider, R., G. Unger, R. Stark, E. Schneider-Scherzer, and H.-J. Thiel. 1993. Identification of a structural glycoprotein of an RNA virus as a ribonuclease. 25 *Science* 261: 1169-1171.
 13. Thiel., H.-J., Plagemann, G.W., & Moennig, V. 1996. The pestiviruses. In *Fields Virology*, eds. Fields, B.N. Knipe, D.M., & Howley, P.M. (Lippincott-Raven, Philadelphia), págs. 1059-1073.
 14. Weiland, E., Thiel, H.-J., Hess, G., and Weiland, F. (1989). Development of 30 monoclonal neutralizing antibodies against bovine viral diarrhea virus after pretreatment of mice with normal bovine cells and cyclophosphamide. *J. Virol. Methods* 24: 237-244.

63
62

Ejemplos

Ejemplo 1 Estudio de exposición fetal a BVDV

Diseño experimental

5 Se seleccionaron seis novillas en estado de gestación a partir de una manada no infectada por BVDV. En la prueba, se incluyeron dos grupos de 3 novillas cada uno. Los animales de los grupos se mantuvieron aislados, asegurando por tanto la ausencia de infección cruzada y externa.

Tabla 1

10

Grupo N°	N° de animales	Virus	Ruta de aplicación	Dosis por ruta TCID ₅₀
1	3	NCP7	i.m.; i.n.; i.t.; s.c.;	1,2 x 10 ⁵
2	3	B-349-d	i.m.; i.n.; i.t.; s.c.;	1,2 x 10 ⁵

15 Las novillas de los grupos 1 a 2 fueron inoculadas con una TCID₅₀ de al menos 10⁵ BVDV en un volumen de 3 ml por ruta. Las rutas de aplicación fueron intramuscular (i.m.), subcutánea (s.c.), intranasal (i.n.) (1,5 ml por orificio nasal) e intratraqueal (i.t.).

 Se tomaron muestras de sangre de los animales para realizar los análisis
20 serológicos y virológicos. Las novillas fueron vigiladas regularmente para determinar la presencia de signos clínicos de infección BVDV durante el período de observación. El experimento se dio por terminado después del nacimiento de los terneros mediante un análisis para detectar infección por BVDV. Los principales parámetros de la
25 evaluación fueron el número de abortos relacionados con BVDV y el número de terneros nacidos virémicos o que tenían anticuerpos frente a BVDV.

Preparaciones de capas leucocitarias

 Se recogió sangre en recipientes estériles adecuados precargados con solución de heparina (heparina sódica para inyección, 5.000 UI/ml; Gedeon Richter RT, Budapest, Hungría) asegurándose de que hubiera al menos 20 UI de heparina por
30 ml de sangre en la muestra de sangre.

 Se centrifugó sangre durante 10 min a 750 g a 4°C. Los eritrocitos sedimentaron en la mitad inferior del tubo mientras que el plasma constituía el sobrenadante en la mitad superior del tubo. Encima de la fase de los eritrocitos, la

- llamada interfase, estaban situados los leucocitos. Esta capa fina de glóbulos blancos se recogió con una pipeta estéril y después se resuspendió muy cuidadosamente en el nuevo tubo cargado con tampón de Gay (NH_4Cl 140 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 6,5 mM, KH_2PO_4 1,5 mM). La suspensión se mantuvo sobre hielo durante 10 minutos.
- 5 Las células se centrifugaron nuevamente (10 min, 750 g, 4°C) y el sobrenadante se desechó. El tratamiento con tampón de Gay se se repitió hasta que no se observó ninguna cantidad sustancial de eritrocitos en la suspensión. Entonces las células se lavaron dos veces en RPMI 1640 (Gibco BRL, Eggenstein, Alemania) con FCS al 5% (suero vacuno fetal, aproximadamente 20 ml) y seguidamente se centrifugaron. Las
- 10 capas leucocitarias obtenidas se resuspendieron en un pequeño volumen (2 ml) de RPMI 1640, FCS al 5% y se congelaron a -70°C en dos alícuotas de 1 ml. Las capas leucocitarias se utilizaron para la determinación de BVDV asociado a las células hemáticas.

Ensayo ELISA de anticuerpos frente a BVDV

- 15 Se recogieron al menos 10 ml de sangre reciente en cada momento de muestreo a partir de cada animal. La sangre se dejó coagular a temperatura ambiente y se separó por centrifugación. Cada muestra de suero se ensayó para determinar la presencia de anticuerpos frente a BVDV utilizando un ensayo ELISA adecuado y validado (Svanovir® ensayo de anticuerpos BVDV N° de catálogo 10 2200-10). El
- 20 ensayo fue validado y realizado de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las muestras positivas se diluyeron de acuerdo con la escala $\log_2$ para determinar títulos de anticuerpos frente a BVDV.

