

Industria y

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-302744- -00000-0000

Fecha: 2013-12-30 15:56:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act. 411 PRESENTACION Folios: 28 **728**

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

**54. TITULO: PROTEÍNA RECOMBINANTE DE LA CÁPSIDE DE
POTATO YELLOW VEIN VIRUS (PYVV) COMO ANTÍGENO
PARA LA OBTENCIÓN/PRODUCCIÓN DE ANTICUERPO PARA
DETECTAR PYVV**

51. CLASIFICACION INTRNACIONAL

**71. SOLICITANTE: UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA
GRANADA, UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA Y
ASOHOFRUCOL**

DOMICILIO: Bogotá, Colombia.

74. APODERADO SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ

22. BOGOTÁ, D.C.

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	Reservado para el adhesivo de radicación SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 13-302744- -00000-0000 Fecha: 2013-12-30 15:56:49 Tra. 2 PATENTES Act. 411 PRESENTACION Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Eve: 1 REGDEPOSITO Folios: 29
--	---

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD DE PATENTE - NACIONAL

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad		
2	TÍTULO DE LA INVENCION (200 caracteres o espacios máximos)		3 CIP Clasificación Internacional de Patentes	
		PROTEÍNA RECOMBINANTE DE LA CÁPSIDE DE POTATO YELLOW VEIN VIRUS (PYVV) COMO ANTÍGENO PARA LA OBTENCIÓN/PRODUCCIÓN DE ANTICUERPO PARA DETECTAR PYVV		
4	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria			
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO
UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA GRANADA, UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA Y ASOHOFRUCOL				
5	DATOS DEL SOLICITANTE			
DIRECCIÓN: Carrera 11 No. 101 – 80 /Av el Dorado No. TELÉFONO 44 A 40 / Cra 10 No 24 – 55 piso 9 CIUDAD: Bogotá, PAÍS DE RESIDENCIA: Colombia. CORREO ELECTRÓNICO LUGAR DE CONSTITUCIÓN: Colombia.				
6	INVENTOR (ES)			
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD	
1. FRANCO LARA ,		Liliana	Colombiana	
2. RODRÍGUEZ BURGOS,		Patricia Andrea	Colombiana	
3.GUZMÁN BARNEY		María Mónica	Colombiana	
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:				
7	DATOS INVENTOR (ES)			
DIRECCIÓN		CIUDAD	PAÍS RESIDENCIA	
1. Carrera 11 No. 101 - 80,		Bogotá,	Colombia	
2. Carrera 11 No. 101 - 80,		Bogotá,	Colombia	
3. Carrera 11 No. 101 - 80,		Bogotá,	Colombia	
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)				
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja de información complementaria.				
8	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO			
APELLIDOS LÓPEZ DÍAZ		NOMBRES SILVANA MARIA	IDENTIFICACIÓN C.C. 22.468.787 T.P. 147463 CSJ	
DIRECCIÓN	Cra. 11 NO. 86-53, Piso 6	No. TELÉFONO	6181088	
CIUDAD	Bogotá	CORREO ELECTRÓNICO:	notificaciones@clarkemodet.com.co	
PAÍS	Colombia	No. RADICACIÓN O	PROTOCOLO DE PODER GENERAL	
9	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☐ SI ☐ NO			
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA(AAA/MM/DD)

4
12

10	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS	
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i>		
☐ SI ☐ NO		
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o numero de registro, expedido por la Autoridad competente.		
11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES	
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i>		
☐ SI ☐ NO		
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado o numero de registro.		
12	REDUCCIÓN DE TASAS	
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i>		
☐ SI ☐ NO		
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.		
13	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO	
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.		
14	PARA PUBLICAR A PARTIR DE LA FECHA DE PRESENTACIÓN O DE LA PRIORIDAD INVOCADA:	15 COMPROBANTE DE PAGO
Si es Patente de Invención ☐ 6 meses ☐ 12 meses ☐ 18 meses ☐ Otro Cual: Inmediato Si es Patente de Modelo de Utilidad ☐ 6 meses ☐ 12 meses ☐ Otro Cual:		N° 13-129175 Fecha : 13/12/2013
16	FIRMA DEL APODERADO	
SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ C.C. 22.468.787 T.P. 147463 CSJ		
17	ANEXOS	
Documentación Técnica 1. ☒ Descripción N° de folios: 22 2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 5 3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 4. ☒ Resumen. 5. ☐ Documento de Prioridad. 6. ☐ Traducción del documento de prioridad. 7. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso. 8. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso. 9. ☐ Arte final 12 x 12. 10. ☐ Anexo formato digital. Documentación Jurídica 11. ☒ Poderes, si fuera el caso 12. ☒ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante. 13. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o numero de registro, si fuera el caso. 14. ☐ Copia de la licencia o autorización de conocimientos tradicionales, o Certificado o numero de registro, si fuera el caso. 15. Reducción de tasas Micro, pequeñas o medinas empresas ☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004. Universidades públicas o privadas ☒ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación Entidades sin ánimo de lucro ☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☐ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar 16. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. 17. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. 18. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación. 19. ☐ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.		

PROTEINA RECOMBINANTE DE LA CÁPSIDE DE *POTATO YELLOW VEIN VIRUS* (PYVV) COMO ANTIGENO PARA LA OBTENCIÓN/PRODUCCIÓN DE UN ANTICUERPO PARA DETECTAR PYVV

5

SECTOR TÉCNICO

La presente invención se relaciona con la obtención de una proteína recombinante a partir del gen de la proteína de la cápside del *Potato yellow vein virus* (PYVV) llamado en español, Virus del amarillamiento de las nervaduras de la hoja de la papa, que se utiliza como inmunógeno para la obtención de un anticuerpo para la detección sensible y eficiente del virus PYVV en plantas e insectos infectados.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El centro de diversidad de la papa son los países andinos como Perú, Bolivia, Ecuador y Colombia. La papa se cultiva en más de 100 países, con temperaturas entre 10 y 30°C y alturas entre los 0 m.s.n.m. y 3500 m.s.n.m. La producción de papa a nivel mundial fue catalogada en el año 2008, como el cuarto producto en la producción agrícola.

En Colombia, en 2010, se sembraron 133,865 Ha con una producción de 2,788,050 Ton (Revista Fedepapa, 26 diciembre 2012). El cultivo es fuente de empleo, generando 20 millones de jornales al año y se benefician más de 110.000 familias de los departamentos productores, principalmente Cundinamarca, Antioquia, Nariño, Boyacá y Santander.

La actividad genera divisas para el país por exportación de papa fresca a Venezuela y procesada a Estados Unidos, Japón y Asia entre otros países (Guía Ambiental de la papa, 2004). En 2010 por ejemplo, se exportaron a países libres de PYVV 168,73 ton para uso como tubérculos semilla de papa, papas frescas o refrigeradas, papas cocidas o preparadas (Agronet, 2012).

La exportación de tubérculos supone garantizar que el material que se exporta está libre de patógenos. Desde el año 2007, el PYVV está reportado como cuarentenario por las agencias internacionales EPPO (europea) y APHIS (americana) y también se considera en Perú como un virus cuarentenario y limitante para la producción de papa en dicho país. Hasta el momento no existen a

2
3

nivel nacional o mundial esquemas de detección serológica de PYVV que garanticen la inocuidad del material vegetal y de semillas- tubérculos que se exporta y por esta razón se requiere de un anticuerpo que permita certificar el material antes del envío. PYVV también infecta otros cultivos de tomate de árbol,
 5 tomate común, malezas, entre otros (Morales et al., 2009).

Más de 35 virus pueden infectar a la papa produciendo pérdidas de producción entre 25% a 80%, dependiendo del tipo de virus, la variedad de papa, condiciones ambientales y si se encuentra en mezclas con otros virus (Salazar et al., 2000; Saldarriaga et al., 1985; Guzmán et al., 2011).

