



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

05-49705

21. EXPEDIENTE N°

54. TÍTULO "MATERIALES Y METODOS PARA PREVENIR Y TRATAR DESORDENES EPITELIALES
MEDIADOS POR MICROBIOS"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61K 7/06

71. SOLICITANTE UC TECH

DOMICILIO CHICAGO, ESTADO DE ILLINOIS, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P 53.215

22. BOGOTÁ,D.C. 23 MAR 2005

PETITORIO



SUPERINDUSTRIA y COMERCIO
 Radicación : 05045705 00000000 Folios: 36
 Fecha (ARD): 2005-05-23 17:04:33
 Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
 Dependencias 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

26-06-2005

1 SOLICITUD DE: ☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad			
☐ Capítulo I. ☒ Capítulo II.			
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: UC TECH Dirección: 5840 South Ellis Avenue, Suite 405, Chicago, IL 60637 Nacionalidad o Domicilio: Chicago, Estado de Illinois, Estados Unidos de América Lugar de Constitución: Teléfono: 3264270 Fax: 6069701 E-mail: jlccco@lloredacamacho.com	IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____	
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: ALICIA LLOREDICA RICAURTE Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º, Bogotá- Colombia Teléfono: 3264270 Fax: 6069701 E-mail: jlccco@lloredacamacho.com	C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número 39.690.713 TP 53.215	
4 INVENTOR(ES) (72)	Nombre: ALVERDY, John, C., M.D. Dirección: 921 Club Circle, Glenview, IL 60025. Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América.		
5 PCT (86) Solicitud Internacional No. PCT/US 2002/037948 Fecha: 26/11/02 Publicación Internacional No. WO2004/047778 A1 Fecha: 10/06/04			
6 Título (54) "MATERIALES Y MÉTODOS PARA PREVENIR Y TRATAR DESORDENES EPITELIALES MEDIADOS POR MICROBIOS"			
7 Clasificación Internacional (51) A61K 7/06			
8 Prioridad SI ☐ NO ☒	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
9 Comprobante de Pago No. 05-36, 753 Fecha: Mayo 18 de 2005			

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Documento de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☒ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ 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.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Reporte de Búsqueda Internacional con su traducción, Publicación con su traducción y Opinión Escrita con su traducción.

11

FIGURA CARACTERISTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

C.C. 39.690.713 Usaquén T.P. 58.215

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 05043705 00000000 Folios: 06
Fecha (AMD): 2005-05-23 17:04:55
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACT 411 PRESENTA
Referencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 36,753
FECHA : MAYO 18 DE 2005

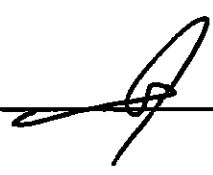
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	37737038	18/05/2005	8,937,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRANITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	443,000.00
		TOTAL :	443,000.00

SOM: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

No. SOLICITUD
INTERNACIONAL : PCT/US2002/037948

(51) INT. CL.: A61K 7/06

(21) No. SOLICITUD:

(22) FECHA DE
PRESENTACIÓN: 23-05-2005

(71) SOLICITANTE: UC TECH

(30) PRIORIDAD:

(31) No. DE SOLICITUD:

(72) INVENTOR/ES: ALVERDY, John, C., M.D.

(32) FECHA DE
PRESENTACIÓN:

(33) PAÍS:

(74) REPRESENTANTE ALICIA LLOREDA RICAURTE
LEGAL:

(54) TÍTULO:

MATERIALES Y MÉTODOS PARA PREVENIR Y TRATAR DESORDENES EPITELIALES MEDIAD S
POR MICROBIOS

(57) RESUMEN:

Reivindicación número 1.-

Un método para reducir la probabilidad de mortalidad en un animal con una condición anormal que comprende una superficie epitelial en riesgo de desarrollar un desorden mediado por microbios, que comprende la administración de una dosis efectiva de polietilén glicol (PEG) a un animal en necesidad de este, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 5,000 daltons.

Reivindicación número 32.-

Una composición farmacéutica que comprende polietilén glicol de al menos 15,000 daltons de peso molecular promedio, y un adyuvante, vehículo o diluyente adecuado.

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL		Solicitud Internacional No. PCT/US 02/37948
A. CLASIFICACION DE MATERIA IPC(7): A61K 7/06, 39/108 US CL: 424/70, 11, 257.1, 259.1, 260.1 Según la Clasificación de Patentes Internacional (CPI) o según la clasificación nacional y la CPI		
B. CAMPOS BUSCADOS Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de símbolos de clasificación) U.S.: 424/70, 11, 257.1, 259.1, 260.1 Documentación buscada fuera de documentación mínima hasta donde dichos documentos se incluyan en los campos buscados Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde sea práctico, buscar términos usados) MEDLINE, BIOSIS, PUBMED, EUROPATFUL, USPATFUL, BIOSCI, CAPLUS, JAPIO		
C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
Y	AMMORI et al. Aumento temprano en la permeabilidad intestinal en pacientes con pancreatitis aguda severa: correlación con endotoxemia, falla de órgano y mortalidad, Journal of Gastrointestinal Surgery. Volumen 3, Issue 3, mayo-junio1999, ver el resumen.	1-8 y 25-31
A	LAUGHLIN et al. El papel fundamental de la lectina PA-1 de pseudomona aeruginosa en sepsis experimental derivada de intestino. Annals of Surgery, julio 2000, volumen 2000, Número 1, páginas 133-142, Ver el resumen.	9-16 y 17-22
A	ALVERDY et al. la sepsis derivada del intestino ocurre cuando el patógeno correcto con los genes de virulencia correctos encuentran el huésped correcto. Annals of Surgery, 2000, volumen 232, páginas 480-489. Ver resumen.	9-16 y 23-24
A	BAJOLET-LAUDINAT et al citotoxicidad de lectina PA-1 interna de pseudomona aeruginosa para células epiteliales respiratorias en cultivo primario. Infection and Immunity. octubre 1994, volumen 62, número 10, páginas 4481-4487, ver documento completo	9-16 y 23-24
☒ En el recuadro C se enumeran más documentos. ☐ En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes.		
* Categorías especiales de documentos citados: 'A' documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera de relevancia particular 'E' documento anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional 'L' documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra citación u otra razón especial (según se especifica) 'O' documento que se refiere a una revelación oral, uso, exhibición u otros medios 'P' documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada 'T' documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invención 'X' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo 'Y' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más documentos, siendo dicha combinación obvia para una persona experta en la técnica '&' documento miembro de la misma familia de patentes		
Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional 23 de Febrero de 2003 (23.02.2003)		Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional 24 de julio de 2003
Nombre y dirección del correo de ISA/US Comisionado de Patentes y marcas Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No: (703) 305-3230		Funcionario autorizado Vanessa L. Ford Teléfono No. (703) 308-4735

Folios 4 y 5 tarjetas

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/US 02/37948

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
Y	WINZER et al Las lectinas PA-II y PA-III de pseudomona aeruginosa son controladas mediante quorum sensing y mediante RpoS. Journal of Bacteriology. Noviembre 2000, páginas 6401-6411, ver documento completo.	17-22
X	US 5, 169, 627 A (CUNNINGHAM-RUNDLES) 8 de diciembre de 1992 (9.12.1992), columna 5, líneas 1-22.	32
Y		34 y 69-75
Y	US 6, 126, 933 A (WARNE et al) 03 octubre 2000 (3.11.2000) ver documento completo.	33 y 35-47
A		58-68
Y	ESPAT et al. PEG-BP-30 la monoterapia con PEG-BP-30 atenua la cascada inflamatoria mediada por citoquina en el choque séptico por escherichia coli en babuinos. Journal of Surgery Research. Julio 1995, volumen 59, número 1, páginas 153-158. Ver el resumen.	46-53
A	SPITZ et al características de la barrera epitelial intestinal durante la manipulación dietaria y el estrés glucocorticoide .Crit Care Med. 1996, volumen 24, páginas 635-641, ver resumen.	56-57
X	US 6, 074, 671 A (OLDHAM et al) 13 de junio de 2000 (13.06.2000), columna 7, líneas 40-67.	54-55

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/37948

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) : A61K 7/06, 39/108

US CL : 424/ 70.11, 257.1, 259.1, 260.1

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 424/ 70.11, 257.1, 259.1, 260.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
MEDLINE, BIOSIS, PUBMED, EUROPATFUL, USPATFUL, BIOSCI, CAPLUS, JAPIO

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	AMMORI et al. Early Increase in Intestinal Permeability in patients with severe acute pancreatitis: Correlation with endotoxemia, organ failure, and mortality. Journal of Gastrointestinal Surgery. Volume 3, Issue 3, May-June 1999. See the Abstract.	1-8 and 25-31
A	LAUGHLIN et al. The key role of pseudomonas aeruginosa PA-I lectin on experimental gut-derived sepsis. Annals of Surgery. July 2000, Volume 2000, Number 1, pages 133-142. See the Abstract.	9-16 and 17-22
A	ALVERDY et al. Gut-derived sepsis occurs when the right pathogen with the right virulence genes meets the right host. Annals of Surgery. 2000, Volume 232, pages 480-489. See the Abstract.	9-16 and 23-24
A	BAJOLET-LAUDINAT et al. Cytotoxicity of pseudomonas aeruginosa internal lectin PA-I to respiratory epithelial cells in primary culture. Infection and Immunity. October 1994, Volume 62, Number 10, pages 4481-4487, see entire document.	9-16 and 23-24



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 February 2003 (23.02.2003)

Date of mailing of the international search report

24 JUL 2003

Name and mailing address of the ISA/US

Commissioner of Patents and Trademarks

Box PCT

Washington, D.C. 20231

Facsimile No. (703)305-3230

Authorized officer

Vanessa L. Ford

Telephone No. (703) 308-4735

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/37948

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WINZER et al. The pseudomonas aeruginosa lectins PA-II and PA-III are controlled by quorum sensing and by RpoS. Journal of Bacteriology. November 2000, pages 6401-6411, see entire document.	17-22
X	US 5,169,627 A (CUNNINGHAM-RUNDLES) 08 December 1992 (9.12.1992), column 5, lines 1-22.	32
Y		34 and 69-75
Y	US 6,126,933 A (WARNE et al) 03 October 2000(3.11.2000). See entire document.	33 and 35-47
A		58-68
Y	ESPAT et al. PBO-BP-30 monotherapy attenuates the cytokine-mediated inflammatory cascade in baboon escherichia coli septic shock. Journal of Surgery Research. July 1995, Volume 59, Number 1, pages 153-158. See the Abstract.	46-53
A	SPTTZ et al. Characteristics of the intestinal epithelial barrier during dietary manipulation and glucocorticoid stress. Crit Care Med. 1996, Volumen 24, pages 635-641. see Abstract.	56-57
X	US 6,074,671 A (OLDHAM et al.) 13 June 2000 (13.06.2000), column 7, lines 40-67.	54-55

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional
10 de junio de 2004 (10.06.2004)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2004/047778 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes: A61K 7/06,
39/108

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/US2002/037948

(22) Fecha de Registro Internacional: 26 de noviembre de 2002
(26.11.2002)

(25) Idioma de registro: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(71) Solicitante (Para todos los estados designados excepto Estados Unidos): UC TECH [US/US]; 5640 South Ellis Avenue, Suite 405, Chicago, IL 60637 (US).

(72) Inventores; y

(75) Inventores/solicitante (para Estados Unidos solamente): ALVERDY, John, C., M.D [US/US]; 921 Club Circle, Glenview, IL 60025 (US).

(74) Agente: MERKEL, William, K.; Marshall, Gerstein & Borun, 6300 Sears Tower, 233 S. Wacker Drive, Chicago, IL 60606-6357 (US).

(81) Estados Designados (nacional): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados Designados (regional): Patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente Eurasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) Patente Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

— con reporte de Búsqueda Internacional

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase a "Las Notas Gúlas sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada emisión regular de la Gaceta PCT.