Virus para la exposición a la infección fetal

- Se aplicó la cepa B349-d al grupo 2. Esta cepa es casi idéntica a la NCP7
- 25 que se aplicó al grupo 1, excepto en una sola delección de la histidina en la posición 349 de su secuencia de aminoácidos. La cepa B349-d se preparó de acuerdo con el procedimiento enunciado más abajo.

- Detección de BVDV a partir de muestras de capa leucocitaria o tejido por el
procedimiento de aislamiento del virus seguido por un ensayo de inmunofluorescencia
indirecto (IFT)
- 30

Para el aislamiento del virus, se utilizó una suspensión al 20% de tejidos, suero o capa leucocitaria.

Una cantidad de 1 g de material orgánico se homogeneizó utilizando un mortero y un almirez, se diluyó hasta 5 ml con solución salina tamponada con fosfato

(PBS) y se centrifugó a 1.500 * g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se filtró en condiciones estériles utilizando soportes de filtros de 0,45 µm, Schleicher y Schuell, Dassel, Alemania, y se utilizó para el aislamiento del virus.

Se efectuó la propagación del virus en células de riñón bovino Marbin Darby (MDBK) en forma de monocapa en placas de 24 pocillos con medio EMEM, que contenía 10% de suero vacuno fetal, 1% de aminoácidos no esenciales y 0,15% de antibióticos. Antes de empezar, las células se ensayaron para determinar su contaminación con BVDV por RT-nPCR como se describe más abajo, y por un ensayo de inmunofluorescencia (IFA).

Después de su división, las células se infectaron todas ellas simultáneamente con 100 µl de suspensión, suero o capa leucocitaria por duplicado. Al cabo de 5 días, una alícuota de los cultivos de células se congeló y descongeló.

Dos alícuotas de 100 µl del lisado de células se pasaron dos veces a suspensiones de células MDBK. Una alícuota se fijó con etanol y se guardó a -20°C para la detección del virus por ensayo de inmunofluorescencia (IFA).

Los cultivos de células infectadas se ensayaron por IFA. Las células se fijaron por incubación con etanol frío a -20°C. Las placas de 24 pocillos fijadas se lavaron dos veces con PBS. A continuación los pocillos se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente con mezcla αBVDV-mAb (Weiland y col, 1989). La mezcla αBVD-mAb se diluyó 1:10 en PBS. Después de lavar tres veces con PBS, se añadió antisuero conjugado FITC de ratón-rab.α (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA 19390, EE.UU.) en una solución de 1:150 en PBS (solución salina tamponada con fosfato) y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Después de un lavado adicional, se añadió glicerol-PBS (1:1) y los cultivos de células teñidas fueron investigados por microscopia de inmunofluorescencia.

Detección de BVDV a partir de suero, capa leucocitaria y muestras de tejido por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se extrajo ARN por cromatografía en columna utilizando un equipo "QIAamp Viral Mini Kit" para muestras de suero y un equipo "RNeasy Mini Kit" para material orgánico y capa leucocitaria, de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes. Ambos equipos son obtenibles a partir de Qiagen LTD, Hilden, Alemania.

RT-nPCR

Se utilizaron pares de cebadores para la detección de pestivirus por RT-nPCR, como ha sido descrito previamente por Sandvik y col. (1997). Las secuencias de los

68
69

cebadores externos son:

(P103F) '5-TAG CCA TGC CCT TAG TAG GAC T-3'

(P365R) '5- TGT GCC ATG TAC AGC AGA GAT T -3'

Los cebadores externos generaron un fragmento de ADN de 280-284 pares
5 de bases de longitud.

Las secuencias de los cebadores internos fueron las siguientes:

(B145F) '5-AAC AGT GGT GAG TTC GTT GGA T-3'

(B314F) '5-CAC CCT ATC AGG CTG TAT TCG T-3'

Los cebadores internos generaron un fragmento de ADN de 191 pares de
10 bases de longitud.

Se utilizó un volumen de ARN total de 5 ml (1 µg - 1 pg) para la multiplica-
ción por RT-PCR, utilizando el equipo "Titan One Tube Kit", Boehringer Mannheim,
Mannheim, Alemania, la RT-PCR se llevó a cabo en un volumen total de 25 µl, que
contenía 1*RT-PCR, dNTPs 0,1 mM, 20 pmol de cebador sentido y antisentido,
15 ditiotreititol 5 mM, cloruro de magnesio 1 mM, 2,5-5 unidades de RNasina, Promega
Ltd., 1-2,5 unidades de mezcla de enzimas, AMV-RT y Taq polimerasa, y 25 µl de
agua destilada, que contenía 0,1% de pirocarbonato de dietilo.

Las condiciones para los ciclos de RT-PCR fueron las siguientes:

42°C durante 1 hora, 95°C durante 5 min y 35 ciclos de 94°C durante 1 min,
20 60°C durante 1 min y 72°C durante 1 min, finalmente prolongación durante 10 min.

Se utilizó 1 µl de producto PCR como molde para la PCR anidada, utilizando
Qiagen Taq (Qiagen LTD, Hilden, Alemania).