- 10 Los virus PLRV (*Potato leaf roll virus*), PVY (*Potato virus Y*), PVA (*Potato virus A*), PVX (*Potato virus X*), PMTV (*Potato mop top virus*) y PVS (*Potato virus S*) son considerados los más importantes en cuanto a su distribución y a los efectos sobre el rendimiento (Barker and Dale, 2006). Para la detección serológica de estos virus existen anticuerpos comerciales reportados (AGDIA, BIOREBA, SANOFI). El uso
 15 intensivo de tubérculo-semilla infectado con virus es la principal causa de diseminación de las enfermedades virales, sumada a la insuficiente asistencia técnica y la falta de buen manejo de los insectos vectores.

En la certificación de semillas-tubérculos de papa libre de virus se utilizan anticuerpos de diferentes casas comerciales por la técnica de ELISA (Ensayo de
 20 ligamiento enzimático por inmunoabsorción) que reconocen de forma específica los virus más importantes__ (PLRV, PVY, PVX, PVS). La técnica de IMI (Inmunoimpresión) también se reportó para la detección serológica de virus de papa (Guzmán et al., 2002).

Particularmente para el virus PYVV, a partir de los años 1950 se detectó en
 25 Colombia, el cual se diseminó a los diferentes departamentos paperos colombianos y a otros países andinos como Ecuador, Perú y Venezuela. PYVV produce pérdidas significativas en la producción en papa de año y criolla (Salazar et al., 2000; Guzmán et al., 2012). El PYVV se propaga por tubérculos infectados que se re-siembran de un cultivo a otro y que sirven de tubérculo-semilla
 30 (Saldarriaga et al., 1988). También se disemina por vector natural mosca blanca (*Trialeurodes vaporariorum*) (Buriticá, 1970, Salazar et al., 1998). Además PYVV puede infectar a otros cultivos diferentes de la papa como por ejemplo, tomate

común y de árbol, o malezas, los cuales son hospederos del vector mosca blanca, *T. vaporariorum*.

El virus PYVV (familia *Closteroviridae*, género *Crinivirus*) es el agente causal de la enfermedad del amarillamiento de las nervaduras de la hoja de la papa. Produce
5 síntomas de clorosis en diferentes grado de las hojas que se manifiesta como pérdidas en la producción (Salazar *et al.*, 2000). Contiene un genoma tripartita de RNA (ss+) con 17.000 nucleótidos aproximadamente.

Los viriones se limitan al floema de la planta y son filamentosos (Salazar *et al.*, 2000; Livieratos *et al.*, 2004). La incidencia de PYVV en 2008 varió entre el 1% y
10 el 10 % dependiendo del departamento y del municipio (Franco *et al.*, 2009) con estimativos de reducción de la producción de un 25% a 50% (Guzmán *et al.*, 2012; Salazar *et al.*, 2000). Como anteriormente se manifestó, PYVV, se considera como un patógeno cuarentenario por agencias de inspección sanitaria como la EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) y APHIS, 2007
15 (Animal and Plant Health Inspection Service), así como por los países andinos.

Hasta la fecha, el diagnóstico de PYVV se realiza por técnicas moleculares como RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa mediada por transcriptasa reversa) (Salazar *et al.*, 2000; Offei *et al.*, 2004; Guzmán *et al.*, 2006), qRT-PCR (RT-PCR en tiempo real) (López *et al.*, 2006) y NASH (Salazar *et al.*, 2006). Estas técnicas
20 son costosas, requieren de equipos sofisticados y personal altamente entrenado.

Adicionalmente, se conoce el documento de patente US5714312, el cual reporta un método para detectar y cuantificar patógenos virales y subvirales a través de muestras de plantas enfermas. Así, la muestra es puesta en contacto con el anticuerpo inmovilizado y luego a un "primer" o cebador de ADN complementario
25 o a un fragmento del genoma viral se le permite hibridar con el ADN o ARN del patógeno viral inmovilizado. Posteriormente el ADN es amplificado y los productos de la amplificación son detectados y cuantificados. Este método permite la detección de virus de plantas con diferentes características como son tobamovirus, potyvirus, closterovirus, luteovirus, nepovirus, cucumovirus y
30 tospovirus.

Por otra parte, el documento de patente US20070026390 revela el desarrollo de un kit de diagnóstico que usa un anticuerpo que reconoce la coat-protein – CP o

proteína de la cápside del virus *Prunus necrotic ringspot* en plantas. Para lo anterior, amplificaron el gen de la CP con cebadores diseñados. .. El gen de la proteína de la cápside fue clonado y secuenciado para confirmar la identidad del amplicon. Este fue luego clonado en el vector de expresión pGEX-2TK y la cepa de *E. coli* BL21 fue transformada con el vector recombinante pGEX-2TK que contenía el gen de la proteína CP del virus. Aquí, las condiciones de expresión como la temperatura de inducción y la concentración de IPTG fueron estandarizados para obtener una expresión óptima de la proteína CP del virus. La expresión óptima se encontró a 30°C y en una concentración de IPTG de 1 mM.

Seguidamente, dos conejos fueron inmunizados semanalmente con 100 microgramos de la proteína purificada intramuscularmente, subcutáneamente y una vez intravenosamente con la misma cantidad de proteína. Los conejos fueron sangrados después de 15 días y los anticuerpos fueron purificados y el suero fue almacenado a -20°C. En una de sus versiones esta patente describe, que al preparar los anticuerpos policlonales para la proteína de cubierta del virus, estos pueden ser aplicados en un ensayo de ELISA tipo "direct antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay - (DAS ELISA)" que permite la detección del virus a partir de muestras de plantas infectadas.

Teniendo en cuenta el estado de la técnica en este campo, es evidente que existe aún la necesidad de obtener una proteína recombinante a partir del gen de la proteína de la cápside de PYVV, que tenga capacidad antigénica y que pueda ser aplicada como inmunógeno para la obtención/producción de un anticuerpo para la detección sensible y eficiente del virus PYVV en plantas e insectos infectados.

Aunque en el estado del arte es conocida la posibilidad de obtener anticuerpos a partir de proteínas recombinantes para la detección serológica de virus (Iracheta, M., Rocha, M. 2007. Producción y evaluación de anticuerpos desarrollados contra la proteína recombinante de la cápside del virus de la tristeza de los cítricos. Ciencia UANL, vol. 10 (4): 392-399), no se reporta esta tecnología para la generación de anticuerpos capaces de reconocer PYVV, mediante métodos de detección serológica.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con la obtención de una proteína recombinante a partir del gen de la proteína de la cápside del *Potato yellow vein virus* (PYVV) que se utiliza como inmunógeno para la obtención de un anticuerpo para la
5 detección sensible y eficiente del virus PYVV en plantas e insectos infectados.

Otro objeto de la invención es el Anticuerpo policlonal anti-PYVV obtenido empleando como antígeno la proteína recombinante de la presente invención, el cual se une a epítopes de la proteína de la cápside de PYVV ya sea recombinante o expresada por el virus en plantas o insectos infectados.

10

Además, dicho anticuerpo detecta la presencia de la proteína de la cápside viral del virus del POTATO YELLOW VEIN VIRUS (PYVV) de las nervaduras de la hoja de papa.

15

Aún otro objeto de la presente invención es el uso del anticuerpo obtenido por la proteína recombinante de la invención en ensayos de ELISA, IMI, Western blot, inmunohistoquímica (microscopía electrónica y de luz) y otros relacionados para la detección la presencia de la proteína de la cápside de PYVV en plantas o insectos infectados.

20

La presente invención también se encuentra dirigida a la obtención de un anticuerpo obtenido por métodos biotecnológicos que reconoce una gama de variantes virales de PYVV provenientes de material vegetal y de insectos portadores del virus.