(54) Título: MATERIALES Y MÉTODOS PARA PREVENIR Y TRATAR DESORDENES EPITELIALES MEDIADOS POR MICROBIOS

(57) Resumen: La presente invención provee composiciones farmacéuticas en forma de polímeros biocompatibles de peso molecular relativamente alto tales como polietilén glicol, opcionalmente complementadas con un polímero protector como dextrán y/o nutrientes patógenos esenciales tales como L-glutamina. También se proveen métodos para prevenir o tratar la sepsis derivada del intestino, atribuible a patógenos intestinales tales como *Pseudomonas aeruginosa*, mediante la administración de polietilén glicol de alto peso molecular, así como los métodos para monitorear la administración de polietilén glicol de alto peso molecular, tal como en métodos para prevenir, aliviar o tratar desórdenes epiteliales inducidos por microbios, como los ejemplificados por la sepsis derivada del intestino. Frecuentemente, la sepsis derivada del intestino surge como una complicación en los mamíferos que se recuperan de intervención quirúrgica o sufren de una enfermedad o desorden, proporcionando indicaciones de animales adecuados para recibir tratamiento preventivo. Finalmente, la invención provee una composición que comprende fórmula de infante y polietilén glicol, y métodos para usar esta composición.

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
10 June 2004 (10.06.2004)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2004/047778 A1

(51) International Patent Classification⁷: A61K 7/06, 39/108

(21) International Application Number:
PCT/US2002/037948

(22) International Filing Date:
26 November 2002 (26.11.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(71) Applicant (for all designated States except US): UC
TECH [US/US]; 5640 South Ellis Avenue, Suite 405,
Chicago, IL 60637 (US).

(72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant (for US only): ALVERDY, John, C.,
M.D. [US/US]; 921 Club Circle, Glenview, IL 60025 (US).

(74) Agent: MERKEL, William, K.; Marshall, Gerstein &
Borum, 6300 Sears Tower, 233 S. Wacker Drive, Chicago,
IL 60606-6357 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SR, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK,
TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 2004/047778 A1

(54) Title: MATERIALS AND METHODS FOR PREVENTING AND TREATING MICROBE-MEDIATED EPITHELIAL DISORDERS

(57) Abstract: The present invention provides pharmaceutical compositions in the form of relatively high molecular weight biocompatible polymers such as polyethylene glycol, optionally supplemented with a protective polymer such as dextran and/or essential pathogen nutrients such as L-glutamine. Also provided are methods for preventing or treating gut-derived sepsis attributable to intestinal pathogens such as *Pseudomonas aeruginosa* by administering high molecular weight polyethylene glycol as well as methods for monitoring the administration of high molecular weight polyethylene glycol, such as in methods of preventing, ameliorating or treating microbe-induced epithelial disorders, as exemplified by gut-derived sepsis. Frequently, gut-derived sepsis arises as a complication in mammals recovering from surgical intervention or suffering from a disease or disorder, providing indications of suitable animals to receive preventative treatment. Finally, the invention provides a composition comprising infant formula and polyethylene glycol and methods for using that composition.

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES

10

De la
AUTORIDAD EXAMINADORA PRELIMINAR INTERNACIONAL

OPINION ESCRITA (PCT Regla 66)

Para:
WILLIAM K. MERKEL
MARSHLL GERSTEIN & BORUN
233 S. WACKER DRIVE
6300 SEARS TOWER
CHICAGO, IL 60606-6357

Fecha de envío
(día/mes/año) 6 de octubre de 2004

Registro de referencia del solicitante o agente

27373/38306

RESPUESTA VENCE
Dentro de 1 meses/días desde la fecha anterior
de envío

Solicitud Internacional No.

PCT/US02/37948

Fecha de registro internacional
(día/mes/año)
26 de noviembre de 2002 (26.11.2002)

Fecha de prioridad
(día/mes/año)

Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC 7

IPC(7): A61K 39/108 y US CL.: 424/260

Solicitante

UC TECH

1. Esta opinión escrita la redacta primero (primero, etc.) la Autoridad Examinadora Preliminar Internacional.

2. Esta opinión contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems:

- I ☒ Bases de opinión
- II ☐ Prioridad
- III ☐ No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad Industrial
- IV ☐ Falta de unidad de invención
- V ☒ declaración razonada de según la regla 66.2(a)(ii) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación.
- VI ☐ Ciertos documentos citados
- VII ☐ Ciertos defectos en la solicitud internacional
- VIII ☐ Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional

3. El solicitante por el presente está invitado a contestar a esta opinión.

¿Cuándo? Ver el límite de tiempo indicado anteriormente. El solicitante puede, antes de la expiración del límite de tiempo, solicitar a esta Autoridad que otorgue una extensión, ver Regla 66.2(d).

¿Cómo? Presentando una respuesta escrita, acompañada de, cuando sea apropiado, de enmiendas, según Regla 66.3.

Para el formulario y el idioma de las enmiendas, ver las Reglas 66.8 y 66.9

También Para una oportunidad adicional de presentar enmiendas, ver Regla 66.4.

Para la obligación del examinador de considerar las enmiendas y/o argumentos, ver Norma 66.4bis.

Para una comunicación informal con el examinador, ver Regla 66.6.

Si no se registra una respuesta, el informe del examen preliminar internacional se establecerá según esta opinión.

4. La fecha final por medio de la cual se debe establecer el reporte del examen preliminar internacional según la Regla 69.2 es 26 de marzo de 2005 (26.03.2005)

Nombre y dirección de correo de IPEA/US
Mail Stop PCT, Attn: IPEA/US
Commissioner for Patents
P.O Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsímil No. (703) 305-3230

Funcionario autorizado

Vanessa L. Ford

Teléfono No. (571) 272-1600

122

I. Base de la opinión**1. Respecto a los elementos de la solicitud internacional:***

- ☒ la solicitud internacional según se presentó originalmente
- ☒ la descripción:
Páginas 1-37 , como originalmente se presentaron
páginas NINGUNA , presentadas con la demanda
páginas NINGUNA , presentadas con la carta de _____
- ☒ las reivindicaciones:
páginas 38-46 , como originalmente se presentaron
páginas NINGUNA , según se enmendaron (junto con cualquier declaración) de conformidad con el artículo 19
páginas NINGUNA , presentadas con la demanda
páginas NINGUNA , presentadas con la carta de _____
- ☒ los dibujos:
páginas 1-6 , como originalmente se presentaron
páginas NINGUNO , presentadas con la demanda
páginas NINGUNO , presentadas con la carta de _____
- ☐ la secuencia que enumera parte de la descripción:
páginas NINGUNA , como originalmente se presentaron
páginas NINGUNA , presentadas con la demanda
páginas NINGUNA , presentadas con la carta de _____
2. Respecto al idioma, todos los elementos marcados anteriormente estuvieron disponibles o fueron suministrados a esta Autoridad en el idioma en el cual la solicitud internacional fue presentada, a menos que se indique lo contrario bajo este ítem.
Estos elementos estuvieron disponibles o fueron suministrados a esta Autoridad en el idioma _____ el cual es:
☐ el idioma de una traducción suministrada para una búsqueda internacional (según la Regla 23.1 (b)).
☐ el idioma de una publicación de la solicitud internacional (según la Regla 48.3 (b)).
☐ el idioma de la traducción suministrada para el examen preliminar internacional (según las Reglas 55.2 y/o 55.3).
3. Respecto al nucleótido y/o secuencia amino ácida revelado en la solicitud internacional, se llevó a cabo el examen preliminar internacional según el listado de secuencia:
☐ contenido en la solicitud internacional en forma escrita.
☐ presentada junto con la solicitud internacional en forma legible por computador.
☐ proporcionado subsiguientemente a esta Autoridad en forma escrita.
☐ proporcionado subsiguientemente a esta Autoridad en forma legible por computador.
☐ Se ha proporcionado la afirmación respecto a la cual el listado de secuencia escrito proporcionado subsiguientemente no va más allá de la revelación en la solicitud internacional según se registró.
☐ Se ha proporcionado la afirmación respecto a la cual la información registrada en forma legible por computador es idéntica al listado de secuencia escrita.
4. ☒ Las enmiendas han resultado en la cancelación de:
☒ la descripción, páginas NINGUNA
☒ las reivindicaciones, Nos. NINGUNA
☒ los dibujos, página/fig- NINGUNA
5. ☐ Este informe ha sido establecido como si (algunas) las enmiendas no se hubiesen hecho, ya que se ha considerado que van más allá de la revelación según se registró, como se indicó en Casilla Suplementaria (Regla 70.2 (c)).**

* Las páginas de remplazo que se han proporcionado a la Oficina que recibe en respuesta a una invitación según el Artículo 14 a las que se hace referencia en este reporte como "presentadas originalmente"

OPINION ESCRITA	Solicitud internacional No. PCT/US02/379948						
V. Afirmación razonada bajo la Regla 66.2(a)(ii) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación							
1. Afirmación							
Novedad (N)	<table style="width: 100%;"><tr><td style="width: 40%;">Reivindicaciones</td><td style="width: 40%;"><u>NINGUNA</u></td><td style="width: 20%; text-align: right;">SI</td></tr><tr><td>Reivindicaciones</td><td><u>1-75</u></td><td style="text-align: right;">NO</td></tr></table>	Reivindicaciones	<u>NINGUNA</u>	SI	Reivindicaciones	<u>1-75</u>	NO
Reivindicaciones	<u>NINGUNA</u>	SI					
Reivindicaciones	<u>1-75</u>	NO					
Nivel inventivo (IS)	<table style="width: 100%;"><tr><td style="width: 40%;">Reivindicaciones</td><td style="width: 40%;"><u>NINGUNA</u></td><td style="width: 20%; text-align: right;">SI</td></tr><tr><td>Reivindicaciones</td><td><u>1-75</u></td><td style="text-align: right;">NO</td></tr></table>	Reivindicaciones	<u>NINGUNA</u>	SI	Reivindicaciones	<u>1-75</u>	NO
Reivindicaciones	<u>NINGUNA</u>	SI					
Reivindicaciones	<u>1-75</u>	NO					
Aplicabilidad industrial (IA)	<table style="width: 100%;"><tr><td style="width: 40%;">Reivindicaciones</td><td style="width: 40%;"><u>1-75</u></td><td style="width: 20%; text-align: right;">SI</td></tr><tr><td>Reivindicaciones</td><td><u>NINGUNA</u></td><td style="text-align: right;">NO</td></tr></table>	Reivindicaciones	<u>1-75</u>	SI	Reivindicaciones	<u>NINGUNA</u>	NO
Reivindicaciones	<u>1-75</u>	SI					
Reivindicaciones	<u>NINGUNA</u>	NO					
2. CITAS Y EXPLICACIONES							
Las reivindicaciones 1-45 y 56-75 carecen de novedad bajo el Artículo 33(2) PCT según lo anticipado por CUNNINGHAM-RUNDLES (5,169,627). La técnica previa enseña una composición farmacéutica oral que comprende polietilén glicol. La técnica previa también enseña los métodos para reconstituir la Inmunidad secretora en un paciente que sufre de una deficiencia inmune secretora, que comprende la administración de una cantidad efectiva de polietilén glicol con inmunoglobulinas de suero. La técnica previa enseña que las composiciones pueden ser administradas a los niños o pacientes con una deficiencia, o pacientes con una inmunodeficiencia gastrointestinal de IgA comprometida. La técnica previa anticipa la invención reivindicada. Las reivindicaciones 54-55 carecen de novedad bajo el Artículo 33(2) PCT como lo anticipa OLDHAM ET AL. (6,074,671). La técnica previa enseña un condón recubierto con lectinas en un vehículo tal como polietilén glicol. La técnica previa enseña que la invención previene enfermedades transmitidas sexualmente. La técnica previa anticipa la invención reivindicada. Las reivindicaciones 48-51, bajo el Artículo 33(2) PCT como lo anticipa BLUM ET AL. (5,661,177). La técnica previa enseña composiciones que comprenden polietilén glicol para tratar y prevenir la irritación de la piel. Las reivindicaciones 52-53 bajo el Artículo 33(2) PCT como lo anticipa WARNE ET AL. (6,126,933). La técnica previa enseña composiciones que comprenden polietilén glicol para tratar y prevenir enfermedades de intestino inflamatorio. Aunque la anterioridad no enseña específicamente que las composiciones que comprenden polietilén glicol se usan específicamente para irrigar al menos una porción del tracto urinario, sería obvio para el experto en la técnica al momento en que la invención se hizo, usar polietilén glicol que contiene composiciones para irrigar el tracto urinario porque la técnica previa enseña esas composiciones que comprenden polietilén glicol para tratar y prevenir las enfermedades de intestino inflamatorio. ——NUEVAS CITACIONES—— US 5,661,177 A1 (BLUM et al), Agosto 26 de 1997, ver columnas 3-4.							