La nPCR se llevó a cabo en un volumen total de 50 µl, que contenía tampón
1*PCR, cloruro de magnesio 3,5 mM, dNTPs 0,1 mM cada uno, 20 pmol de cada uno
25 de los cebadores y 2,5 unidades de Taq. El perfil de temperatura de la PCR anidada
para 30 ciclos fue 94°C durante 1 min, 55°C durante 1 min y 72°C durante 1 min,
seguido por una última multiplicación prolongada. Un volumen de 5 µl de producto de
nPCR fue analizado por electroforesis en tampón de tris-acetato EDTA, utilizando 1%
de agarosa y una tinción con 1 µg/ml de bromuro de etidio. El producto amplificado
30 se identificó por comparación de tamaños con una escala normalizada de 100 pares
de bases (pb) de peso molecular (Gibco BRL, Eggenstein, Alemania), y la especificidad
de los productos PCR se verificó por análisis de secuencia.

Para realizar PCRs sin contaminación cruzada, se utilizó el RoboAmp 4200
(MWG Biotech, Ebersberg, Alemania) para el pipeteo automatizado. El termociclo se

realizó en una unidad cicladora térmica de ADN Primus 96 (MWG Biotech, Ebersberg, Alemania) o T3 (Biometra, Göttingen, Alemania).

Resultados

Observación clínica

5 No se observó ningún signo clínico relacionado BVDV en las novillas del Grupo 2 durante el período de observación.

En el Grupo 1, se apreciaron salivación más incrementada y descarga nasal durante un período de aproximadamente 6 días (entre los días 7 - 12 PI). Dos animales tuvieron diarrea el día 14 PI. Los resultados se resumen en la Tabla 2.

10 Tabla 2

Puntuación de la novilla nº en el						
Días PI	Grupo 1			Grupo 2		
	11093	13178	11736	12031	10565	11060
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
7	3	2	2	-	-	-
8	3	2	2	-	-	-
9	3	2	2	-	-	-
10	2	2	2	-	-	-
11	1	1	1	-	-	-
12	1	1	1	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-
14	2	-	1	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-

35 Puntuación: 1 = débil; 2 = moderada; 3 = fuerte

Historial de gestaciones

En el Grupo 2, todas las novillas tuvieron una duración normal del periodo de gestación (en el intervalo de 270 - 277 días) y un estado de gestación y un parto sin complicaciones.

40 En el Grupo 1, un animal (el nº 11736) tuvo un aborto en el 8º mes de

70
67

gestación. La necropsia del feto reveló una inflamación serofibrinosa aguda del corión que fue la causa de un suministro insuficiente de oxígeno del feto y posterior asfixia. Los dos animales restantes tuvieron, respectivamente, un ternero después de 278 días de gestación (n° 13178) y después de 296 días de gestación (n° 11093).

Detección del virus a partir de muestras clínicas obtenidas de abortos o de terneros recién nacidos

En el caso de un aborto, se investigaron muestras de diferentes órganos tales como cerebro, bazo o riñón por PCR y/o IFT para BVDV. Todas las muestras clínicas obtenidas a partir del feto abortado de la vaca 11736 en el grupo 1 fueron negativos en BVDV. Las muestras de capa leucocitaria de terneros nacidos de las vacas 11093 y 13178 fueron positivos en BVDV, como se confirmó por IFT y PCR. En cambio, las muestras de capa leucocitaria y suero de los terneros nacidos de las vacas 10565, 110606 y 12031 del grupo 2 fueron todas negativas en BVDV, lo que se confirmó por los métodos mencionados anteriormente. Los datos se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3

Evaluación de la transmisión fetal						
Grupo	Animal N°	Virus de exposición	Ternero N°	Aborto/ vivo	Conclusión a partir de los datos de detección del virus	Porcentaje de transmisión placentaria del grupo
1	11093	NCP7	11093 c	vivo	pos	66%
	11736		11736 c	aborto	neg	
	13178		13178 c	vivo	pos	
2	10565	B349-d	10565 c	vivo	neg	0%
	11060		11060 c	vivo	neg	
	12031		12031 c	vivo	neg	

71
68

Datos serológicos a partir de ganado vacuno en gestación

Al seleccionarlas y el día de la infección, las vacas gestantes no estaban infectadas por BVDV. Las muestras de suero de todos los animales participantes en la prueba que se recogierpm un mes después de la infección eran seropositivas en BVDV. El carácter positivo del suero se confirmó para BVDV en toda la prueba reinvestigando muestras de suero obtenidas en una base mensual a partir de todos los animales. Los datos se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4

DATOS DE ELISA PARA ANTICUERPOS

10

Vaca Nº	Grupo	Anticuerpos específicos para BVDV en sueros tomados en el momento de									
		la selec- ción	la infec- ción	meses PI						Al terminar	
				1	2	3	4	5	6	vaca	ternero *
11093	1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
13178	1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
11738	1	-	-	+	+	+	+	Ab.*	NA	NA	NA
11060	2	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
10585	2	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
12031	2	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-

15

PI = después de la infección; *antes de la primera ingesta de calostro; NA = no aplicable;
* después del aborto las vacas se retiraron del estudio, Ab. = aborto

20

Discusión y conclusiones

25

Como 2 de cada 3 terneros nacidos en el grupo 1 que fueron infectados con NCP7 eran virémicos para BVDV al nacer mientras que ningún ternero nacido en el grupo 2 que había sido infectado con B-349-d lo era, estos datos proporcionan una clara evidencia de que la modificación genómica introducida en B-349-d suprime la capacidad del virus padre NCP7 de inducir infección fetal.