25

El anticuerpo anti- PYVV fue obtenido a partir de la inmunización de animales con la proteína recombinante de la cápside del virus PYVV producida por métodos biotecnológicos por los inventores. La proteína recombinante obtenida es diferente de la proteína natural puesto que se incluyó un set (tag) de 6 histidinas utilizado
30 para reconocer la proteína con un anticuerpo anti-histidinas y para concentrarla. Particularmente, la invención hace referencia al anticuerpo obtenido por la reacción antigénica producida cuando un animal es expuesto a la proteína recombinante de la cápside del PYVV de acuerdo con la invención. En dicha respuesta antigénica el animal inmunizado produce una alta cantidad de

6
7

inmunoglobulinas gama (antisuero) las cuales se purifican (anticuerpo) y se prueba al exponerlo al material de prueba (anticuerpo anti- PYVV).

- La proteína de la cápside viral PYVV, está definida por la secuencia putativa de aminoácidos que se deriva de la secuencia del gen de la proteína de la cápside viral (CP) reportada en el GenBank (SEQ ID No. 1). La secuencia de nucleótidos del gen CP se puede modificar al adicionar o suprimir nucleótidos en cualquier extremo o en ambos, que deriven en cambios menores que no afecten la expresión exitosa de la proteína. La proteína en la que se incluye el set de histidinas, se expresó *in vitro* (utilizando un sistema comercial de expresión de proteínas) del cual se puede recuperar la proteína recombinante expresada para utilizarse como un antígeno o inmunógeno en la obtención-producción de anticuerpos específicos anti-PYVV.
- Los inventores, tratando de encontrar una solución a la deficiencia de anticuerpos anti-PYVV útiles en el uso de pruebas de detección serológica, utilizaron una estrategia de DNA recombinante para lo cual identificaron y amplificaron el gen de la proteína de la cápside.
- Se obtuvo la proteína recombinante de la CP de PYVV en un sistema heterólogo de expresión. Se empleó para esto el plásmido pBAD/HisA (Invitrogen), el cual fue insertado en células de *E. coli* cepa TOP10. La inducción de la expresión se ensayó a diferentes concentraciones de L-arabinosa, determinando que la expresión de saba a concentraciones tan bajas como 0,05% en el medio de cultivo durante 4 horas. La purificación de la proteína se realizó en Columnas de cromatografía de níquel, presentando una buena recuperación de proteína que fue empleada exitosamente en la inmunización de animales y así obtener anticuerpos específicos anti-PYVV.
- Por tal razón la presente invención no se limita a las secuencias génicas y proteicas expuestas anteriormente, sino que también incluye secuencias derivadas obtenidas por sustituciones, adiciones, inclusiones o supresiones de nucleótidos y aminoácidos con el fin de mejorar la efectividad o eficiencia en la obtención de anticuerpos anti-PYVV.

La eficiencia del anticuerpo anti-PYVV para la detección sensible y específica del virus se evaluó con tres métodos serológicos ELISA, IMI (inmunoimpresión o Western Blot. Cualquiera de estos métodos permite el diagnóstico de PYVV en semillas-tubérculos, diferentes órganos o tejidos de papa, o de órganos o muestras de otras plantas e insectos infectados con el PYVV.

La detección del virus PYVV es un requisito para las instituciones certificadoras de semillas como el ICA en Colombia y otros países para los cuales el virus es cuarentenario. Por lo tanto, con el anticuerpo producido con la proteína recombinante de la presente invención se podrán aplicar métodos serológicos eficaces (especialmente ELISA, IMI pero también Western Blot o metodologías de Inmunohistoquímica (microscopía electrónica y de luz)) que reducen efectivamente el tiempo del diagnóstico viral y no requieren de equipos sofisticados y requieren de personal con un entrenamiento básico. Lo anterior deberá redundar en control del patógeno y beneficio para los agricultores.

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1. Presenta los resultados de titulación de los anti-sueros obtenidos para el esquema de inmunización 1B, frente a la proteína recombinante de CP (PYVV), las barras claras representan los resultados para los sueros pre-inmunes y las barras negras los resultados para el suero obtenido al final del esquema de inmunización. Se evaluaron las reacciones para diluciones del suero de 1:100, 1:200 y 1:1000 a los 30, 60 y 90 minutos.

Figura 2. Histograma de densidades ópticas (D.O) obtenidas por ELISA-DAS directo con el anticuerpo de la invención sobre muestras de *S. tuberosum* y *S. phureja* que fueron clasificadas previamente como positivas por RT-PCR. El umbral de detección fue de 0.232 D.O.. Las muestras no sintomáticas, negativas por RT-PCR p595, p51, S830, CHA28 se encontraban debajo del umbral de detección.-. Los controles negativos son nombrados como *planta de papa in-vitro* y cítrico-calamondino. La muestra sintomática positiva 816 presentó resultados claramente positivos sobrepasando la densidad óptica en 9 veces al de los resultados de los controles negativos. de los controles negativos.

Figura 3. Histograma de densidades ópticas (D.O) obtenidas por ELISA-DAS directo de muestras que fueron clasificadas previamente como positivas por RT-PCR, de *S. tuberosum* y *S. phureja* frente al anti-PYVV de la invención. Detección con el anticuerpo anti PYVV en muestras de diferentes plantas sintomáticas de papa claramente positivas para PYVV *versus* las negativas (762, 764, 772) y los controles (papa *in vitro* y calamondino).

Figura 4. Técnica de inmunopresión (IMI) sobre membrana de nitrocelulosa. Detección positiva de los acúmulos virales en las impresiones de tejido expuestas al anticuerpo anti PYVV. Abajo muestra negativa sin acúmulos virales.

Figura 5. Detección por Western Blotting de la cápside de PYVV producida en los clones A y B mediante los anticuerpos anti-PYVV obtenidos en este trabajo. La flecha azul indica la presencia de la proteína del tamaño esperado marcada con el anti-PYVV.

Figura 6. Western blot. Carril 1: marcador de peso molecular. Carriles 2 y 3, electroforesis de proteínas totales obtenidas a partir de una hoja infectada con PYVV. Carriles 4 y 5: Detección de la proteína de cápside de PYVV con el anticuerpo anti PYVV.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Para la generación de anticuerpos contra PYVV, se utilizó la técnica presentada por Sequeira y Nolasco (2002). Básicamente, se amplificó por RT-PCR el gen de la proteína de la cápside (CP) del PYVV utilizando los cebadores PYVVCPF (5_-ATGGAAATCCGATCGTGGAACCT-3_) PYVVCPR (5CTACTCAATAGATCCTGCTA-3_) que amplifican un fragmento de 757 pb a partir de los extremos del gen de la CP (Offei *et al.*, 2004), a partir de la secuencia completa de este virus, anteriormente publicada (Livieratos *et al.*, 2004). El producto de PCR se clonó en un vector pGEMT-3Z de la casa comercial Promega y para la expresión de la proteína de la cápside, el inserto se sub-clonó en un vector de expresión de la casa Invitrogen, el cual adiciona una cola (set-tag) de 6 histidinas en el extremo N terminal.

Mediante la secuenciación de los clones, se confirmó que el gen de la CP se encontraba en el marco de lectura correcto. Con el plásmido que contenía el inserto (gen de la CP) de interés en el marco de lectura correcto, se realizó la transformación química de células competentes de *E. coli DH5α* (Invitrogen). Este método permite la expresión de una proteína de fusión que posee una cola de 6 histidinas (CP unida a 6 histidinas), la cual se expresa mediante inducción con arabinosa. La proteína recombinante obtenida se purificó del lisado celular por cromatografía en columnas de afinidad. La proteína recombinante de la CP purificada se empleó como antígeno en la inmunización de animales que producen inmunoglobulinas (conejos).