PINION ESCRITA	Solicitud internacional No. PCT/US02/37948
Casilla Suplementaria (Para ser usada cuando el espacio en cualquier cuadro anterior no sea suficiente)	
TIEMPO LIMITE: El tiempo límite expuesto para responder a una Opinión Escrita no puede ser extendido. 37 CFR 1.484(d). Cualquier respuesta recibida después de la expiración del tiempo límite expuesto en la Opinión Escrita no será considerada en la preparación del Reporte de Examen Preliminar Internacional.	

PATENT COOPERATION TREATY

14

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:
WILLIAM K. MERKEL
MARSHALL GERSTEIN & BORUN
233 S. WACKER DRIVE
6300 SEARS TOWER
CHICAGO, IL 60606-6357

RECEIVED

OCT 14 2004

MARSHALL GERSTEIN

PCT

WRITTEN OPINION

(PCT Rule 66)

Applicant's or agent's file reference 27373/38306		Date of Mailing (day/month/year) 06 OCT 2004
International application No. PCT/US02/37948		International filing date (day/month/year) 26 November 2002 (26.11.2002)
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC IPC(7): A61K 39/108 and US Cl.: 424/260		Priority date (day/month/year) within 2 months/days from the above date of mailing
Applicant UC TECH		

DOCKETED: 12/6/04

1. This written opinion is the first (first, etc.) drawn by this International Preliminary Examining Authority.
2. This opinion contains indications relating to the following items:
 - I ☒ Basis of the opinion
 - II ☐ Priority
 - III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
 - IV ☐ Lack of unity of invention
 - V ☒ Reasoned statement under Rule 66.2 (a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
 - VI ☐ Certain documents cited
 - VII ☐ Certain defects in the international application
 - VIII ☐ Certain observations on the international application
3. The applicant is hereby invited to reply to this opinion.

When? See the time limit indicated above. ~~The applicant may, before the expiration of that time limit, request this Authority to grant an extension. See rule 66.2(d).~~

How? By submitting a written reply, accompanied, where appropriate, by amendments, according to Rule 66.3. For the form and the language of the amendments, see Rules 66.8 and 66.9.

Also For an additional opportunity to submit amendments, see Rule 66.4.
 For the examiner's obligation to consider amendments and/or arguments, see Rule 66.4 *bis*.
 For an informal communication with the examiner, see Rule 66.6

If no reply is filed, the international preliminary examination report will be established on the basis of this opinion.
4. The final date by which the international preliminary examination report must be established according to Rule 69.2 is: 26 March 2005 (26.03.2005).

Name and mailing address of the IPEA/US Mail Stop PCT, Attn: IPEA/US Consulador for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer Vanessa L. Ford Telephone No. (571) 272-1600
---	---

Form PCT/IPEA/408 (cover sheet)(July 1998)

16
+ T

WRITTEN OPINION

International application No.

PCT/US02/37948

15

I. Basis of the opinion

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☒ the description:
 pages 1-37, as originally filed
 pages NONE, filed with the demand
 pages NONE, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
 pages 38-46, as originally filed
 pages NONE, as amended (together with any statement) under Article 19
 pages NONE, filed with the demand
 pages NONE, filed with the letter of _____
- ☒ the drawings:
 pages 1-6, as originally filed
 pages NONE, filed with the demand
 pages NONE, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages NONE, as originally filed
 pages NONE, filed with the demand
 pages NONE, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rules 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the written opinion was drawn on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in printed form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☒ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☒ the description, pages NONE
- ☒ the claims, Nos. NONE
- ☒ the drawings, sheets/fig. NONE

5. ☐ This opinion has been drawn as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this opinion as "originally filed."

17

WRITTEN OPINION

International application No.
PCT/US02/37948

V. Reasoned statement under Rule 66.2(a)(II) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. STATEMENT

Novelty (N)	Claims <u>NONE</u>	YES
	Claims <u>1-75</u>	NO
Inventive Step (IS)	Claims <u>NONE</u>	YES
	Claims <u>1-75</u>	NO
Industrial Applicability (IA)	Claims <u>1-75</u>	YES
	Claims <u>NONE</u>	NO

2. CITATIONS AND EXPLANATIONS

Claims 1-45 and 56-75 lack novelty under PCT Article 33(2) as anticipated by CUNNINGHAM-BUNDLES (5,169,627). The prior art teach an oral pharmaceutical composition comprising polyethylene glycol. The prior art also teaches methods for reconstituting secretory immunity in a patient suffering from a secretory immune deficiency comprising administering an effective amount of polyethylene glycol with serum immunoglobulins. The prior art teaches that the composition may be administered to infants or patients with a deficiency or patients with compromised IgA gastrointestinal immunodeficiency. The prior art anticipates the claimed invention.

Claims 54-55 lack novelty under PCT Article 33(2) as anticipated by OLDHAM ET AL. (6,074,671). The prior art teach a condom coated with lecithin in a vehicle such as polyethylene glycol. The prior art teaches that the invention prevents sexually transmitted diseases. The prior art anticipates the claimed invention.

Claims 46-51 under PCT Article 33(2) as anticipated by BLUM ET AL. (5,661,177). The prior art teach compositions comprising polyethylene glycol to treat and prevent skin irritation.

Claims 52-53 under PCT Article 33(2) as anticipated by WARNE ET AL. (6,126,933). The prior art teach compositions comprising polyethylene glycol to treat and prevent inflammatory bowel diseases. Although the prior does not specifically teach that the compositions comprising polyethylene glycol are specially used to irrigate at least a portion of the urinary tract, it would be obvious to one of skill in the art at the time the invention was made to use polyethylene glycol containing compositions to irrigate the urinary tract because the prior art teach that compositions comprising polyethylene glycol to treat and prevent inflammatory bowel diseases

NEW CITATIONS

US 5,661,177 A1 (BLUM et al) 26 August 1997, see columns 3-4.

WRITTEN OPINION

International application No.
PCT/US02/37948

17

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

TIME LIMIT:

The time limit set for response to a Written Opinion may not be extended. 37 CFR 1.484(d). Any response received after the expiration of the time limit set in the Written Opinion will not be considered in preparing the International Preliminary Examination Report.

19

18

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES
PCT
REPORTE DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL

(PCT Artículo 36 y Regla 70)

Registro de referencia del solicitante o agente 27373/38306	PARA FUTURAS ACCIONES Ver Notificación o Transmisión del Reporte de Examen Preliminar Internacional (Formato PCT/IPEA/416)	
Solicitud Internacional No. PCT/US02/37948	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 26 de noviembre de 2002 (26.11.2002)	Fecha de prioridad (día/mes/año)
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC 7 IPC(7): A 61K, 39/108 y US CL.: 424/260		
Solicitante UC TECH		
1. Este informe de examen preliminar internacional ha sido preparado por esta Autoridad Examinadora Preliminar Internacional y se transmite al solicitante de conformidad con el Artículo 36. 2. Este REPORTE consta de un total de <u>3</u> páginas, incluyendo la carátula. ☐ Este reporte también está acompañado de ANEXOS, es decir, páginas de descripción, reivindicaciones y/o dibujos que han sido modificados y son la base de este informe y/o páginas que contienen rectificaciones hechas ante esta Autoridad (ver Regla 70.16 y la Sección 607 de las Instrucciones Administrativas de conformidad con el PCT). Estos anexos constan de un total de _____ páginas.		
3. Este informe contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems: I ☒ Bases del Reporte II ☐ Prioridad III ☐ No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad Industrial. IV ☐ Falta de unidad de invención V ☒ Afirmación razonada de conformidad con el Artículo 35(2) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación. VI ☐ Ciertos documentos citados VII ☐ Ciertos defectos en la solicitud internacional VIII ☐ Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional		
Fecha de presentación de la demanda 24 de junio de 2004 (24.06.2004)	Fecha de terminación de este reporte 3 de marzo de 2005 (03.03.2005)	
Nombre y dirección de IPEA/US Mail Stop PCT, Attn. IPEA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230	Funcionario autorizado Vanessa L. Ford. Teléfono No.(571) 272-1600	

Forma PCT/IPEA/409 (carátula) (Julio 1998)

L Bases del reporte

1. Respecto a los elementos de la solicitud internacional:*

- ☒ la solicitud internacional según se presentó originalmente
- ☒ la descripción:
- Páginas 1-37 , según se presentaron originalmente
- Páginas NINGUNA , presentadas con la demanda
- Páginas NINGUNA , presentadas con la carta de _____
- ☒ las reivindicaciones:
- Páginas 38-46 , según se presentaron originalmente
- Páginas NINGUNA , según se enmendaron (junto con cualquier declaración) de conformidad con el artículo 19
- Páginas NINGUNA , presentadas con la demanda
- Páginas NINGUNA , presentadas con la carta de _____
- ☒ los dibujos:
- Páginas 1-6 , según se presentaron originalmente
- Páginas NINGUNA , presentadas con la demanda
- Páginas NINGUNA , presentadas con la carta de _____
- ☐ la secuencia que enumera parte de la especificación:
- Páginas NINGUNA , según se presentaron originalmente
- Páginas NINGUNA , presentadas con la demanda
- Páginas NINGUNA , presentadas con la carta de _____

2. Respecto al idioma, todos los elementos marcados anteriormente estuvieron disponibles o fueron suministrados a esta Autoridad en el idioma en el cual la solicitud internacional fue presentada, a menos que se indique lo contrario bajo este ítem.

Estos elementos estuvieron disponibles o fueron suministrados a esta Autoridad en el idioma, el cual es:

- ☐ el idioma de una traducción suministrada para una búsqueda internacional (según la Regla 23.1 (b)).
- ☐ el idioma de una publicación de la solicitud internacional (según la Regla 48.3 (b)).
- ☐ el idioma de la traducción suministrada para el examen preliminar internacional (según las Reglas 55.2 y/o 55.3).

3. Respecto al nucleótido y/o secuencia amino ácida revelado en la solicitud internacional, se llevó a cabo el examen preliminar internacional según el listado de secuencia:

- ☐ contenido en la solicitud internacional en forma escrita.
- ☐ registrado junto con la solicitud internacional en forma legible por computador.
- ☐ proporcionado subsiguientemente a esta Autoridad en forma escrita.
- ☐ proporcionado subsiguientemente a esta Autoridad en forma legible por computador.
- ☐ Se ha proporcionado la afirmación respecto a la cual el listado de secuencia escrito proporcionado subsiguientemente no va más allá de la revelación en la solicitud internacional según se presentó.
- ☐ Se ha proporcionado la afirmación respecto a la cual la información presentada en forma legible por computador es idéntica al listado de secuencia escrita.