Ejemplo 2 Generación de mutantes de BVDV negativos en RNasa

30

Partiendo de los clones Pa/BVDV de ADNc de longitud completa (Meyer y col., 1996b), a partir de los cuales se puede obtener ARNc infeccioso por transcripción *in vitro*, se generaron subclones. Un fragmento XhoI/BglII de pA/BVDV se clonó en el plásmido pCITE-2C, cortado con las mismas enzimas. Se produjo ADN

78
69

plasmídico monocatenario a partir de estas construcciones de acuerdo con el método de Kunkel (Kunkel y col., 1987) utilizando células de E. coli CJ 236 (BioRad) y el fago monocatenario VCMS (Stratagene). El ADN monocatenario se convirtió en bicatenario utilizando el estuche de mutagénesis *in vitro* Phagemid (BioRad). Un oligonucleótido
5 sintético que se utilizó como cebador para generar el mutante de BVDV deseado es el expresado a continuación a modo ilustrativo:

B-349-d: CATGAATGGAACAAAGGTTGGTGCAACTGG

El ADN plasmídico bicatenario se utilizó para la transformación de células E. coli XL 1-Blue (Stratagene). Las colonias bacterianas que albergaban plásmidos fueron
10 aisladas vía selección con ampicilina. Se preparó ADN plasmídico y posteriormente se analizó por secuenciación de nucleótidos utilizando el estuche de secuenciación de polimerasa de T7 (Pharmacia). Los plásmidos que contenían las mutaciones deseadas y ningún cambio en segundos sitios fueron utilizados para la construcción de clones de ANDc de longitud completa. Para obtener el mutante CP7 de BVDV, un fragmento
15 Xol/BgIII que contenía la delección fue insertado en pA/BVDV cortado con XhoI y NcoI junto con un fragmento BgIII/NcoI aislado a partir de pA/BVDV/Ins-. A partir de la construcción pA/BVDV/Ins-, se transcribió un ARNc que da lugar a un BVDV no citopatógeno tras su transfección en células adecuadas (Meyers y col., 1996b).

Se amplificaron los diferentes clones de longitud completa y se aislaron los
20 plásmidos. La presencia de las mutaciones deseadas fue demostrada por secuenciación de ADN. Después de linearizar con SmaI, el ARNc se transcribió como se ha descrito previamente (Meyers y col., 1996ab). El ARN se purificó por filtración en gel y extracción en fenol/cloroformo y se utilizó para transfección de células de riñón bovino (clon B2 de MDBK). Las transfecciones fueron analizadas por inmunofluores-
25 cencia con antisueros específicos frente al virus. El mutante deseado pudo ser recuperado (como se confirmó por inmunofluorescencia). El virus fue amplificado por pase en la misma línea celular utilizada para los experimentos de transfección.

El análisis adicional del mutante incluía la determinación de curvas de crecimiento en una etapa y caracterización de ARN vírico por transferencia Northern
30 con sondas de ADNc específicas para el virus así como una reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) y secuenciación subsiguiente de los fragmentos PCR para verificar la presencia de las mutaciones deseadas en el genoma vírico. Los virus recuperados crecieron tan bien como el virus resultante del plásmido que exhibía la secuencia de tipo silvestre, y produjeron cantidades similares de ARN.

La viabilidad del mutante de BVDV se demostró por transfección del ARNc respectivo y división de las células 3 días después. Parte de las células se sembraron en una placa de 3,5 cm de diámetro, se fijaron con acetona/metanol el día después y se analizaron por inmunofluorescencia con una mezcla de anticuerpos monoclonales
5 específicos para BVDV (Weiland y col., 1989). Se encontró que todas las células eran positivas mientras que un testigo de células transfectadas con ARN no infeccioso no dio ninguna señal. A partir de una porción de las células transfectadas con el ARNc respectivo, se produjo un extracto por un ciclo de congelación y descongelación. Se infectaron células recientes con este extracto de células y resultó ser positivo en
10 BVDV por inmunofluorescencia específica para BVDV 3 días después de la infección.

La Tabla 1 presenta los cambios introducidos en las secuencias conservadas de E^{RNS}, que representan el presunto sitio activo de la RNasa, que son codificadas por el mutante del virus.