Se siguió un protocolo estándar de inmunizaciones según lo reportado en la literatura, empleando adyuvante completo de Freund (adquirido comercialmente) en la primera inmunización y las subsiguientes inmunizaciones con adyuvante incompleto, utilizando entre 20 y 800 ng de proteína recombinante de la cápside de PYVV obtenida en la presente invención. Se realizaron hasta 7 inmunizaciones en un periodo de 3 meses, repitiendo las inmunizaciones con frecuencias de entre 14 y 30 días. Se hicieron sangrados entre 10 y 25 días después de cada inmunización. El antisuero del último sangrado se purificó por cromatografía de afinidad en columnas con proteína A-Sefarosa.

Se evaluaron los antisueros a través de las metodologías de ELISA, IMI y Western blot empleando la proteína recombinante obtenida que es reconocida por los anticuerpos, y también diferentes muestras de papa positivas y negativas en las que previamente se había confirmado la infección por PYVV utilizando la técnica molecular de RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa mediada por transcriptasa reversa). Como controles se emplearon extractos de plantas de papa libres de virus provenientes de cultivo de meristemos, extractos de cítricos-calamonido infectados con otro *Closteroviridae* (CTV- *Citrus tristeza virus*).

Se probaron diferentes diluciones de antisueros obtenidos (1:50 a 1:10.000) mediante la técnica reportada de ELISA-DAS directo estándar (Cambra *et al.*, 1995) usando extractos de plantas de papa de campo y de la Colección Central Colombiana de Papa infectadas con PYVV (Figura 1, 2 y 3). Se utilizaron como controles negativos extractos de plantas de papa libres de PYVV y de plantas infectadas con otros virus de la misma familia. Los ensayos se hicieron por

duplicado y se consideró una muestra positiva cuando su OD (densidad óptica) era el doble de la OD del control negativo. No se encontraron reacciones cruzadas y se pudo demostrar la especificidad y sensibilidad del anticuerpo de esta invención para la detección de PYVV.

5

Adicionalmente, los anticuerpos (diluciones 1:50 a 1:10.000) obtenidos con la proteína recombinante se emplearon en la metodología de IMI, para la detección del virus sobre impresiones sobre membranas de nitrocelulosa de plantas infectadas con PYVV siguiendo la metodología de Guzmán *et al.* (2002). La
 10 detección se hizo usando como sustrato de la fosfatasa alcalina NBT/BCIP (Sigma). La coloración oscura (violeta) indica la presencia de cúmulos de virus sobre el tejido vegetal (Figura 4) de forma específica sobre el floema de las plantas infectadas lo que evidencia la especificidad del anticuerpo de la invención, pues es conocido que PYVV solo infecta el floema. Las plantas negativas no
 15 presentan coloración. Todas las muestras sintomáticas evaluadas por IMI, en las cuales se había detectado molecularmente el virus, fueron positivas por IMI. Los anticuerpos también detectaron la presencia de la cápside de PYVV en extractos de proteínas totales migrados en electroforesis en gel de poliacrilamida transferidos a membranas de nitrocelulosa (técnica llamada Western blot) (Figura
 20 5).

Referencias

- Agronet. 2012.
 25 <http://www.agronet.gov.co/agronetweb1/Estad%C3%ADsticos/ReportesEstad%C3%ADsticos.aspx>. Accedido 7 de octubre de 2012.
- APHIS. 2009. Notification of State of Agriculture. Conditions for Import of Seed Potatoes from the United States of America B.E. 2552.
http://moacdc.thaiembdc.org/pdfs/USA_Seed%20Potatoes_ENG.pdf. Acceded
 30 June 12 2011.
- Barker, H. and Dale, MFB. 2006. Resistance to viruses in potato. In: Natural Resistance Mechanisms in Plant Viruses. Eds. G. Loebestain and J.P. Carr. Springer.

35

11
 +2

- Buriticá, P. 1971. Estudios de Transmisión del Amarillamiento de las Venas de la Papa. Informe Anual. Programa de Fitopatología ICA. (Bogotá-Colombia). 111-113.
- 5 Cambra, M., Garnsey, S. M., Camarasa, E., Gorris, M. T., Henderson., C.T. Roman, M.P. and Vela., C. 1995. Use of a combination of monoclonal antibodies for universal detection of citrus virus (CTV). Proceedings of the XIII Conference of the International Organization of Citrus Virologists, Fuxhou, China.
 - 10 European and Mediterranean Plant Protection Organization. 2009. EPPO quarantine pest. EPPO Standards. http://archives.eppo.org/EPPOStandards/PM1_GENERAL/pm102%2818%29_A1A2_2009.pdf . Acceded 19 June 2011
 - 15 Franco-Lara, L., A. Villamil, A. Guateque, and M. Guzman-Barney. 2009. Evidence of latency in tubers and plants of *S. phureja*. *Phytopathology* 99: S37.
- Guía Ambiental para el cultivo de la papa, 2004. <http://www.minambiente.gov.co/documentos/papa.pdf>. Acceded 23 June 2011
- 20 Guzmán, M., Caro, M., García, Y. 2002. Técnica de inmunopresión en membranas de nitrocelulosa: una detección rápida para estimar la incidencia de los virus PLRV, PVX, PVY y PVS que infectan a la papa *Solanum spp.* *Revista Colombiana de Biotecnología* 5: 45 – 51.
 - 25 Guzmán-Barney, M., Franco-Lara, L., Rodríguez, D., Vargas L. and Fierro, J.E. 2012. Yield Losses in *Solanum tuberosum* Group Phureja Cultivar Criolla Colombia in Plants with Symptoms of PVV in Field Trials. *American Journal of Potato Research* 89, VVVV.
 - 30 Guzmán, M., Ruiz, E., Arciniegas N., Coutts, R. 2006. Occurrence and Variability of *Potato yellow vein virus* in three Departments of Colombia. *Journal of Phytopathology*, 154: 748-750.
- Livieratos, I., E. Eliasco, G. Muller, R. Olsthoorn, , L. Salazar, W. Pleij, and R. Coutts. 2004. Analysis of the RNA of Potato yellow vein virus: evidence for a

tripartite genome and conserved 3'-terminal structures among members of the genus Crinivirus. *Journal of General Virology* 8: 2065–2075.

- 5 López, R., C. Asensio, M. Guzman-Barney, and N. Boohman 2006. Development of real-time and conventional RT-PCR assays for the detection of potato yellow vein virus (PYVV). *Journal of Virological Methods* 136: 24–29.

- 10 Offei, S., Arciniegas N., Muller G., Guzmán M., Salazar L., Coutts R. 2004. Molecular variation of *Potato yellow vein virus* isolates. *Archives of Virology*, 149: 821-827.

- 15 Salazar, L. 1997. La enfermedad del amarillamiento de las venas de la papa: Evidencia de la Presencia de un Virus Inusual. *Agroenfoque* 12:24-26.

Salazar, L., G. Muller, M. Querci, J. Zapata, and R. Owens. 2000. Potato yellow virus: its host range, distribution in South America and identification as a *Crinivirus* transmitted by *Trialeurodes vaporariorum*. *Annals of Applied Biology* 137: 7-19.

- 20 Salazar, L. 2006. Emerging and Re-emerging Potato Diseases. *Potato Research* 49: 43-47.

- 25 Saldarriaga A., A. Alvarez, and J. Jaramillo. 1988. Efecto del amarillamiento de venas transmitido por *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) en papa. *Revista Colombiana de Entomología* 14:3-8.

Sequeira, Z. and Nolasco, G. 2002. Bacterial expressed coat protein: developement of a single antiserum for routine detection of citrus tristeza virus. *Phytopathologia Mediterranea* 41, 55-62.