4. ☒ Las modificaciones han resultado en la cancelación de:

- ☒ la descripción, páginas NINGUNA
☒ las reivindicaciones, Nos. NINGUNA
☒ los dibujos, páginas/fig NINGUNA

5. ☐ Este reporte ha sido establecido como si (algunas) de las modificaciones no se hubiesen hecho, ya que se ha considerado que van más allá de la revelación según se presentó, como se indicó en Casilla Suplementaria (Regla 70.2 (c)):

* Las páginas de remplazo que se han proporcionado a la Oficina que recibe en respuesta a una invitación según el Artículo 14 a las que se hace referencia en este reporte como "registradas originalmente" y se anexan a este reporte ya que no contienen enmiendas (Norma 70.16 y 70.17).

**** Cualquier página de remplazo que contenga dichas enmiendas debe hacerse referencia bajo el ítem I y anexarse a este reporte.**

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 27373/38306		FOR FURTHER ACTION	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/US02/37948	International filing date (day/month/year) 26 November 2002 (26.11.2002)	Priority date (day/month/year)	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC IPC(7): A 61 K, 39/108 and US CL: 424/260			
Applicant KTECH			
1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet. ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of ___ sheets.			
3. This report contains indications relating to the following items: I ☒ Basis of the report II ☐ Priority III ☐ Non-establishment of report with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV ☐ Lack of unity of invention V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI ☐ Certain documents cited VII ☐ Certain defects in the international application VIII ☐ Certain observations on the international application			
Date of submission of the demand 24 June 2004 (24.06.2004)		Date of completion of this report 03 March 2005 (03.03.2005)	
Name and mailing address of the IPEA/US Mail Stop PCT, Attn: IPEA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1430 Alexandria, Virginia 22313-1430 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer Vernon L. Ford Telephone No. (571) 272-1600	

Form PCT/IPEA/408 (cover sheet)(July 1998)

5'
27

23

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed.
- ☒ the description:
 pages 1-37 as originally filed
 pages NONE, filed with the demand
 pages NONE, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims:
 pages 38-46 as originally filed
 pages NONE, as amended (together with any statement) under Article 19
 pages NONE, filed with the demand
 pages NONE, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings:
 pages 1-6 as originally filed
 pages NONE, filed with the demand
 pages NONE, filed with the letter of _____.
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages NONE as originally filed
 pages NONE, filed with the demand
 pages NONE, filed with the letter of _____.

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rules 55.2 and 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ as filed in the international application in printed form.
- ☐ as filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ as furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ as furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☒ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☒ the description, pages NONE
- ☒ the claims, Nos. NONE
- ☒ the drawings, sheets/fig. NONE

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application
PCT/US02/37945

23

V. Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability, citations and explanations supporting such statement

1. STATEMENT

Novelty (N)	Claims <u>NONE</u>	<u>YES</u>
	Claims <u>1-75</u>	<u>NO</u>
Inventive Step (IS)	Claims <u>NONE</u>	<u>YES</u>
	Claims <u>1-75</u>	<u>NO</u>
Industrial Applicability (IA)	Claims <u>1-75</u>	<u>YES</u>
	Claims <u>NONE</u>	<u>NO</u>

2. CITATIONS AND EXPLANATIONS

Claims 1-45 and 56-75 lack novelty under PCT Article 33(2) as anticipated by CUNNINGHAM-RUNDLES (5,169,627). The prior art teach an oral pharmaceutical composition comprising polyethylene glycol. The prior art also teaches methods for reconstituting secretory immunity in a patient suffering from a secretory immune deficiency comprising administering an effective amount of polyethylene glycol with serum immunoglobulins. The prior art teaches that the composition may be administered to infants or patients with a deficiency or patients with compromised IgA gastrointestinal immunodeficiency. The prior art anticipates the claimed invention.

Claims 54-55 lack novelty under PCT Article 33(2) as anticipated by OLDHAM ET AL. (6,074,671). The prior art teach a condom coated with lectins in a vehicle such as polyethylene glycol. The prior art teaches that the invention prevents sexually transmitted diseases. The prior art anticipates the claimed invention.

Claims 46-51 under PCT Article 33(2) as anticipated by BLUM ET AL. (5,661,177). The prior art teach compositions comprising polyethylene glycol to treat and prevent skin irritation.

Claims 52-53 under PCT Article 33(2) as anticipated by WARNE ET AL. (6,126,933). The prior art teach compositions comprising polyethylene glycol to treat and prevent inflammatory bowel diseases. Although the prior does not specifically teach that the compositions comprising polyethylene glycol are specially used to irrigate at least a portion of the urinary tract, it would be obvious to one of skill in the art at the time the invention was made to use polyethylene glycol containing compositions to irrigate the urinary tract because the prior art teach that compositions comprising polyethylene glycol to treat and prevent inflammatory bowel diseases

NEW CITATIONS

US 5,661, 177 (BLUM ET AL.) 26 August 1997, see columns 3-4.

Materiales y Métodos para Prevenir y Tratar Desórdenes Epiteliales Mediados por Microbios

RESUMEN, OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCIÓN

La presente invención provee composiciones farmacéuticas en forma de polímeros biocompatibles de peso molecular relativamente alto tales como polietilén glicol, opcionalmente complementadas con un polímero protector como dextrán y/o nutrientes patógenos esenciales tales como L-glutamina. También se proveen métodos para prevenir o tratar la sepsis derivada del intestino, atribuible a patógenos intestinales tales como *Pseudomonas aeruginosa*, mediante la administración de polietilén glicol de alto peso molecular, así como los métodos para monitorear la administración de polietilén glicol de alto peso molecular, tal como en métodos para prevenir, aliviar o tratar desórdenes epiteliales inducidos por microbios, como los ejemplificados por la sepsis derivada del intestino. Frecuentemente, la sepsis derivada del intestino surge como una complicación en los mamíferos que se recuperan de intervención quirúrgica o sufren de una enfermedad o desorden, proporcionando indicaciones de animales adecuados para recibir tratamiento preventivo. Finalmente, la invención provee una composición que comprende fórmula de infante y polietilén glicol, y métodos para usar esta composición.

Materiales y Métodos para Prevenir y Tratar Desordenes Epitellales mediados por Microbios

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención está relacionada con los materiales y métodos para prevenir o tratar desordenes epitellales mediados por microbios, tales como sepsis derivada del intestino.

ANTECEDENTES

Los desordenes epitellales mediados por microbios, o condiciones anormales, presentan una amenaza significativa en la salud del hombre y animales, imponiendo una carga en los sistemas de cuidado de la salud del mundo entero. Un ejemplo de tales desordenes, la sepsis derivada del intestino, es una causa mayor de mortalidad entre organismos, tales como pacientes humanos, que sufren de cualquiera de las variedades de enfermedades, desordenes o aflicciones, tales como daños de quemaduras, enterocolitis neonatal, neutropenia severa, enfermedad de Intestino inflamatorio, y rechazo de órganos siguiendo el transplante. El reservorio del tracto intestinal ha sido bien reconocido por ser un foco potencialmente letal de sepsis mediada por bacterias en, e.g., pacientes críticamente enfermos hospitalizados. La habilidad de los patógenos microbianos tales como las pseudomonas (e.g., *Pseudomonas aeruginosa*) de perturbar la función reguladora de la barrera epitelial Intestinal puede ser una característica de definición entre organismos oportunistas capaces de causar la sepsis derivada del intestino. En muchas de estas infecciones, la *seudomona aureginosa* ha sido identificada como el patógeno causante. Significativamente, el tracto intestinal ha mostrado ser el sitio primario de colonización de patógenos oportunistas tales como *P. aeruginosa*.

Los enfoques de la terapéutica convencional para la prevención o tratamiento de desordenes epitellales mediados por microbios tales como sepsis derivada del intestino, se han cumplido con éxito incompleto. Los enfoques basados en antibióticos están comprometidos por la dificultad de adaptar antibióticos al patógeno intestinal en una forma que no impacte la flora intestinal restante. En adición, muchos de los patógenos intestinales,

como los tipificados por *P. aeruginosa*, usualmente se vuelven resistentes a los retos antibióticos, produciendo un enfoque costoso, en curso e incompletamente exitoso para la prevención o tratamiento. Los problemas también afectan criterios inmunoterapéuticos. Particularmente, muchos patógenos intestinales, tales como *P. aeruginosa*, son inmunoelusivos haciendo tales enfoques mínimamente efectivos.

Otro enfoque a la prevención o tratamiento de desórdenes como la sepsis derivada del intestino es el lavado intestinal. En varios años pasados se ha intentado el lavado intestinal usando soluciones de polietilén glicol (PEG) con algunos informes anecdóticos que sugieren que el PEG puede mostrar alguna promesa en el tratamiento de la sepsis derivada del intestino a través de una variedad de circunstancias clínicas y experimentales. El PEG en estas soluciones tiene un peso molecular promedio de 3,500 daltons y las soluciones están disponibles comercialmente (e.g., Golytely). Los mecanismos por los cuales estas soluciones de relativamente bajo peso molecular (PMB) de PEG proveen un beneficio terapéutico en el tratamiento o prevención de la sepsis derivada del intestino son desconocidos. Típicamente, estas soluciones se usan para lavar o limpiar el tracto intestinal de organismos en riesgo de desarrollar, o que sufren de sepsis derivada del intestino. Como resultado de administrar estas soluciones de PMB de PEG al tracto intestinal, hay un cambio variable en la composición floral del intestino tratado dependiendo del método de concentración y el peso molecular de los compuestos usados. Por ejemplo, las soluciones que tienen concentraciones de PEG mayores de aproximadamente 20% pueden producir una acción microbicida que causa la eliminación de microorganismos potencialmente protectores en el tracto intestinal de un huésped tensionado. Además, las soluciones de peso molecular bajo de PEG pueden perder su eficacia en la atenuación de la capacidad de virulencia de ciertos organismos a pesar de preservarlos. Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de una solución que inhiba la expresión de virulencia microbiana (las propiedades dañinas de un microbio) sin matar al microbio o microbios vecinos, proporcionando así el beneficio de preservar el ecosistema natural de la microflora intestinal. Por ejemplo, la preservación de la composición de la flora nativa proporcionaría la competencia de patógenos oportunistas que podrían colonizar el intestino.

Concomitante con un cambio en la composición floral es un cambio en la fisiología del organismo. Estos cambios fisiológicos pueden ser monitoreados mediante el ensayo de cualquier número de actividades enzimáticas características, tales como los niveles de deshidrogenasa lactato. En consecuencia, los tratamientos de PEG PMB del intestino producen cambios significativos en la fisiología de los organismos tratados, con impredecibilidad, y así consecuencias potencialmente nocivas, a largo plazo para la salud y bienestar del organismo tratado. Más aún, tales tratamientos provocan reacciones de demanda física en forma de evacuación intestinal masiva, en organismos críticamente enfermos, tales como pacientes humanos hospitalizados.

Así, permanece una necesidad en la técnica de proveer una composición efectiva en la prevención o tratamiento de un desorden epitelial mediado por microbios (e.g., sepsis derivada del intestino) y/o un síntoma asociado con tal desorden, junto con los métodos para lograr tales beneficios, sin crear las complicaciones potenciales o adicionales a través de la alteración significativa de la fisiología del organismo tratado.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención satisface la necesidad mencionada anteriormente en la técnica mediante el suministro de una composición de polietilén glicol de alto peso molecular (PMA) que provee protección efectiva contra una condición anormal caracterizada por una superficie epitelial en riesgo de desarrollar un desorden mediado por microbios. Condiciones anormales ejemplares incluyen sepsis derivada de intestino y otras enfermedades/desordenes asociados con la flora intestinal, debido a los patógenos intestinales que incluyen, pero no se limitan a *P. aeruginosa*. El PEG PMA inhibe o previene el contacto de tales patógenos como *P. aeruginosa* con la superficie epitelial intestinal. Adicionalmente, el PEG de alto peso molecular suprime la expresión de virulencia en estos patógenos (e.g., *P. aeruginosa*) sensibles a una variedad de señales que pueden involucrar redes de señalización de quorum sensing. La habilidad de los PEGs de PMA para inhabilitar en la interfaz infecciosa entre el patógeno intestinal y el epitelio intestinal, provee un enfoque alternativo para prevenir o

tratar la sepsis derivada del intestino, e.g., siguiendo el esfuerzo catabólico. De forma importante, los tratamientos con PEGs de PMA serían efectivos en costo y relativamente simples de llevar a cabo en pacientes humanos, así como una variedad de otros organismos tales como animales para ganadería significativos agrícolaemente (e.g., ganado, cerdos, ovejas, cabras, caballos, pollos, pavos, patos, gansos, y similares), mascotas y animales de zoológico.