Tabla 1

15	Nombre	Secuencia en el segmento de RNasa	Actividad RNasa	Viabilidad del mutant.
	pA/BVDV	...SLHGIWPEKIC... RHEWNKHGWCNW..	+	+
	B-349-d	...SLHGIWPEKIC... RHEWNK_GWCNW..	-	+

Leyenda para la Tabla 1: El ensayo para determinar la actividad RNasa se hizo en un
20 ensayo transitorio. Se infectaron células BHK21 con el virus Vaccina vTF7-3 (Fuerst y col., 1986) y después se transfectaron con la respectiva construcción de ADNc (5 µg de ADN plasmídico, transfección utilizando Superfect según las recomendaciones del suministrado (Qiagen)). Después de 10 horas de incubación a 37°C en una incubadora de CO₂, las células transfectadas se lisaron y procesaron para determinar
25 la actividad RNasa como se describe más adelante. La viabilidad se determinó como se describe más adelante.

Ejemplo 2 Efecto de la mutación en la posición 349 de la cepa CP7 de BVDV sobre la actividad RNasa de E^{RNS}

30 Para evaluar el efecto de la delección en la posición 349 sobre la actividad RNasa de E^{RNS}, se infectaron células apropiadas con los virus mutantes.

Para el mutante de BVDV, la actividad RNasa se ensayó con material obtenido después de la transfección de ARN sin pase de los virus recuperados. Las células transfectadas con el ARN apropiado se dividieron 72 h después de la

74
71

transfección y se sembraron en dos placas. 24 h después, se prepararon extractos celulares a partir de una placa y se analizaron para determinar su actividad RNasa. La infección con virus de tipo silvestre sirvió como un testigo positivo mientras que las células no infectadas se utilizaron como testigo negativo. Las células se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato y se lisaron en 0,4 ml de tampón de lisis (Tris/HCl 20 mM; NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, 2 mg/ml de albúmina de suero bovino; 1% de Triton X100; 0,1% de ácido desoxicólico; 0,1% de dodecil-sulfato sódico). El lisado se puso en tubos de reacción de 1,5 ml, se sonicó (sonicador Branson B12, 120 watos, 20 s en un baño de agua coniforme), se clarificó por centrifugación (5 min, 14.000 rpm, centrífuga Eppendorf, 4°C) y el sobrenadante se sometió a ultracentrifugación (ultracentrífuga de mesa Beckmann, 60 min a 4°C y 45.000 rpm en un rotor TLA 45). La determinación de la actividad RNasa se hizo en un volumen total de 200 µl que contenía 5 ó 50 µl del sobrenadante de la segunda etapa de centrifugación y 80 µg de Poli(rU)(Pharmacia) en tampón de ensayo RNasa (Tris-acetato 40 mM (pH 6,5), EDTA 0,5 mM, ditioneitol 5 mM (DTT)). Después de la incubación de la mezcla de reacción a 37°C durante 1 hora, se añadieron 200 µl de ácido perclórico 1,2 M, LaSO₄ 20 mM. Después de 15 min de incubación sobre hielo, la mezcla se centrifugó durante 15 min a 4°C y 14.000 rpm en una centrífuga Eppendorf. Al sobrenadante, se añadieron 3 volúmenes de agua y una alícuota de la mezcla se analizó midiendo la densidad óptica a 260 nm utilizando un espectrofotómetro Ultrospec 3000 (Pharmacia). La mutación introducida en el gen E^{RNS} suprimió completamente la actividad RNasa (Tabla 5).

Para probar la infección, las células de la segunda placa se analizaron por inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales específicos para BVDV (Weiland y col., 1989) y resultaron ser seropositivos al 100%

Tabla 5

	CP7	B-349-d	testigo
DO ₂₆₀	2,5	1,1	1,1

Descripción de la Tabla 5

CP7: virus recuperado de pA/BVDV/Ins-; B-349-d: virus recuperado de pA/B-349-d: testigo; extracto de células MDBK no infectadas.

25
72

Figura 1 Secuencia de aminoácidos de la glicoproteína E^m de BVDV CP VII

1 ENITQWNLQDNGTEGIQRAMFQRGVNRSLHGIWPEKICTGVPSHLATDTE
5 51 LKAIHGMMDASEKTNYTCCRLQRHEWNKHGWCNWyNIEPWILLMNKTOAN
101 LTEGQPLRECAVTCRYDRDSBENVTGARDSPTPLTGCKKGKNFSFAGIL
151 VQGPCNFEIAVSDVLFKEHDCTSVIQDTAHYLVDGMTNSLESARQG TAKL
10 201 TTWLGRQLGILGKKLENKSKTWFGAYA

15 Las secuencias que contienen los restos conservados con respecto a las RNasas conocidas están subrayadas. Los dos restos de histidina que presuntamente están en el centro catalítico de la enzima se indican en caracteres en negrilla. La secuencia mostrada corresponde a los restos 271 a 497 de la poliproteína de CP 7.