REIVINDICACIONES

1. Una proteína recombinante de la cápside de PYVV caracterizada porque comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 2:
5 HHHHHHMDPHGNPIVEPESSNSPESAGVSFTDSQKPPVDRKVKDDSYNLDLLIS
NVGRRDDIISPDDMSLDKLSKIQVRADRGDVLNDEDKLIFEGCLKNFCKRLTGVDP
DPETFLGFFMSVAQMSLNQSTSVKNRKNLQLKNYLKIGDKEYIWKTADLLNYLSG
QFPNKS NPLRQYMRLCENQIEMLKSSGKIVSDGHLAATHGTTSQYFSSVGDYVN
GSKTNISDDDLTANYL FKNAATKSTKKT KSIYNVAQLAGSIE.
10
2. Un Anticuerpo policlonal anti- PYVV obtenido empleando como antígeno la proteína recombinante de la reivindicación 1.
3. Un anticuerpo de acuerdo con las reivindicación 2, caracterizado porque se
15 une a epítopes de la proteína de la cápside de PYVV ya sea recombinante o expresada por el virus en plantas o insectos infectados.
4. Un anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 2 y 3, caracterizado porque detecta la presencia de la proteína de la cápside viral del virus del
20 POTATO YELLOW VEIN VIRUS (PYVV) de las nervaduras de la hoja de papa, donde los anticuerpos son obtenidos a partir de un animal que ha sido inmunizado con la proteína recombinante expresada.
5. Un anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 2, 3 y 4 caracterizado
25 porque se usan en ensayos de ELISA, IMI, Western blot, inmunohistoquímica (microscopía electrónica y de luz) para la detección la presencia de la proteína de la cápside de PYVV en plantas o insectos infectados.

RESUMEN

La presente invención se relaciona con la obtención de una proteína recombinante a partir del gen de la proteína de la cápside del *Potato yellow vein virus* (PYVV) llamado en español, Virus del amarillamiento de las nervaduras de la hoja de la
5 papa, que se utiliza como inmunógeno para la obtención de un anticuerpo para la detección sensible y eficiente del virus PYVV en plantas e insectos infectados.

5

Listado de secuencias

SEQ ID No. 1

SECUENCIA DEL GEN y DE LA PROTEINA DE LA CAPSIDE DE PYVV INFORMADA

10 EN Gene Bank

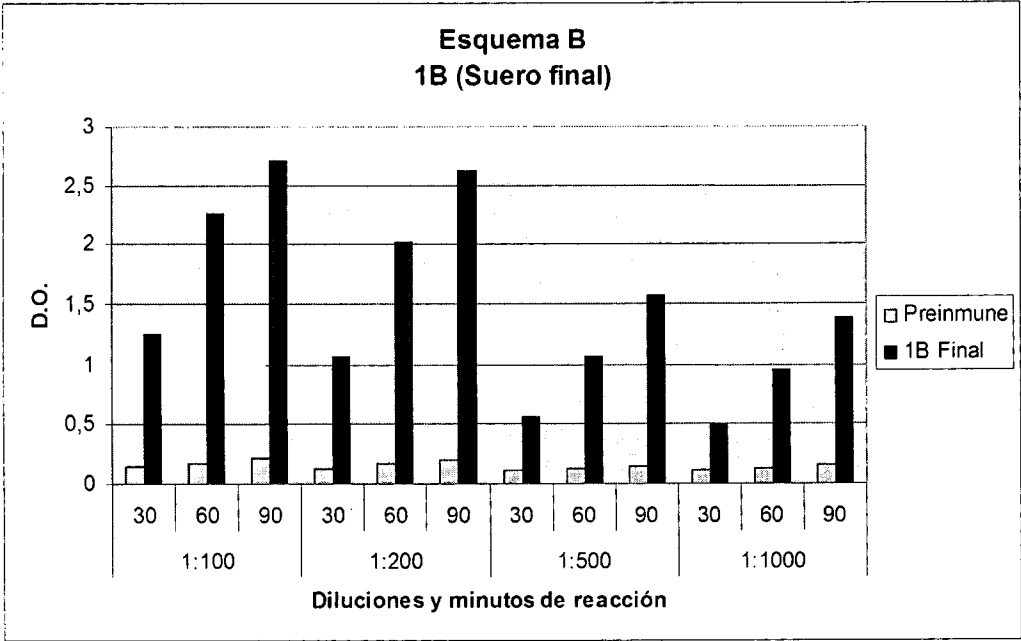
Gen coat protein gene

gi|330434932|gb|JF718314.1| Potato yellow vein virus clone 1093d coat protein (cp)
gene, complete cds

ATGGATCCTCATGGAAATCCGATCGTGGAACCTGAGTCTAGTAACTCCCCTGAATCTGCAG
15 GTGTGTCATTTACCGATTACAAAAACCTCCTGTAGATCGGAAAGTAAAAGATGACTCGTA
CAATTTAGATCTCTTGATCTCCAATGTTGGGAGACGGGATGATATTATATCTCCTGATGAT
ATGAGTCTTGACAACTTTCAAAGATTGAGGTTAGAGCAGACAGAGGAGATGTCTTGAAT
GATGAAGATAAATTAATCTTTGAAGGTTGTTTGAAGAACTTTTGCAAAGATTGACTGGA
GTTGATCCAGATCCTGAGACCTTTCTTGGGTTCTTCATGAGTGTAGCTCAAATGTCATTAA
20 ATCAATCTACTTCTGTAAAAACAGAAAGAATCTCCAGTTGAAGAATTATTTAAAAATAG
GAGATAAAGAATATATTTGGAAGACCGCCGACTTGTTGAATTACTTGTCTGGACAGTTTCC
GAATAAGAGTAATCCACTGAGACAATATATGAGATTGTGCGAAAATCAAATTGAAATGCT
GAAATCTTCTGGTAAGATAGTCAGTGATGGTCATCTCGCTGCCACACATGGTACGACCTCT
CAGTATTTCTCGTCAGTCGGAGATTATGTCAATGGTTGAAAACCAACATTTCTGATGATG
25 ATTTGACTGCAAATTACCTGTTCAAGAATGCAGCAACTAAGAGTACTAAGAAGACAAAATC
AATTTATAATGTCGCTCAATTAGCAGGATCTATTGAGTAG

SEQ ID No. 2**PROTEINA de cápside de PYVV**

HHHHHHMDPHGNPIVEPESSNSPESAGVSFTDSQKPPVDRKVKDDSYNLDLLISNVGRRDD
IISPDDMSLDKLSKIQVRADRGDVLNDEDKLIFEGCLKNFCKRLTGVDPDPEFLGFFMSVAQ
5 MSLNQSTSVKNRKNLQLKNYLKIGDKEYIWKTADLLNYLSGQFPNKS NPLRQYMRLCENQI
EMLKSSGKIVSDGHLAATHGTT SQYFSSVGDYVNGSKTNISDDDLTANYLFKNAATKSTKKT
KSIYNVAQLAGSIE



5

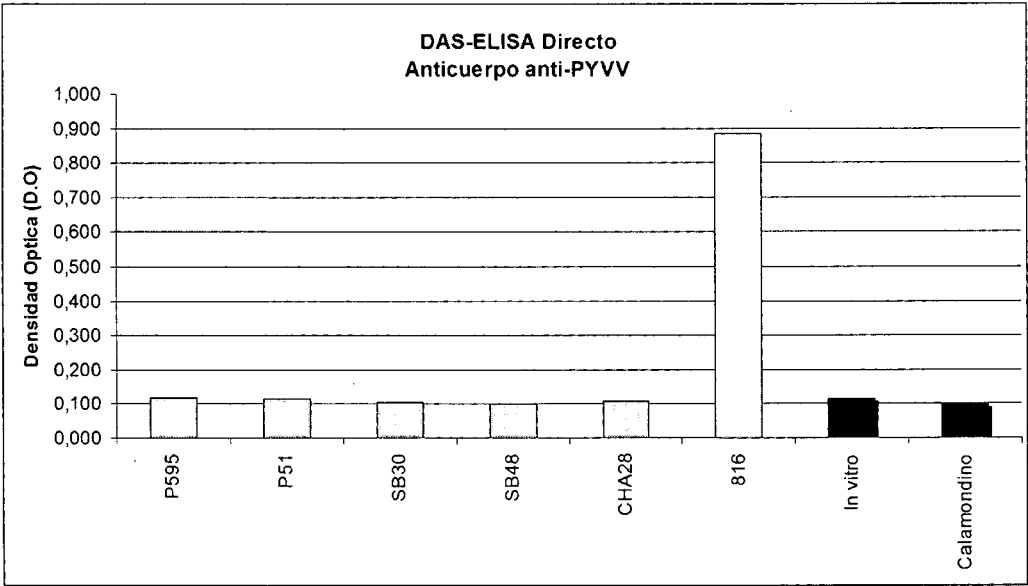
FIGURA 1.