Un aspecto de la invención provee un método para reducir la probabilidad de mortalidad en un animal con una condición anormal, incluyendo una condición de enfermedad, que comprende una superficie epitelial en riesgo de desarrollar un desorden mediado por microbios, seleccionado del grupo consistente de sepsis derivada del intestino, un daño de quemadura, enterocolitis necrotizantes neonatal, enteropatía, rechazo de trasplante, bolsitis y abdomen de cerdo, que comprende administrar una dosis efectiva de polietilén glicol (PEG) a un animal en necesidad de este, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 5,000 daltons.

Animales adecuados incluyen, pero no se limitan al perro, gato, oveja, cabra, vaca, cerdo y humano. En el método mencionado anteriormente, el PEG tiene preferiblemente un peso molecular promedio de al menos 15,000 daltons, y está preferiblemente entre 5,000 y 20,000 daltons, o entre 15,000 y 20,000 daltons. También es preferido un PEG que tiene un peso molecular promedio de 6,000, de 7,000, de 8,000, de 9,000, de 10,000, de 11,000, de 12,000, de 13,000, de 14,000 y de 25,000 daltons. Además, el PEG puede estar en solución acuosa que comprende 5-20% de PEG, y preferiblemente 10-20% de PEG (e.g., PEG al 10%). En una realización del método, la condición está asociada con la presencia de un organismo de *Pseudomonas aeruginosa* en el organismo, y la integridad de la membrana celular de tal *P. aeruginosa* no está detectablemente alterada. En otra realización del método, el patrón de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* no está detectablemente alterado.

Otro aspecto de la invención es un método para inhibir la sepsis derivada del intestino, que comprende contactar un epitelio mamífero, tal como un intestino, con polietilén glicol (PEG), en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 5,000 daltons, y preferiblemente al

menos 15,000 daltons. En una realización de este método, el intestino mamífero se contacta con el PEG por al menos 30 minutos.

Aspectos adicionales de la invención incluyen un método para inhibir la expresión de lectina PA-I/adhesina es un patógeno de los epitelios, e.g., un patógeno intestinal, que comprende la administración de una dosis efectiva de polietilén glicol a un mamífero en necesidad de este; un método para inhibir la activación inducida por el epitelio (e.g., inducida por el epitelio intestinal) de PA-I lectina/adhesina, que comprende la administración de una dosis efectiva de polietilén glicol a un animal en necesidad de este; un método para inhibir el cambio morfológico inducido por C4-HSL de un patógeno de los epitelios (e.g., un patógeno intestinal), que comprende la administración de una dosis efectiva de polietilén glicol a un animal en necesidad de este; un método para reducir la expresión de virulencia en un patógeno de los epitelios (e.g., un patógeno intestinal), que comprende la administración de una dosis efectiva de polietilén glicol a un animal en necesidad de este; un método para reducir o prevenir la interacción de una superficie epitelial con un factor de virulencia microbiano, que comprende que comprende la administración de una dosis efectiva de polietilén glicol a un animal en necesidad de este; un método para aliviar la patogénesis epitelial (e.g., intestinal) mediante la prevención de la formación de activación patogénica del quorum sensing, que comprende la administración de una dosis efectiva de polietilén glicol a un animal en necesidad de este; y un método para inhibir la interacción entre el epitelio (e.g., epitelio intestinal) de un vertebrado y una bacteria, como una seudomona (e.g., *Pseudomonas aeruginosa*), que comprende contactar el epitelio con polietilén glicol. En todos estos aspectos de la invención, el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 5,000 daltons, y preferiblemente de al menos 15,000 daltons.

Aún un aspecto adicional de la invención es un método para inhibir la reducción inducida por *Pseudomonas aeruginosa* en la resistencia eléctrica transepitelial de una capa epitelial mamífera, como una capa epitelial intestinal, que comprende contactar la capa epitelial (intestinal) con polietilén glicol, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 5,000 daltons, y preferiblemente al menos 15,000 daltons. Preferiblemente, el PEG tiene un peso molecular promedio de 15,000 a 20,000 daltons. En

una realización preferida, la integridad de la membrana del microbio (e.g., *P. aeruginosa*) no está detectablemente alterada.

Aún otro aspecto de la invención es un método para inhibir la adherencia de una célula bacteriana a un epitelio mamífero, tal como un intestino mamífero, que comprende contactar el intestino con polietilén glicol, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 5,000 dalton, y preferiblemente al menos 15,000 daltons. También con este método se prefiere que el PEG tenga un peso molecular promedio de 15,000 a 20,000 daltons. El PEG puede estar en una solución acuosa que comprende del 5-20% de PEG, y preferiblemente 5-10% de PEG. Una célula bacteriana ejemplar contemplada como dócil para la inhibición de la adherencia mediante este método es una Pseudomonad, como la *P. aeruginosa*.

Otro aspecto de la invención es un método para reducir la expresión de PA-I lectina/adhesina en una célula bacteriana, que comprende contactar la célula bacteriana con polietilén glicol, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 5,000 dalton, y preferiblemente 15,000 daltons, y está preferiblemente entre 15,000 y 20,000 daltons. De nuevo, el PEG puede estar en una solución acuosa que comprende 5-20% de PEG, y preferiblemente 5-10% de PEG.

En otro aspecto, la invención provee un método para reducir la probabilidad de mortalidad en un animal que muestra un desorden epitelial mediado por microbios, seleccionado del grupo consistente de sepsis derivada del intestino, un daño de quemadura, enterocolitis necrotizante neonatal (NEC), neutropenia severa, colitis tóxica, enfermedad de intestino inflamatoria, enteropatía (e.g., en el críticamente enfermo), rechazo de trasplante, bolsitis y abdomen de cerdo, que comprende la administración de una cantidad efectiva de un compuesto (e.g., PEG) que se adhiere a una célula seleccionada del grupo consistente de célula epitelial intestinal mamífera y una célula bacteriana intestinal, en donde el compuesto se adhiere a la célula en una forma topográficamente asimétrica, inhibiendo así la interacción de la célula epitelial intestinal mamífera y la célula bacteriana. Un compuesto preferido es un sufactante. En una realización de este método, el compuesto es PEG, que tiene preferiblemente un peso molecular

promedio de la menos 15,000 daltons. En otra realización de este método, la inhibición se determina mediante microscopía de fuerza atómica. Aún en otra realización de este método, la célula bacterial es un patógeno intestinal que no hay modificación detectable de sus características de crecimiento. En aspectos relacionados, este método además comprende la introducción de una cantidad efectiva de dextrán en el intestino del animal y/o la introducción de una cantidad efectiva de L-glutamina, L-glutamina recubierta de dextrán, inulina recubierta de dextrina, ácido butírico recubierto con dextrán, uno o más fructo-oligosacáridos, N-acetil-D-galactosamina, manosa recubierta con dextrán y galactosa, lactosa y amortiguadores de balance y agentes estabilizantes, conocidos en la técnica, en el intestino del animal. Cuando se administran juntos como una composición simple, esta administración de solución simple de multicomponentes tratará y preparará el tracto intestinal con anticipación de un trastorno de la flora intestinal y la función barrera del intestino, tal como ocurre siguiendo los esfuerzos de tipo catabólico, quirúrgico y traumático.

Otro aspecto de la invención es un método para aliviar un síntoma asociado con cualquier enfermedad o condición que surge de, o característica de una condición anormal del epitelio, tal como sepsis derivada del intestino, que comprende la administración de polietilen glicol al intestino, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 5,000 daltons, preferiblemente al menos 15,000 daltons, y está preferiblemente entre 15,000 y 20,000 daltons. El PEG puede estar en una solución acuosa que comprende 5-20% de PEG, y preferiblemente 5-10% de PEG. La invención abarca aliviar un síntoma asociado con cualquier enfermedad o condición revelada aquí.

Aún otro aspecto de la invención es un método para prevenir la pérdida de la capacidad de lactancia en un animal que muestra una condición anormal en forma de una superficie epitelial de una glándula mamífera en riesgo de desarrollar un desorden mediado por microbios que afecta la producción de leche, que comprende la administración, e.g. tópicamente, de una dosis efectiva de un polietilen glicol de al menos 5,000 daltons, y preferiblemente al menos 15,000 daltons, a la superficie epitelial de la glándula mamaria. Animales ejemplares incluyen mamíferos, tales como oveja, cabras, vacas, cerdos, caballos y humanos. En un aspecto

relacionado, la invención provee un método para tratar la pérdida de la capacidad de lactancia en un animal caracterizado por un desorden mediado por microbios de una superficie epitelial de una glándula mamaria, que afecta la producción de leche, e.g., tópicamente, de una dosis efectiva de un polietilen glicol de al menos 5,000 daltons, y preferiblemente al menos 15,000 daltons, a la glándula mamaria. En otro aspecto relacionado, la invención provee un método para prevenir el desarrollo de un desorden epitelial mediado por microbios, en un animal en edad de amamantamiento, que comprende la administración de una dosis efectiva de polietilen glicol de al menos 5,000 daltons, y preferiblemente al menos 15,000 daltons, al animal. Animales adecuados incluyen mamíferos tales como humanos, animales para ganadería, mascotas domesticadas y animales de zoológicos. En una realización, el PEG está mezclado con cualquier fórmula de infante conocida en la técnica.

Un aspecto relacionado de la invención es una composición que comprende fórmula de infante y polietilen glicol (PEG), en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 5,000 daltons. De nuevo, se puede usar cualquier fórmula de infante conocida en la técnica, incluyendo fórmulas basadas en la leche de un mamífero, como leche de vaca, leche de cabra, y similares, así como fórmulas basadas en leche de soya. La fórmula también puede ser enriquecida con cualquier vitamina y/o elemento, incluyendo la fortificación con hierro. El PEG tiene preferiblemente un peso molecular promedio de al menos 15,000 daltons, y está presente preferiblemente en el rango de 5-20% a la reconstitución o hidratación de la fórmula de infante o de bebé. La invención provee además un método para proporcionar nutrición a un animal, preferiblemente en edad de amamantamiento, que comprende la administración de una dosis efectiva de la composición que comprende la fórmula de infante y PEG al animal.

Aún otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende polietilen glicol de al menos 5,000 daltons, y preferiblemente 15,000 daltons, peso molecular promedio y un adyuvante, vehículo o diluyente adecuado. En un aspecto relacionado, la composición comprende además un compuesto seleccionado del grupo consistente de L-glutamina recubierta de dextrán, inulina recubierta de dextrán, ácido butírico recubierto con dextrán, uno o más fructo-oligosacáridos, N-acetil-D-galactosamina,

manosa recubierta con dextrán y galactosa, lactosa y amortiguadores de balance y agentes estabilizantes, conocidos en la técnica.

Un aspecto adicional de la invención es un kit para el tratamiento o prevención terapéutica de una condición anormal caracterizado por una superficie epitelial en riesgo de desarrollar un desorden mediado por microbios, tal como sepsis derivada del intestino, que comprende una de las composiciones farmacéuticas mencionadas anteriormente, y un protocolo que describe el uso de la composición en el tratamiento o prevención terapéutica de la condición anormal. Protocolos adecuados para inclusión en el kit describen cualquiera de los métodos terapéuticos o preventivos revelados aquí.