21

Nuevo cap! de cap
4481-801-0028

CESION

Yo, (nosotros), abajo firmado (s)
Dr. Knut ELBERS
Dr. Gregor MEYERS

domiciliado (s) en

Caprino-Veronese-Str. 4a, 55435 Gau-Algesheim, Germany
Albstraße 1, 72141 Walddorfaeslach, Germany

declaro(amos) bajo juramento ser único(s) y
verdadero(s) inventor(es) de la invención:

Safe attenuated bovine viral diarrhea
viruses for use in pregnant cows

declaro(amos) así mismo que cedo(emos) y
transfiero(erimos), sin limitación, a favor de la
sociedad BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA
GMBH

constituida y existente de conformidad con las
leyes de Alemania

BOEHRINGER INGELHEIM
VETMEDICA GMBH

domiciliada en

Binger Str. 173, 55216 Ingelheim / Germany

todos los derechos inherentes a dicha invención
y que la citada Compañía queda facultada para
solicitar en su nombre la patente
correspondiente en la República de Colombia.

ASSIGNMENT

I (we), the undersigned
Dr. Knut ELBERS
Dr. Gregor MEYERS

of Caprino-Veronese-Str. 4a, 55435
Gau-Algesheim, Alemania

Albstraße 1, 72141 Walddorfaeslach,
Alemania

state(s) under oath to be sole and true
inventor(s) of the invention:

VIRUS ATENUADOS E INOCUOS DE LA
DIARREA VIRICA BOVINA PARA USO EN
VACAS GESTANTES

state as well; that assign, without reservations or
limitations in favour of

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA
GMBH

a corporation constituted and existing in
conformity with the laws of Germany

domiciled in Binger Str. 173, 55216
Ingelheim/Alemania

all rights inherent to said invention and that the
above mentioned company hereby is enabled to
apply, in its name, for the corresponding patent
in the Republic of Colombia.

Dado y firmado hoy / Given and signed this

en/in

AUTENTICACION NOTARIAL (INDIVIDUAL)

NOTARIAL AUTHENTICATION (INDIVIDUAL)

A los ____ día(s) del mes de _____ de 19__
ante mí Notario Público de _____
compareció/comparecieron _____

On this ____ day of _____, 19____
before me, a Notary Public of _____
_____ly appeared _____

quien(es) doy fe de conocer y he visto que exhibe la(s)
firmat(es) del documento que precede, y quien(es)
tiene(n) _____ legal para otorgarlo

to me known, and known to me to be the person(s) who
executed that foregoing document, and who has(have) legal
capacity to execute it.

Notario Público _____ Notary Public _____

NOTA LA AUTENTICACION CONSULAR ES NECESARIA

77
74

ASSIGNMENT / page 2

Signatures of the Assignees:

Knut ELBERS

Gregor Meyers

Gregor MEYERS

Date

March 09. 2001

Date

Signature of Assignor:

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH

ppa.

ppa.

Dr. Dieter LAUDIEN

Dr. Heinz-Gerd KLÄS

Umstehende, heute vor mir vollzogene Unterschrift des Herrn Dr. Gregor Meyers, geboren am 25.09.1958, wohnhaft: Albstraße 1, 72141 Walddorfhäslach, mir persönlich bekannt, beglaubige ich.

Tübingen, den 09. März 2001


Notar



Urkundenrolle-Nr.: 108/2001

Kostenrechnung:

Geb. § 45 I KostO
Porto, Auslagen

16 % Mwst.

DM	20,00
DM	<u>9,00</u>
DM	29,00
DM	<u>4,64</u>
DM	33,64
=====	


Notar

78
95

Apostille

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Land: Bundesrepublik Deutschland

Diese öffentliche Urkunde

2. ist unterschrieben von Klaus Wüst

3. in seiner Eigenschaft als Notar

4. sie ist versehen mit dem Siegel/Stempel

des (der) Klaus Wüst - Notar in Tübingen

Bestätigt

5. in Tübingen & am 14.3.2001

7. durch Präsident d. Landgerichts Dr. Sontag

8. unter Nr. 910I-65/169/2001

9. Siegel/Stempel

10. Unterschrift

[Handwritten Signature]

910 I - 65/169/2001
Gebühr nach JVKostO
Anl.Z.1 lit. a bb
Aus Wert: -- DM
- :DM -- 20,00

1 29 76

TRADUCCION OFICIAL No. 8325

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

Traducción de los sellos y legalizaciones en alemán que se encuentran a continuación de un documento escrito en español e inglés, por medio del cual los señores Dr. Dr. Knut ELBERS Y Dr. Gregor MEYERS, domiciliados en Caprino-Veronesse-Str. 4 a, 55435 Gau-Algesheim, Alemania, y Albstraße 1, 72141 Walddorfaeslach, Alemania, respectivamente, declaran ser los únicos y verdaderos inventores de la invención VIRUS ATENUADOS E INOCUOS DE LA DIARREA VIRICA BOVINA PARA USO EN VACAS GESTANTES, y ceden sin limitación a la sociedad BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH, domiciliada en Binger Str. 173, 55216 Ingelheim, Alemania, todos los derechos inherentes a dicha invención. Hay 1 firma de los inventores y 2 de los apoderados de la BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH, Dr. Dieter Laudien y Dr. Heinz-Gerd Kläs.