10 Evaluación por la técnica de ELISA –DAS de diferentes diluciones del antisuero (1B) anti-PYVV obtenido con la proteína recombinante de la cápside de PYVV expuesto la proteína recombinante. Se compara la respuesta del antisuero antes de la inmunización del conejo con el antígeno y después de la inmunización con el mismo.

15

18
17

5



10

Figura 2

Histograma de densidades ópticas (D.O) obtenidas por ELISA-DAS directo de muestras de *S. tuberosum* y *S. phureja* que fueron clasificadas previamente como negativas por RT-PCR (p595, p51, S830, CHA28) comparadas con una muestra sintomática positiva mediante RT-PCR (816), frente al anti-PYVV recombinante. El umbral de detección fue de 0.232.

15

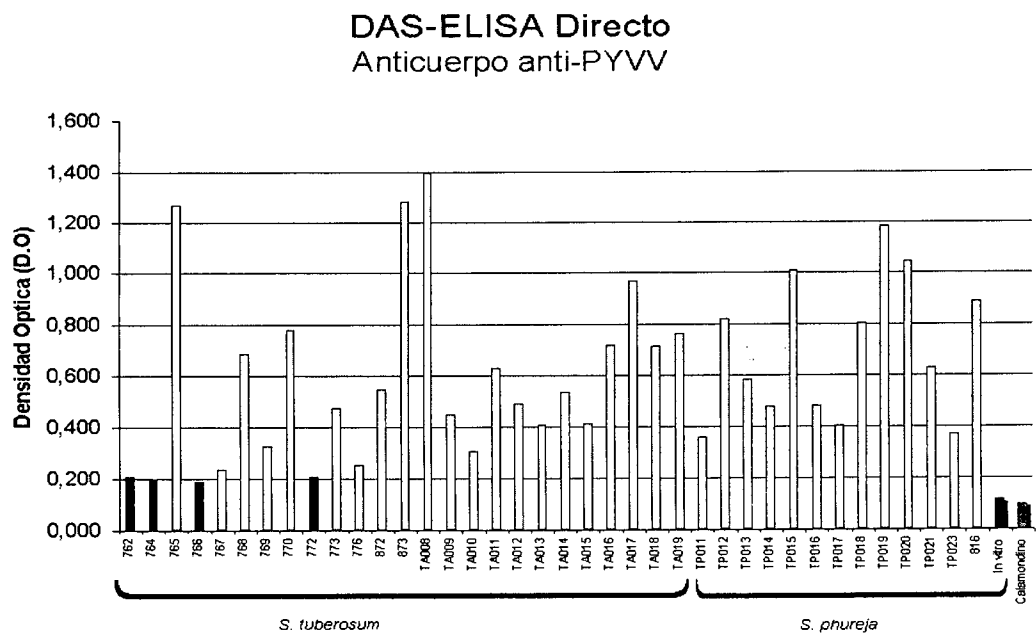


FIGURA 3

5 Histograma de densidades ópticas (D.O) obtenidas por ELISA-DAS directo de muestras de *S. tuberosum* y *S. phureja* que fueron clasificadas previamente como positivas o negativas por RT-PCR, frente al anti-PYVV recombinante. Las muestras negativas 762, 764 y 766 no reaccionaron en presencia del anticuerpo generado.

10

15

20

20
21

Inmunoimpresión de peciolo y tallo de *S. tuberosum* con detección positiva para PVV (flecha) por el anticuerpo anti PVV. El control negativo en recuadro abajo.

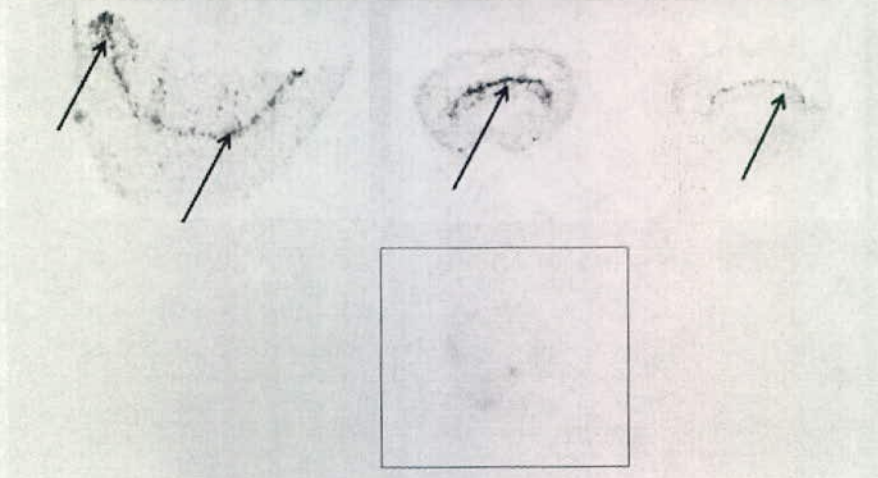


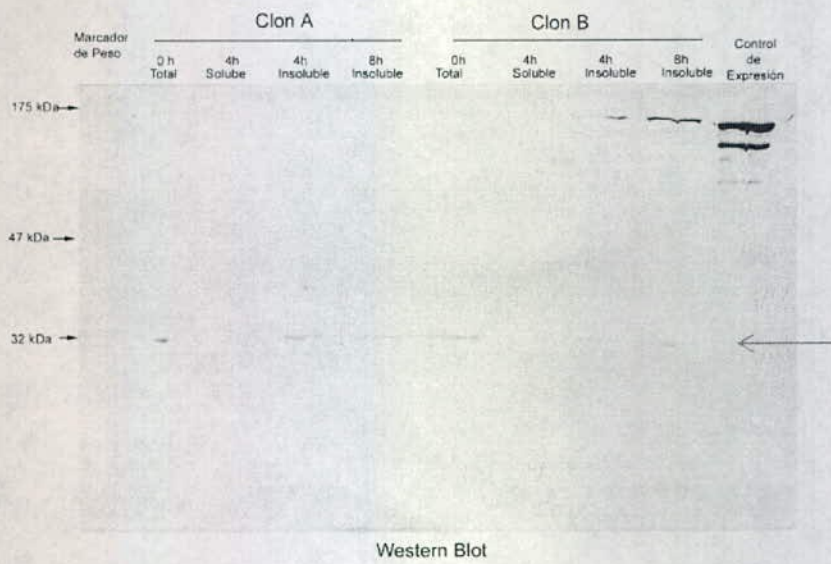
FIGURA 4.

5

Técnica de inmunoimpresión sobre membrana de nitrocelulosa. Arriba, detección positiva de los acúmulos virales en las impresiones de tejido expuestas al anticuerpo anti PVV. Los acúmulos se presentan exclusivamente en el floema de las plantas infectadas, característica particular de PVV. La señal positiva es

10

indicada por las flechas. Abajo se muestra negativa sin acúmulos virales.