Aún otros aspectos de la invención están involucrados con los métodos para prevenir una condición anormal caracterizada por una superficie epitelial en riesgo de desorden mediado por microbios, incluyendo enfermedades. Por ejemplo, la invención abarca un método para prevenir una enfermedad o una condición anormal, que comprende la administración de una composición que comprende una dosis efectiva de polietilén glicol (PEG) a un animal, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 5,000 daltons. Una enfermedad adecuada o condición anormal, dócil a los métodos preventivos de la invención, es seleccionada del grupo consistente de oído de nadador, otitis media aguda, otitis media crónica, diarrea inducida por antibióticos, colitis pseudomembranosa, una enfermedad de Intestino inflamatorio, enfermedad de intestino irritable, enterocolitis neutropénica, pancreatitis, síndrome de fatiga crónica, síndrome de disbiosis, colitis microscópica, una infección crónica del tracto urinario, una enfermedad transmitida sexualmente e infección. Un animal adecuado como sujeto para tales métodos preventivos es seleccionado del grupo consistente de perro, gato, oveja, cabra, vaca, cerdo, pollo, caballo y humano. El PEG tiene preferiblemente un peso molecular promedio de al menos 15,000 daltons; también es preferido el PEG que tiene un peso molecular promedio entre 15,000 y 20,000 daltons. Además, el PEG puede estar en una solución acuosa que comprende 10-20% de PEG, y preferiblemente 10% de PEG. La composición que es administrada puede además comprender un vehículo seleccionado del grupo consistente de una solución líquida, un gel tópico, y una solución adecuada para nebulización. Adicionalmente, la

composición puede además comprender un compuesto seleccionado del grupo consistente de L-glutamina recubierta de dextrán, inulina recubierta de dextrán, ácido butírico recubierto con dextrán, un fructo-oligosacárido, N-acetil-D-galactosamina, manosa recubierta con dextrán, galactosa, lactosa y lactulosa. En una realización, la composición comprende PEG, L-glutamina recubierta de dextrán, inulina recubierta de dextrán, ácido butírico recubierto con dextrán, un fructo-oligosacárido, N-acetil-D-galactosamina, manosa recubierta con dextrán, galactosa y lactulosa.

Ya otro aspecto de la invención es un método para prevenir infección de la piel que comprende el paso de aplicar una composición que comprende una cantidad efectiva de polietilen glicol (PEG) a un animal, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 5,000 daltons. La composición puede además comprender un vehículo seleccionado del grupo consistente de un ungüento, una crema, un gel y una loción. La invención contempla que un agente causante de la infección es seleccionado del grupo consistente de *Bacillus anthracis*, Virus de la viruela, *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *Clostridium difficile*, rotavirus, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacteria cloacae*, *Candida albicans*, y *Candida glabrata*.

Otro aspecto de la invención es un método para prevenir infección respiratoria, que comprende el paso de administrar una cantidad efectiva de polietilen glicol (PEG) a un animal, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 5,000 daltons. Una infección respiratoria dócil a los métodos preventivos de la invención puede surgir del contacto con un agente infeccioso por medio de una ruta conocida en la técnica, que incluye neumonías asociadas con ventiladores (e.g., neumonía asociada con ventilador), agentes infecciosos transportados en el aire, agentes infecciosos dispersos en un fluido nebulizado como estornudo, y similares. En algunas realizaciones, el método previene la infección respiratoria mediante un agente seleccionado del grupo consistente de *Bacillus anthracis* y Virus de la viruela.

Ya otro aspecto de la invención es un método para irrigar al menos una porción del tracto urinario con el fin de prevenir una infección crónica del

tracto urinario, que comprende el paso de entregar una cantidad efectiva de una composición que comprende PEG a la uretra, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 5,000 daltons. En una realización, la composición es administrada a una porción del tracto urinario que incluye al menos la vejiga.

Otro aspecto de la invención es un método para prevenir una enfermedad transmitida sexualmente, que comprende el paso de aplicar polietilen glicol (PEG) a un condón, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 5,000 daltons. Un aspecto relacionado de la invención es un condón que comprende al menos un recubrimiento parcial con PEG, que tiene un peso molecular promedio de al menos 5,000 daltons. Ya otro aspecto relacionado de la invención es un kit que comprende un condón y polietilen glicol (PEG) que tiene un peso molecular promedio de al menos 5,000 daltons.

La invención también abarca un método para prevenir un desorden del tracto digestivo, que comprende la administración de una dosis efectiva de una composición que comprende polietilen glicol (PEG) a un animal en necesidad de este, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 5,000 daltons. Desordenes del tracto digestivo ejemplares dóciles a los métodos preventivos de la invención pueden ser seleccionados del grupo consistente de enterocolitis necrotizante neonatal, diarrea inducida por antibióticos, colitis pseudomembranosa, una enfermedad de intestino inflamatorio, enfermedad de intestino irritable, enterocolitis neutropénica, pancreatitis, síndrome de disbiosis y colitis microscópica.

Otro aspecto de la invención es un método para monitorear la administración de polietilen glicol (PEG) a un animal en necesidad de este, que comprende la administración de una cantidad efectiva de una composición que comprende PEG marcado, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 5,000 daltons, a un animal en necesidad de este, y detectar el PEG marcado, por medio del cual, la cantidad y/o ubicación del PEG marcado (e.g., asociado con un microbio) provee información útil para la evaluación de la eficacia de la administración. En una realización del método de monitoreo, el marcador es un fluoróforo (e.g., fluoresceína, rodamina, Cy3, Cy5). En otra realización del método, la

detección de PEG marcado comprende la inspección endoscópica. El método de monitoreo también contempla que el PEG marcado es detectado en una muestra de heces (i.e., el PEG marcado asociado con un componente tal como un microbio, cuya fuente es una muestra de heces). Adicionalmente, el método de monitoreo puede además comprender la administración de un segundo marcador específico para un microbio, y detectar el segundo marcador. "Específico" como se usa en este contexto significa que el marcador es detectablemente asociable con al menos un microbio.

Otro aspecto de la invención es un método para monitorear la administración de polietilen glicol (PEG) a un animal en necesidad de este, que comprende obtener una muestra de un animal que recibe polietilen glicol, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 5,000 daltons, contactar la muestra con una célula epitelial, y medir la adherencia de un microbio en la muestra a la célula epitelial, por medio de la cual la cantidad y/o ubicación del PEG provee información útil para la evaluación de la eficacia de la administración. La medida se puede realizar mediante examen microscópico.

Otro método de monitoreo según la invención es un método para monitorear la administración de polietilen glicol (PEG) a un animal en necesidad de este, que comprende obtener una muestra de un animal que recibe polietilen glicol, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 5,000 daltons, contactar la capa celular epitelial con la muestra, y medir una resistencia eléctrica trans-epitelial de la capa epitelial, por medio de la cual la administración efectiva es indicada mediante una disminución reducida de la resistencia eléctrica trans-epitelial, con respecto a un valor de control. El valor de control puede ser interno (i.e., medir la TEER antes de la administración de PEG), o externo (i.e., valor desarrollado en otros estudios que se usa confiablemente para comparación).

Ya otro método de monitoreo de la invención es un método para monitorear la administración de polietilen glicol (PEG) a un animal en necesidad de este, que comprende obtener una muestra de un animal que recibe polietilen glicol, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 5,000 daltons, aislar un microbio de la muestra, y medir la

hidrofobicidad de la superficie celular del microbio, por medio de la cual la hidrofobicidad de cualquier microbio en la muestra provee información útil en la evaluación de la eficacia de la administración. "Aislar", como se usa en este contexto, significa separado de otros componentes de la muestra (e.g., material sólida) suficientemente para permitir las medidas de hidrofobicidad, como se entendería en la técnica.

Un aspecto relacionado de la invención es un kit para monitorear la administración de polietilen glicol, que comprende un PEG marcado y un protocolo que describe el uso del PEG marcado, para monitorear la administración de este. Protocolos adecuados incluyen cualquiera de los métodos revelados aquí, o conocidos en la técnica relativa a la administración, entrega o aplicación de PEG. En algunas realizaciones de este aspecto de la invención, el kit comprende además un marcador libre.

Aún otro método de monitoreo de la invención es un método para monitorear la administración de polietilen glicol (PEG) a un animal en necesidad de este, que comprende obtener una muestra de un animal que recibe polietilen glicol, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 5,000 daltons, y detectar la actividad de PA-I lectina/adhesina en la muestra, por medio de la cual la actividad de PA-I lectina/adhesina provee información útil para la evaluación de la eficacia de la administración. En una realización de este método, la PA-I lectina/adhesina es detectada mediante el ligamiento a un patrón de enlace de PA-I lectina/adhesina, tal como cualquier forma conocida de un anticuerpo específico de PA-I lectina/adhesina o un carbohidrato al cual la PA-I lectina/adhesina se enlaza específicamente. Un aspecto relacionado de la invención es un kit para monitorear la administración de polietilen glicol (PEG) que comprende un patrón de enlace de PA-I lectina/adhesina, y un protocolo que describe el uso del patrón de enlace para detectar la PA-I lectina/adhesina, en la muestra. Protocolos adecuados incluyen cualquiera de los métodos revelados aquí o conocidos en la técnica relacionada con el uso de PEG.

Otras características y ventajas de la presente invención se entenderán mejor mediante la referencia de la siguiente descripción detallada, incluyendo los dibujos y los ejemplos.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 provee las tasas de mortalidad en ratones a las 48 h sometidos a laparotomía simulada o hepatectomía quirúrgica al 30% seguido de la inyección directa de *P. aeruginosa* PA27853 en el ciego. Los ratones fueron sometidos a una hepatectomía sin sangrado al 30% del lóbulo izquierdo inmediatamente, seguido por la inyección cecal de 1×10^7 cfu/ml de PA27853. Cada grupo contenía 7 ratones. Los ratones de control sometidos a laparotomía simulada seguida de la inyección de cantidades iguales de PA27853 en el ciego. Para los ratones en los grupos de PEG, 1×10^7 cfu/ml de PA27853 fueron suspendidos en PEG 3.35 (PEG de PMB 3,350) o PEG 15-20 (PEG de PMA 15,000 a 20,000 daltons) antes de la inyección cecal. Las curvas de respuesta de dosis para PEG 15-20 se ven en el panel b. a. Un efecto protector estadísticamente significativo de PEG 15-20 se determinó mediante la Prueba Exacta de Fisher ($P < 0.001$). b. Se determinó que la concentración protectora mínima de PEG 15-20 era 5% ($P < 0.05$). c. Los cultivos bacterianos cuantitativos de contenidos cecales (heces), mucosa cecal lavada, hígado y sangre, 24 horas siguiendo la hepatectomía quirúrgica al 30% e inyección cecal directa de 1×10^7 cfu/ml de PA27853. Una ANOVA de una vía demostró un aumento estadísticamente significativo del conteo bacteriano en los contenidos cecales, mucosa, hígado y sangre en ratones siguiendo la hepatectomía ($P < 0.001$). Se observó una disminución significativa ($P < 0.05$) en los conteos bacterianos del hígado y sangre para PEG 3350, mientras que el PEG 15-20 previno completamente la diseminación de PA27853 al hígado y sangre de los ratones.

La Figura 2 muestra el efecto protector de PEG 15-20 contra la disfunción de la barrera epitelial inducida por PA27853 como se evaluó mediante la resistencia eléctrica trans-epitelial. a. Los datos representan la media $\pm$ SEM % de la máxima caída de TEER desde la línea de base de cultivos triplicados ($n=7$) observados durante 8 horas de exposición apical a 1×10^7 cfu/ml de PA27853. Una disminución estadísticamente significativa en el TEER se demostró (ANOVA de una vía ($P < 0.001$)) en las células caco-2 expuestas a PA27853. Se demostró un efecto protector estadísticamente significativo sobre la caída de TEER inducida por PA27853 para PEG 15-20 ($P < 0.001$). b. Imagen de células caco-2 en presencia de PEG 3.35 y

exposición apical a PA27853. Las imágenes tomadas después de 4 horas de co-cultivo demostraron la pérdida de integridad de monocapa con células flotando de 30-40 micrones por encima de las estructuras de célula que muestran adherencia de PA27853 a las membranas celulares. c. Las células caco-2 expuestas apicalmente a PA27853 después de 4 horas en presencia de PEG 15-20 no mostraron evidencia de células flotantes en ninguno de los planos examinados.