LUZ ARRIAGA DE HÄRBER
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL

Habilitación No. 589 Minjusticia

80
77

domiciliado en Albstraße 1, 72141 Walddorfhäslach, a quien
conozco en persona.

Tübingen, 09 de marzo 2001

Fdo.: firma ilegible

Notario

Protocolo notarial No.: 108/2001

Costas

Derechos Art. 45 I KostO	DM 20,00
Portes, gastos	DM 9,00
	DM 29,00
IVA 16%	DM 4,64
	DM 33,64

Fdo.: firma ilegible
Notario

(Hilo y oblea notarial en relieve)

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre 1961)

1. País: República Federal de Alemania

Este documento público

2. Ha sido firmado por Klaus Wüst

3. Actuando en calidad de notario

4. Lleva el sello del notario Klaus Wüst, notario de
Tübingen (Tubingia)

Certificado

5. en Tübingen (Tubingia) 6. El 14.3.2001

7 por el Presidente del Tribunal Regional , Dr. Sontag

8. bajo el No. 910I-65/169/2001

LIZ ARRIAGA DE HERBER
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL
[Firma]
Resolución No.549 Minjusticia

81.
78

9. Sello

(Hilo y oblea en relieve del
Tribunal Regional Tübingen

10. Firma

firma ilegible

910I-65/169/2001

Derechos según JVKostO

Anexo Z.1 lit. a bb

de un valor: --,-- DM

DM 20,00

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

Bogotá, 26 de abril 2001.

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2001 MAY -3 P 12:15

LEDA
JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

131201

LEYVA
CUIA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS

LIZ ARRIAGA DE HERBER
TRANSCRIBIDA Y INTERPRETE OFICIAL
Firma: Liz Arriaga de Herber
Habilitación No. 004 Minjusticia

1

PETITORIO



Espacio reservado para el adhesivo de radicación

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE 2000-3

1

SOLICITUD DE:



Patente de Invención



Patente de Modelo de Utilidad

2

SOLICITANTE (71)

Nombre: **BOEHRINGER
INGELHEIM VETMEDICA GmbH**
sociedad constituida y existente bajo las
leyes de Alemania.
Dirección: Binger Strasse 173, D-55216,
Ingelheim am Rheim, Alemania.

Teléfono: 546 09 70
E-mail: clientes@camyp.com
Fax: 249 40 70

Domicilio: D-55216, Ingelheim am Rheim,
Alemania.

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ OTRO ☐

NÚMERO: _____

3

REPRESENTANTE O APODERADO (74)

Nombre: **Emilio FERRERO**
Dirección: Carrera 4ª No. 72-35
Teléfono: 347 38 11
E-mail: cavaller@cavaller.com
Fax: 217 82 11
Domicilio: Bogotá, Colombia

IDENTIFICACION

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Número: 438.019 TP 31.929

4

INVENTOR(ES) (72)

Nombre: 1- Dr. Knut ELBERS
2- Dr. Gregor MEYERS
Dirección:
1-Caprino-Veronese-Str. 4ª, 55435 Gau-
Algesheim, Alemania.
2- Albstrasse 1, 72141 Walddorfhaeslach,
Alemania.

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Número: _____

5

TITULO (54)

**VIRUS ATENUADOS E INOCUOS DE LA DIARREA VÍRICA
BOVINA PARA USO EN VACAS GESTANTES**

6

Clasificación Internacional (51)

7

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

EP.