**FIGURA 5.**

- 5 Detección por Western Blotting de la cápside de PYVV producida en los clones A y B mediante los anticuerpos anti-PYVV obtenidos en este trabajo. La flecha azul indica la presencia de la proteína del tamaño esperado marcada con el anti-PYVV.

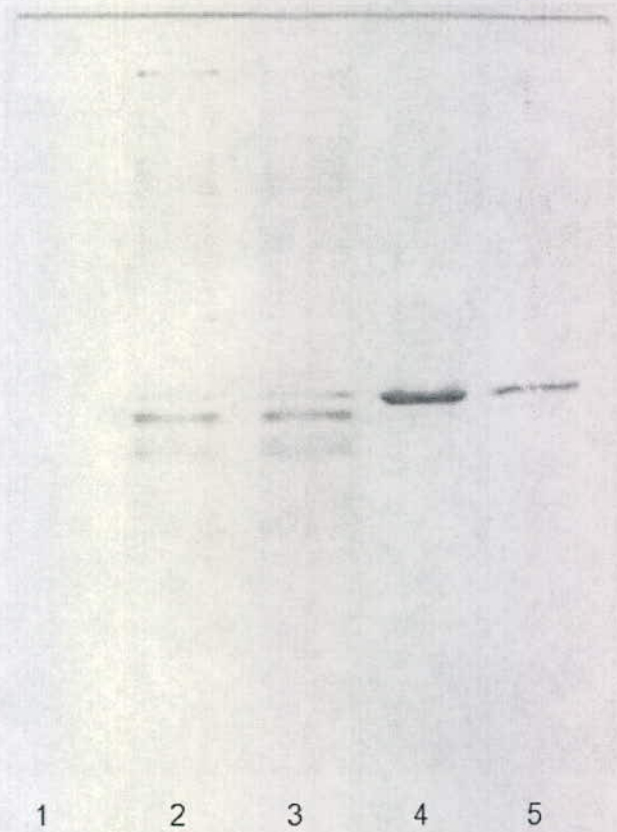


Figura 6.

Western blot. Carril 1: marcador de peso molecular. Carriles 2 y 3 , electroforesis
5 de proteínas totales obtenidas a partir de una hoja infectada con PYVV. Carriles 4
y 5 : Detección de la proteína de cápside de PYVV con el anticuerpo anti PYVV.

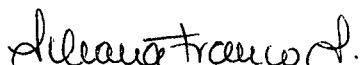
DECLARACIÓN DE CESIÓN DE DERECHOS DE INVENTOR

Liliana Franco Lara, mayor de edad identificada con cedula de ciudadanía 39.778.889, domiciliada en la ciudad de Bogotá, por el presente documento declaro que cedo en plena propiedad y sin reserva ni limitación alguna, todos mis derechos sobre la invención titulada **"Proteína recombinante de la cápside de POTATO YELLOW VEIN VIRUS (PYVV) como antígeno para la obtención/inducción de un anticuerpo para la detección de PYVV"**, la cual es producto derivado del proyecto de investigación titulado Obtención de un anticuerpo policlonal para detección por ELISA del espectro de variantes del virus PYVV (Virus amarillento de las venas de hoja de papa) en Solanum Phureja como aporte a la producción de semillas de papa certificadas en Colombia".

Los derechos se ceden a favor de la Universidad Nacional de Colombia domiciliada en la Carrera 30 No. 45 – 03, Bogotá, D.C., de la Universidad Militar Nueva Granada domiciliada en la Cra. 11 No. 101 80, Bogotá, D.C., y de la Asociación Hortofrutícola de Colombia, domiciliada en la Carrera 10 No 24-55 Piso 9, Bogotá D.C., Colombia.

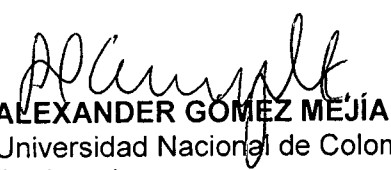
De igual manera, declaro bajo juramento que soy verdadera inventora de la invención titulada **"Proteína recombinante de la cápside de POTATO YELLOW VEIN VIRUS (PYVV) como antígeno para la obtención de un anticuerpo para detectar PYVV"**, que soy titular de los derechos bajo cesión y que puedo otorgar la presente cesión sin limitación alguna.

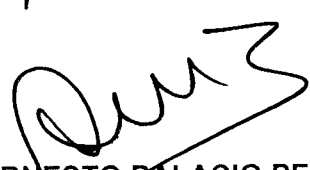
Para constancia se firma a los 27 días del mes de Agosto de 2013 en la ciudad de Bogotá, D.C.,

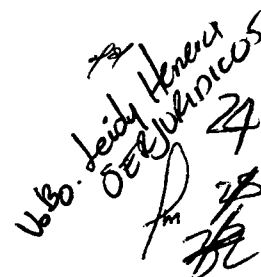

LILIANA FRANCO LARA
39.778.889
Cedente

Aceptamos:


MG (R) EDUARDO ANTONIO HERRERA BÉRBEL
Universidad Militar Nueva Granada
Cesionario


ALEXANDER GÓMEZ MEJÍA
Universidad Nacional de Colombia
Cesionario


ALVARO ERNESTO PALACIO PELÁEZ
Asociación Hortofrutícola de Colombia –Asohofrucol-
Cesionario


4680- Leydy Henao
Oscar Jaramila
27
28
29

REPÚBLICA DE COLOMBIA
NOTARIA QUINCE DE BOGOTÁ D.C.

DILIGENCIA DE RECONOCIMIENTO DE
DOCUMENTO PRIVADO

Ante el Notario 15 de Bogotá D.C. Compareció:

FRANCO LARA LILIANA

quien se identificó con: C.C. **39778889**

y declaró que reconoce la firma que aparece en el presente documento
privado como suya y que el contenido del mismo es cierto.

Bogotá D.C. **28/10/2013**

d5ffvvv5ev3xex3d

ME

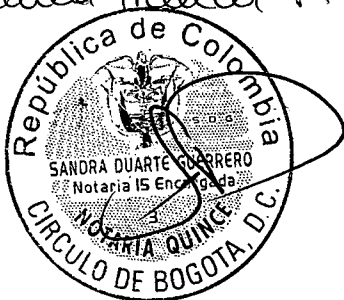
NOTARIA
15
QUINCE

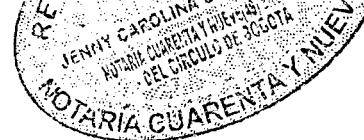


ET9XEIOTILHNNZH

www.notariaenlinea.com

Liliana Franco





UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
COMITÉ DE PROPIEDAD INTELECTUAL

DECLARACIÓN DE CESIÓN DE DERECHOS DE INVENTOR

Patricia Andrea Rodríguez Burgos, mayor de edad identificada con cedula de ciudadanía No. 52.516.069, domiciliadas en la ciudad de Bogotá, por el presente documento declaro que cedo en plena propiedad y sin reserva ni limitación alguna, todos mis derechos sobre la invención titulada **"Proteína recombinante de la cápside de POTATO YELLOW VEIN VIRUS (PYVV) como antígeno para la obtención/inducción de un anticuerpo para la detección de PYVV"**, a favor de la Universidad Nacional de Colombia domiciliada en la Carrera 30 No. 45 – 03, Bogotá, D.C., de la Universidad Militar Nueva Granada domiciliada en la Carrera 11 101 80, Bogotá, D.C., y de la Asociación Hortofrutícola de Colombia, domiciliada en la Carrera 10 No 24-55 Piso 9, Bogotá D.C., Colombia.

De igual manera, declaro bajo juramento que soy verdadera inventora de la invención titulada **"Proteína recombinante de la cápside de POTATO YELLOW VEIN VIRUS (PYVV) como antígeno para la obtención/inducción de un anticuerpo para la detección de PYVV"**, que soy titular de los derechos bajo cesión y que puedo otorgar la presente cesión sin limitación alguna.