La figura 3 ilustra el efecto inhibitor de los PEG2 sobre la expresión de PA-I en PA27853. a. Análisis de manchado Western. La exposición de PA27853 a la molécula C4-HSL de señal de quorum sensing 1 mM, produjo un aumento estadísticamente significativo ($P < 0.001$ ANOVA de una vía) en la expresión de la proteína de PA-I que fue parcialmente inhibida en presencia de PEG 3.35 al 10%, y mucho más inhibido con PEG 15-20 al 10%. a'. La concentración inhibitoria mínima de PEG 15-20 sobre la expresión de PA-I inducida por C4-HSL fue del 5% ($P < 0.01$). b. La microscopía de electrón de células de bacterias individuales expuestas a C4-HSL en presencia y ausencia de PEGs, demostró que la C4-HSL causó un cambio morfológico en la forma y expresión Pili de *P. aeruginosa*. El efecto morfológico inducido por C4-HSL se eliminó completamente en presencia de PEG 15-20, pero no de PEG 3.35. Se puede ver un efecto del tipo halo alrededor de PA27853 expuesta al PEG 15-20. c. Hibridación hacia el Norte. La exposición de PA27853 a C4-HSL 0.1 mM produjo un aumento estadísticamente significativo ($P < 0.001$ ANOVA de una vía) en la expresión de *PA-I* mRNA que se inhibió en gran medida con PEG 15-20 al 10%. d. El aumento en *PA-I* mRNA inducido por 4 horas de exposición a células caco-2 se inhibió en presencia de PEG 15-20, pero no en PEG 3.35 ($P < 0.001$ ANOVA de una vía).

La Figura 4 muestra el efecto de las soluciones de PEG sobre patrones de crecimiento áridos de la integridad de la membrana de PA27853. a. El efecto de las dos soluciones de PEG sobre la integridad de la membrana bacteriana se evaluó mediante el método de manchado que consiste de SYTO 9 y yoduro de propidio. Ninguna solución de PEG tuvo ningún efecto sobre la permeabilidad de la membrana bacteriana. b. Los patrones de crecimiento de PA27853 parecen idénticos en las dos soluciones de PEG con respecto al medio de TSB libre de PEG (control).

La Figura 5 presenta imágenes de Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) de células Caco-2 y células bacterianas expuestas a los PEGs. a-c. imágenes de AFM de células caco-2 en presencia de medio solo (a), medio con PEG 3.35 (b), y medio con PEG 15-20. Se vio que el PEG 3.35 forma una alfombra lisa sobre las células caco-2 (b), mientras que el PEG 15-20 formó una cubierta más definida topográficamente (c). d-f. Imágenes de AMF de PA27853 en PEG 3.35 y PEG 15-20. El PEG 3.35 formó una envoltura lisa alrededor de las células bacterianas (e), mientras que el PEG 15-20 no sólo se pegó estrechamente a las células individuales (f), sino que también aumentó el diámetro de polímero/bacteriano (g,h), distanciando así las bacterias individuales entre sí.

La Figura 6 muestra el efecto de la solución de PEG sobre el patrón de dispersión/agregación de PA27853. El patrón de dispersión de las células bacterianas en los discos dTC3 se observó directamente con un microscopio de fluorescencia invertida Axiovert 100 TV usando un filtro de fluorescencia DIC y GFP, en una magnificación de objetivo de 63 X. La temperatura se ajustó con un sistema de control de temperatura de termoestato Biopetechs. Se usaron lámparas de tungsteno (100 V) tanto para la excitación DIC como GFP. Se usó el software de imágenes de 3D (slidebook) de Intelligent Imaging Innovations para representar el patrón de dispersión de las células bacterianas en el plano Z usando el filtro GFP. Se vieron células de *P. aeruginosa* en el medio sin células caco-2 en la imagen DIC (6a₁) y reconstrucción del plano Z (6a₂). En presencia de células caco-2, las células bacterianas desarrollaron una apariencia agregada (6b₁) y se vieron adherentes a las células caco-2 (6b₂). El PEG 3350 al 10% disminuyó la motilidad de las bacterias e indujo la formación inmediata de microcolonias bacterianas en forma de hongos (6c₁) que se adhieren al fondo del agujero (6c₂). En presencia de células caco-2, las microcolonias bacterianas fueron del orden de 8 micrones por encima del plano de las células epiteliales (6d_{1,2}). El PEG 15-20 al 10% disminuyó en gran medida la motilidad de las células *P. aeruginosa*. Sin embargo, para las primeras 0.5-1 horas de incubación en medio que contenía PEG 15-20, las células bacterianas formaron microcolonias en forma de araña que estaban cerca del fondo del agujero. (6e_{1,2}). En varias horas, las microcolonias en forma de patas de araña ocuparon el espacio/volumen total del medio (no mostrado). En

presencia de las células caco-2, las células de *P. aeruginosa* perdieron la configuración tipo araña y se vieron elevadas por encima del plano del epitelio (30-40 micrones) (8f_{1,2}).

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La invención provee productos y métodos que presentan colectivamente enfoques simples y económicos para el tratamiento y/o prevención de una variedad de desordenes epiteliales mediados por microbios, i.e., condiciones anormales y enfermedades, que sufren muchos mamíferos, incluyendo los humanos. Mediante la administración de polímeros polares de alto peso molecular, tal como polietilen glicol de PMA a un animal en necesidad, incluyendo aquellos en riesgo, se pueden tratar cualquier número de condiciones anormales de salud o amenaza a la vida, i.e., desordenes y enfermedades epiteliales, que incluyen sepsis derivada del intestino, con costo mínimo y entrenamiento mínimo de los médicos. Sin intentar estar ligado por la teoría, los beneficios proporcionados por la invención son consistentes con el principio que los desordenes epiteliales mediados por microbios pueden ser prevenidos, mejorados o tratados exitosamente facilitando un ambiente que conduce a la supervivencia de tales microbios. Un entendimiento de la siguiente descripción más detallada de la invención se facilita inicialmente por el establecimiento de los siguientes significados para los términos usados en esta revelación.

Una "condición anormal" se define ampliamente que incluye enfermedades mamíferas, desordenes mamíferos y cualquier estado anormal que la salud mamífera que está caracterizado por una superficie epitelial en riesgo de desarrollar un desorden mediado por microbios. Las condiciones anormales caracterizadas por una superficie epitelial en riesgo de desarrollar un desorden mediado por microbios, incluyen condiciones en las cuales la superficie epitelial ha desarrollado un desorden mediado por microbios. Condiciones ejemplares incluyen enfermedades humanas y desordenes humanos que requieren o producen la intervención médica, tales como daño de quemadura, enterocolitis neonatal, neutropenia severa, enfermedad de intestino inflamatorio, enteropatía (e.g., del críticamente enfermo) y rechazo de transplante (e.g., órgano).

"Daño de quemadura" significa daño a tejido mamífero resultante de la exposición del tejido al calor, por ejemplo en forma de una llama abierta, vapor, fluido caliente y una superficie caliente.

A la Neutropenia "severa" se le da su significado ordinario y acostumbrado de una disminución marcada del número de neutrófilos.

"Rechazo de trasplante" se refiere a cualquier desarrollo de material transplantado (e.g., un órgano) reconocido por estar asociado con el rechazo final de ese material por el organismo huésped.

A "administrar" se le da su significado ordinario y acostumbrado de entrega por cualquier medio adecuado reconocido por la técnica. Formas ejemplares de administración incluyen entrega oral, entrega anal, punción directa o inyección, aplicación tópica, y aplicación de atomizado (e.g., atomizado de nebulización), gel o fluido a un ojo, oído, nariz, boca, ano o abertura uretral.

Una "dosis efectiva" es aquella cantidad de una sustancia que provee un efecto benéfico en el organismo que recibe la dosis, y puede variar dependiendo del propósito de la administración de la dosis, el tamaño y la condición del organismo que recibe la dosis y otras variables reconocidas en la técnica, como relevantes para una determinación de una dosis efectiva. El proceso para determinar una dosis efectiva involucra procedimientos de optimización de rutina que están dentro de la habilidad de la técnica.

A un "animal" se le da su significado convencional de un ser viviente no planta, no protisto. Un animal preferido es un mamífero como un humano.

En el contexto de la presente revelación, una "necesidad" es un organismal, órgano, tejido o estado celular que podría beneficiarse de la administración de una dosis efectiva a un organismo caracterizado por ese estado. Por ejemplo, un humano en riesgo de desarrollar sepsis derivada del intestino, o que presenta un síntoma de este, es un organismo en

necesidad de una dosis efectiva de un producto, tal como una composición farmacéutica, según la presente invención.

Al "Peso molecular promedio" se le da su significado ordinario y acostumbrado de la media aritmética de los pesos moleculares de los componentes (e.g., moléculas) de una composición, sin importar la precisión de la determinación de esa media. Por ejemplo, polietilén glicol, o PEG, que tiene un peso molecular promedio de 3.5 kilodaltons, puede contener moléculas de PEG de peso molecular variable, siempre y cuando se determine que la media aritmética de esos pesos moleculares es de 3.5 kilodaltons en algún nivel de precisión, que puede reflejar un estimado de la media aritmética, como se entendería en la técnica. Análogamente, PEG 15-20 significa PEG cuyos pesos moleculares producen una media aritmética entre 15 y 20 kilodaltons, con esa media aritmética sometida a las salvedades anotadas anteriormente. Estas moléculas de PEG incluyen, pero no se limitan a polímeros de PEG simples. Por ejemplo, una pluralidad de moléculas de PEG relativamente pequeñas (e.g., 7,000 a 10,000 daltons) se pueden unir, opcionalmente con una molécula enlazante como un fenol, en una molécula sola que tiene un peso molecular más alto (e.g., 15,000 a 20000 daltons).

"Integridad de membrana celular" significa la ausencia relativa de modificaciones funcionalmente significativas de una membrana celular, tal como un componente funcional de una célula viviente, como se entendería en la técnica.

A "Detectablemente alterado" se le da su significado ordinario y acostumbrado de un cambio que es perceptible usando medios de detección adecuados bajo las circunstancias, como se entendería en la técnica.

"Patrón de crecimiento" se refiere colectivamente a los valores de aquellas propiedades de una célula, o un grupo de células (e.g., una población de células), que son reconocidos en la técnica como crecimiento celular característico, tal como la generación o doblamiento de tiempo de la célula, la apariencia de la topografía de un grupo naciente de células, y otras variables reconocidas en la técnica como que contribuyen a un entendimiento del patrón de crecimiento de una célula o grupo de células.

A "inhibir" se le da su significado ordinario y acostumbrado de inhibir, reducir o prevenir. Por ejemplo, inhibir cambio morfológico significa que el cambio morfológico se hace más difícil o se previene totalmente.

"expresión de PA-I, o PA-I lectina/adhesina significa la producción o generación de una actividad característica de PA-I lectina/adhesina. Típicamente, la expresión de PA-I lectina/adhesina involucra la translación de un mRNA que codifica PA-I lectina/adhesina, para producir un polipéptido de PA-I lectina/adhesina que tiene al menos una actividad característica de PA-I lectina/adhesina. Opcionalmente, la PA-I lectina/adhesina incluye además la transcripción de un ADN que codifica PA-I lectina/adhesina para producir el mRNA mencionado anteriormente.