(32) Fecha

30 de noviembre de 1999

(31) Número de Solicitud

99 123 767.8

8

Para publicar a partir de la fecha de la presente solicitud a los

6 meses ☐ 12 meses ☐ 18 meses ☒ Otro ☐

9

Comprobante de pago No. _____ Fecha _____

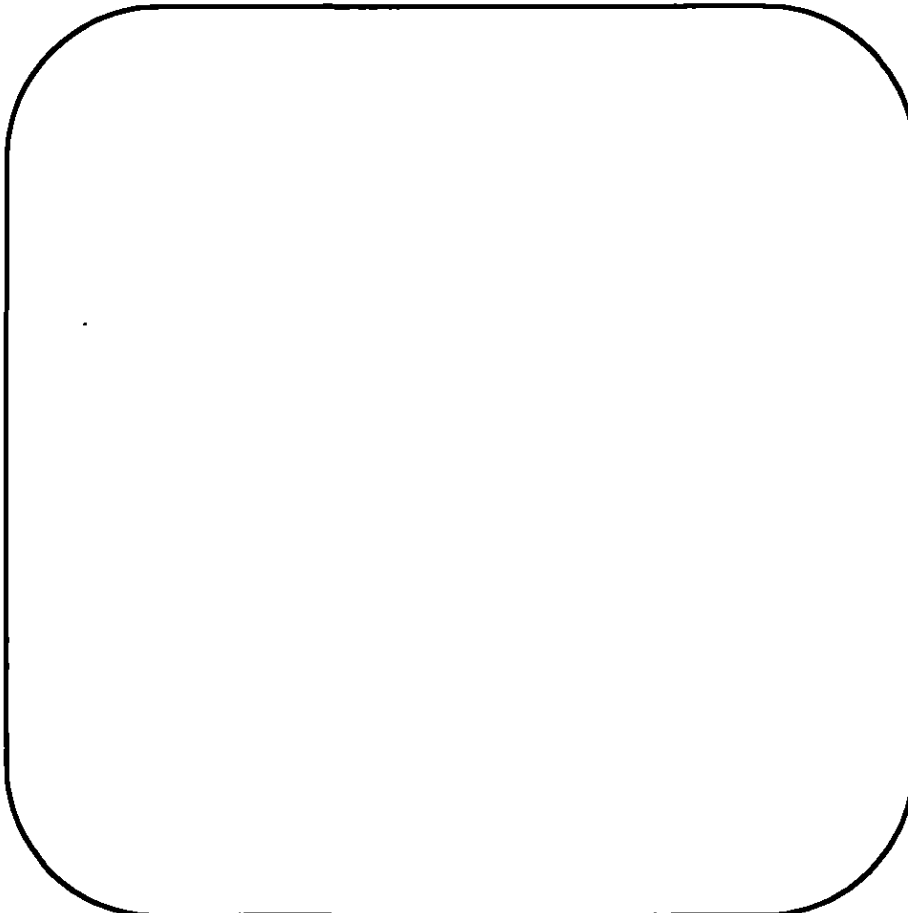
10

ANEXOS

- ☐ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- ☐ Certificado de existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Copia certificada de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Una o más reivindicaciones
- ☐ Dibujos y/o planos necesarios
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

NOMBRE: EMILIO FERREROFIRMA: _____
C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página



8087

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

MIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 01 - 16,201
FECHA : MARZO 12 DE 2001

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	2749335	12/03/2001	36,451,460.00

***** CONCEPTO *****

CANT. CONTABILISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-03 CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	12 MARCAS Y LENAS COMERCIALES	73,440.00
	TOTAL :	\$ 73,440.00

SON: SETENTA Y TRES MIL CUATROCIENTOS CUARENTA PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

66 04.184 - 801 - 007 - 8

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador: 382 0840
Fax: 350 5220
e-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

2do. EXAMEN DE FORMA PATENTE DE INVENCION

Folio 84

Radicación no 00-81439

Concepto Técnico no 0228

Clasificación Internacional de Patentes C12N 15/ 00

Practicado el examen de acuerdo a lo establecido en el Art. 38 de la Decisión 486 se determinó que esta solicitud de Patente de Invención:

- | | | |
|--|-----------------------------|---|
| SI ☒ | NO ☐ | Contiene un resumen de la invención (Art.26-e). |
| SI ☒ | NO ☐ | Contiene el título o nombre de la invención (Art.27-d). |
| SI ☒ | NO ☐ | Contiene la descripción de la invención (Art.26-b). |
| SI ☒ | NO ☐ | NO ES APLICABLE ☐ Contiene los dibujos necesarios para comprender la invención (Art.26-d) |
| SI ☒ | NO ☐ | Contiene una o más reivindicaciones. (Art.26-c). |
| SI ☐ | NO ☐ | NO ES APLICABLE ☒ Han sido desarrollados los productos y/o procedimientos a partir de recursos genéticos o de sus productos derivados de los que cualquiera de los Países Miembros es país de origen. (Art. 26- h). |
| SI ☐ | NO ☐ | NO ES APLICABLE ☒ Los productos y/o procedimientos han sido obtenidos o desarrollados a partir de los conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas, afroamericanas, o locales de los países miembros, de acuerdo a lo establecido en la Decisión 391 y sus modificaciones y reglamentaciones vigentes.(Art.26-l). |
| SI ☒ | NO ☐ | La invención se refiere a un producto relativo a un material biológico. (Art.26-J). |
| SI ☒ | NO ☐ | La prioridad coincide con la materia reivindicada. |
| SI ☒ | NO ☐ | CUMPLE LOS REQUISITOS TÉCNICOS |

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

EXAMINADOR TÉCNICO
202050

Bogotá D. C., ENERO 24 DE 2003

Folio 85

2020
Bogotá DC

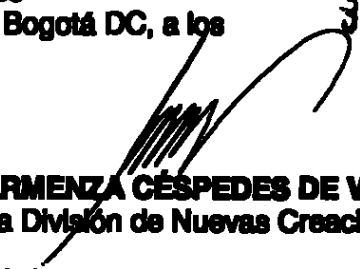
Doctor(a)
EMILIO FERRERO
Apoderado(a)

REFERENCIA:	Radicación No.	0091439
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	416
	Oficio No.	0132
	Folios	001

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en los artículos 26 y 27 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, y en las demás disposiciones vigentes sobre la materia, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial, conforme lo establece el artículo 40 de la misma Decisión.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC, a los

30 ENE. 2003


ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

202050