Para constancia se firma a los días del mes de mayo de 2013 en la ciudad de Bogotá, D.C.,

PATRICIA ANDREA RODRÍGUEZ BURGOS
52.516.069
Cedente



Acepto:

ALEXANDER GÓMEZ MEJÍA A.
Universidad Nacional de Colombia
Cesionario

ALVARO ERNESTO PALACIO PELÁEZ,
Asohofrucol
Cesionario

MG (R) EDUARDO ANTONIO HERRERA BERBEL
Universidad Militar Nueva Granada
Cesionario

Handwritten notes and signatures:
Vale: Lady Henao
SER 10/12/13
25
26
[Signature]

DILIGENCIA DE RECONOCIMIENTO DE DOCUMENTO
PRIVADO CON HUELLA

NOTARIA CUARENTA Y NUEVE (49)
CIRCULO DE BOGOTÁ - COLOMBIA

JENNY CAROLINA CUELLAR PINZÓN
NOTARIA 49 (E) DE BOGOTÁ, D.C.

Ante el Despacho del Notario Cuarenta y Nueve (49) del Circulo de Bogotá D.C. se presentó:

RODRIGUEZ BURGOS PATRICIA ANDREA

Identificado con: C.C. 52516069

y dijo que el anterior documento es cierto y exacto y que la firma puesta en él es de su puño y letra, y que es la misma que usa y acostumbra en todos los actos de su vida pública y privada. Adicionalmente el interesado solicitó al Notario CERTIFICAR sobre su huella la cual estampó y así se hace.

Bogotá D.C. 06/06/2013

HUELLA DACTILAR

NOTARIA

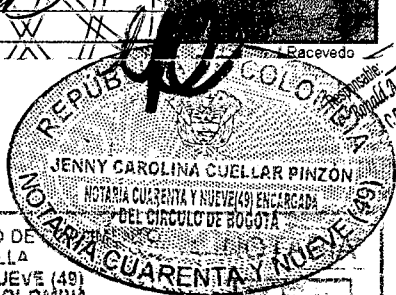
49

DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ, D.C.

www.notariadecolombia.com

P6H7DMVKA302QKQ8

Recevedo



DILIGENCIA DE RECONOCIMIENTO DE DOCUMENTO
PRIVADO CON HUELLA

NOTARIA CUARENTA Y NUEVE (49)
CIRCULO DE BOGOTÁ - COLOMBIA

JENNY CAROLINA CUELLAR PINZÓN
NOTARIA 49 (E) DE BOGOTÁ, D.C.

Ante el Despacho del Notario Cuarenta y Nueve (49) del Circulo de Bogotá D.C. se presentó:

RODRIGUEZ BURGOS PATRICIA ANDREA

Identificado con: C.C. 52516069

y dijo que el anterior documento es cierto y exacto y que la firma puesta en él es de su puño y letra, y que es la misma que usa y acostumbra en todos los actos de su vida pública y privada. Adicionalmente el interesado solicitó al Notario CERTIFICAR sobre su huella la cual estampó y así se hace.

Bogotá D.C. 06/06/2013

HUELLA DACTILAR

NOTARIA

49

DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ, D.C.

www.notariadecolombia.com

P6H7DMVKA302QKQ8

Recevedo

DILIGENCIA DE RECONOCIMIENTO DE DOCUMENTO
PRIVADO CON HUELLA

NOTARIA CUARENTA Y NUEVE (49)
CIRCULO DE BOGOTÁ - COLOMBIA

JENNY CAROLINA CUELLAR PINZÓN
NOTARIA 49 (E) DE BOGOTÁ, D.C.

Ante el Despacho del Notario Cuarenta y Nueve (49) del Circulo de Bogotá D.C. se presentó:

RODRIGUEZ BURGOS PATRICIA ANDREA

Identificado con: C.C. 52516069

y dijo que el anterior documento es cierto y exacto y que la firma puesta en él es de su puño y letra, y que es la misma que usa y acostumbra en todos los actos de su vida pública y privada. Adicionalmente el interesado solicitó al Notario CERTIFICAR sobre su huella la cual estampó y así se hace.

Bogotá D.C. 06/06/2013

HUELLA DACTILAR

NOTARIA

49

DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ, D.C.

www.notariadecolombia.com

P6H7DMVKA302QKQ8

Recevedo

DECLARACIÓN DE CESIÓN DE DERECHOS DE INVENTOR

María Mónica Guzmán Barney, ciudadana colombiana domiciliada en la ciudad de Bogotá, por el presente documento declaro bajo juramento ser inventora de la invención titulada **“Proteína recombinante de la cápside de *POTATO YELLOW VEIN VIRUS* (PYVV) como antígeno para la obtención/inducción de un anticuerpo para la detección de PYVV”** en tan sentido cedo en plena propiedad y sin reserva ni limitación alguna, todos mis derechos sobre la misma a favor de la Universidad Nacional de Colombia domiciliada en la Carrera 30 No. 45 – 03, Bogotá, D.C., de la Universidad Militar Nueva Granada domiciliada en la Carrera 11 101 80, Bogotá, D.C., y de la Asociación Hortofrutícola de Colombia, domiciliada en la Carrera 10 No 24-55 Piso 9, Bogotá D.C., Colombia.

Para constancia firma los del mes de mayo de 2013 en la ciudad de Bogotá,
D.C., Colombia.

Κωνίνα Γεωργίου Β

María Mónica Guzmán Barney
C.C. 41.583.282

Acepto

Alexander Gómez Mejía

Universidad Nacional de Colombia
cesionario

**DILIGENCIA DE RECONOCIMIENTO DE
CONTENIDO, FIRMA Y HUELLA**
Artículo 34 Decreto 2148/83

Ante el suscrito
JORGE LUIS BUELVAS HOYOS
NOTARIO 14 DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ

Compareció:
GUZMAN BARNEY MARIA MONICA

Identificado con: **C.C. - 41583282**
y declaró que la firma y huella que aparecen en el
presente documento son suyas y que el contenido
del mismo es cierto.

Huella

Bogotá, **22/05/2013**
a las **-12:08:40 p.m.**

FIRMA DECLARANTE
JORGE LUIS BUELVAS HOYOS
NOTARIO 14 DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ

cstdv2wwwxdwxs2

D'INGELIA DI BELLOMONTE TO LA
 CONTINUED 2. 14. 1961
 A. 14. 1961

APR 21 1964

JOE LING AVE. 7-4000

NOTARIO 11 DEL GO. 11 DE FEBRERO

CLUB IN BATTLE - 1914

For you
Vol. 2. Lady Hennessy
See John 2005
26
~~27~~
~~28~~

Continuación DECLARACION DE CESION DE DERECHOS DE INVENTOR "Proteína recombinante de la cápside de POTATO YELLOW VEIN VIRUS (PYVV) como antígeno para la obtención/inducción de un anticuerpo para la detección de PYVV"

Acepto


MG (R) EDUARDO ANTONIO HERRERA BERBEL
Universidad Militar Nueva Granada
Cesionario


ALVARO ERNESTO PALACIO PELÁEZ,
Asohofrucol
Cesionario

27
28
29

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-



RECIBO DE CAJA

No. 13 - 129175

Bogotá D.C., Diciembre 13 de 2013 - 08:34:28

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	569012813	12/12/2013	13.250.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00	500.000.00
				\$500.000.00
			=====	

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-302744- -00000-0000

Fecha: 2013-12-30 15:56:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act. 411 PRESENTACION Folios: 28

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Diciembre 13 de 2013 - 08:34:30



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-302744- -00000-0000

Fecha: 2013-12-30 15:56:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act. 411 PRESENTACION Folios: 28

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐	Indicación que se solicita una PCT
☐	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