"Activación inducida por epitelio" se refiere a un aumento en la actividad de un objetivo dado (e.g., PA-I lectina/adhesina) a través de la influencia directa o indirecta de una célula epitelial. En el contexto de la presente invención, por ejemplo, activación inducida por epitelio de PA-I lectina/adhesina se refiere a un aumento en esa actividad del polipéptido atribuible a la influencia directa de un epitelio manifestado a través del contacto directo de una célula o células epiteliales con un patógeno intestinal.

A "cambio morfológico" se le da su significado ordinario y acostumbrado de una alteración en la forma.

"Patógeno intestinal" significa un microbio patogénico capaz de causar, totalmente o en parte, sepsis derivada del intestino, en un animal como un humano. Los patógenos humanos conocidos en la técnica están cubiertos por esta definición, incluyendo bacilos gram negativos tales como *Pseudomonads* (e.g., *Pseudomonas aeruginosa*).

"Aliviar" significa reducir el grado o severidad consistente con su significado ordinario y acostumbrado.

"Quórum patogénico" significa la agregación o asociación de un número suficiente de organismos patogénicos (e.g., *P. aeruginosa*) para

iniciar o mantener una señal sensible de quórum, como se entendería en la técnica.

A "interacción" se le da su significado ordinario y acostumbrado de interactuar, como en la interacción entre dos o más productos biológicos, tales como moléculas, células y similares.

"Resistencia Eléctrica Transeptelial", o TEER se le da el significado que esta frase ha adquirido en la técnica, que se refiere a una medida de la resistencia eléctrica a lo largo del tejido epitelial, que es útil no exclusivamente en la evaluación del estado de las uniones estrechas entre las células epiteliales en un tejido epitelial.

A "Adherencia" se le da su significado ordinario y acostumbrado de asociarse físicamente por más de un período de tiempo transitorio.

"Topográficamente asimétrico" se refiere a una imagen, mapa u otra representación de la superficie de un objeto tri-dimensional (e.g., una célula) que no es simétrica.

"Microscopia de fuerza atómica", también conocida como microscopia de fuerza de barrido, es una técnica para adquirir un mapa topográfico de alta resolución, de una sustancia teniendo una sonda transversal voladiza de la superficie de una muestra en un barrido de trama y usar un medio altamente sensible para detectar las deflexiones de la sonda, como se entendería en la técnica.

"Composición farmacéutica" significa una formulación de compuestos adecuada para la administración terapéutica, a un animal viviente, como un paciente humano. Composiciones farmacéuticas preferidas según la invención comprenden una solución balanceada en viscosidad, perfil de electrolito y osmolaridad, que comprende un electrolito, L-glutamina recubierta de dextrán, inulina recubierta de dextrán, lactulasa, D-galactosa, N-acetil-D-galactosamina y PEG 5-20% (15,000 – 20,000).

A "Adyuvantes", "vehículos" o "diluyentes" se les dan los significados que han adquirido en la técnica. Un adyuvante en una o más sustancias que

sirven para prolongar la inmunogenecidad de un inmunógeno co-administrado. Un vehículo es una o más sustancias que facilitan la manipulación, tal como por una translocación de una sustancia que está siendo transportada. Un diluyente es una o más sustancias que reducen la concentración o diluyen una sustancia dada expuesta al diluyente.

"PEG de PMA" se refiere a un PEG de peso molecular relativamente alto definido como que tiene un peso molecular promedio de más de 3.5 kilodaltons. Preferiblemente, el PEG de PMA tiene un peso molecular promedio de más de 5 kilodaltons, y en realizaciones particulares, el PEG de PMA tiene un peso molecular promedio de al menos 8 kilodaltons, al menos 15 kilodaltons, y entre 15 y 20 kilodaltons.

Los siguientes ejemplos ilustran las realizaciones de la invención. El ejemplo 1 describe la protección contra la sepsis derivada del intestino proporcionada a ratones hepatectomizados, por un PG de peso molecular alto. El ejemplo 2 revela como el PEG de PMA previene la adherencia de patógeno a las células epiteliales intestinales. El ejemplo 3 revela cómo el PEG de PMA inhibe la expresión de virulencia patogénica generalmente, y la expresión de PA-I lectina/adhesina, específicamente. El ejemplo 4 muestra que el PEG no afecta el crecimiento, o integridad de membrana celular, de los patógenos. El ejemplo 5 ilustra la conformación topográfica única de los patógenos recubiertos con PEG de PMA usando microscopía de fuerza atómica. El ejemplo 6 describe las interacciones célula-célula afectadas por el PEG de PMA. El ejemplo 7 describe los métodos preventivos que usan las composiciones de la invención. El ejemplo 8 revela los métodos para monitorear la administración de PEG de PMA, como en los métodos de tratamiento de la invención, y los kits correspondientes.

EJEMPLO 1

El PEG de PMA protege contra la sepsis derivada del intestino siguiendo la hepatectomía al 30%.

Ratones macho Balb/c fueron anestesiados y sometidos a hepatectomía usando un protocolo convencional. Se realizó una excisión sin sangrado al 30% del hígado a lo largo del lóbulo izquierdo extraíble blando.

Los ratones de control fueron sometidos a manipulación del hígado sin hepatectomía. Los grupos experimentales y de control tenían cada uno siete ratones. En todos los ratones se inyectó un volumen de 200 μ l de 10^7 cfu/ml de *Pseudomonas aeruginosa* PA27853 en la base del ciego mediante punción de aguja directa diluida ya sea con solución salina, PEG 3.350 o PEG 15-20 (PEGs). Los PEG de peso molecular relativamente bajo están disponibles comercialmente; el PEG 15-20, que tiene un peso molecular promedio de 15,000 a 20,000 daltons es una combinación de PEG 7-8 y PEG 8-10 covalentemente unidos a un anillo fenol. El PEG 7-8 tiene un peso molecular promedio de 7,000 a 8,000 daltons y el PEG 8-10 tiene un peso molecular promedio de 8,000 a 10,000 daltons. El experto notará que los PEGs de PMA incluyen compuestos que tienen cualquier variedad de subunidades de PEG, teniendo cada subunidad cualquiera de una variedad de pesos moleculares unidos, preferiblemente covalentemente, entre sí o a una o más moléculas enlazantes, que son moléculas relativamente pequeñas que tienen grupos funcionales adecuados para unir las moléculas de PEG. Los enlazantes adecuados conservan sustancialmente la actividad biológica del PEG de PMA (conservación de suficiente actividad biológica para notar un efecto profiláctico o terapéutico benéfico como se revela aquí).

Con el fin de proveer una fuente constante de PEG para la duración de 48 horas del experimento, la aguja fue dirigida al intestino delgado (ileo) y se inyectó 1 ml de solución salina, PEG 3.35 o PEG 15-20 retrógrada en el intestino próximo. El sitio de punción fue amarrado con una sutura de seda y el ciego fue limpiado con alcohol. Los ratones fueron devueltos a sus jaulas y se les dio H₂O solamente por las siguientes 48 horas.

Las curvas de dosis respuesta para PEG 15-20 se ven en el panel b de la Fig. 1. a. Un efecto protector estadísticamente significativo de PEG 15-20 se determinó mediante la Prueba Exacta de Fisher ($P < 0.001$). b. Se determinó que la concentración protectora mínima de PEG 15-20 era 5% ($P < 0.05$). c. Los cultivos bacterianos cuantitativos de contenidos cecales (heces), mucosa cecal lavada, hígado y sangre, 24 horas siguiendo la hepatectomía quirúrgica al 30% e inyección cecal directa de 1×10^7 cfu/ml de PA27853. Una ANOVA de una vía demostró un aumento estadísticamente significativo del conteo bacteriano en los contenidos

cecales, mucosa, hígado y sangre en ratones siguiendo la hepatectomía ($P<0.001$). Se observó una disminución significativa ($P<0.05$) en los conteos bacterianos del hígado y sangre para PEG 3350, mientras que el PEG 15-20 previno completamente la diseminación de PA27853 al hígado y sangre de los ratones.

La cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (PA27853) es un aislado clínico no mucóide de un cultivo de célula. La inyección cecal directa de cepa PA27853 en ratones previamente sometidos a hepatectomía quirúrgica sin sangrado al 30% produjo un estado de sepsis clínica y no hubo sobrevivientes a las 48 horas. Los ratones sometidos a laparotomía simulada sin hepatectomía (controles), que son igualmente inyectados con *P. aeruginosa*, sobreviven completamente sin ninguna señal clínica de sepsis (Fig. 1a). Para determinar la habilidad de las soluciones de PEG para evitar o disminuir la mortalidad en este modelo, 200 μ l de PA27853 a una concentración de 1×10^7 cfu/ml, se suspendieron en una de dos soluciones al 10% (p/p) de polietilén glicol (PEG-3.35 versus PEG-15-20). El PEG-3.35 se escogió porque representa los PEGs de peso molecular que han estado disponibles para uso clínico por los últimos 25 años (Golytely®). En comparación, las soluciones de PEG según la invención, que se usaron tenían pesos moleculares que varían entre 15-20 kDa. Las cepas suspendidas fueron introducidas en el ciego mediante punción directa. El PEG 3.35 no tuvo ningún efecto en la mortalidad de los ratones siguiendo la hepatectomía, mientras que el PEG 15-20 fue completamente protector. De hecho, el PEG 15-20 tenía un efecto protector estadísticamente significativo como lo determinó la Prueba Exacta de Fisher ($P<0.001$). Los experimentos dosis-respuesta demostraron que una solución al 5% es la concentración mínima de PEG 15-20 que fue completamente protectora ($P<0.05$; Ver Fig. 1b), aunque el experto en la técnica reconocerá que se esperaría que las soluciones de PEG de PMA de menos de 5% proveen alguna protección, y de este modo, caen dentro del alcance de la presente invención. Con respecto a los conteos bacterianos en los ratones de control y experimentales, un análisis de varianza de una vía (ANOVA) demostró un aumento estadísticamente significativo en los conteos bacterianos en los contenidos cecales, mucosa, hígado y sangre en los ratones, siguiendo la hepatectomía ($P<0.001$). Se observó una disminución significativa ($P<0.05$)

en los conteos bacterianos del hígado y sangre para PEG 3350, mientras que el PEG 15-20 previno completamente la diseminación de PA27853 al hígado y sangre de los ratones. El PEG 15-20 inhibió completamente la diseminación de la PA27853 intestinal al hígado y corriente sanguínea (Fig. 1c). Los datos indican que la acción de las soluciones de PEG involucran mecanismos que son no-microbicidas. Dadas a concentraciones de PEG no tóxicas a las células de mamíferos (i.e., aproximadamente 10%), no se puede demostrar ningún efecto en los patrones de crecimiento bacteriano.

El ejemplo demuestra que el PEG de PMA reduce la tasa de mortalidad atribuible a la sepsis derivada del intestino en ratones sometidos a intervención quirúrgica en forma de una hepatectomía parcial. Este modelo de ratón indica que la terapia de PEG de PMA es útil para reducir la tasa de mortalidad de una especie animal (i.e., reduce la probabilidad de mortalidad en cualquier organismo dado), tal como un mamífero como el hombre, sometido a esfuerzo fisiológico como una cirugía invasiva (e.g., hepatectomía parcial). Se espera que la terapia de PEG de PMA sea efectiva en los métodos para prevenir la muerte o enfermedades serias asociadas con la sepsis cuando son implementadas, seguido del esfuerzo fisiológico (e.g., durante el cuidado post-operatorio). Además, la terapia de PEG de PMA se puede usar antes del esfuerzo fisiológico (cuidado pre-operatorio), bajo circunstancias en donde la introducción del esfuerzo es predecible, para disminuir el riesgo de enfermedad seria o muerte. La terapia de PEG de alto peso molecular también es útil para aliviar un síntoma acosado con una enfermedad o condición anormal asociada con la sepsis derivada del intestino.

EJEMPLO 2

El PEG de PMA previene la adherencia patógena a los epitelios Intestinales

Las uniones estrechas son elementos dinámicos del citoesqueleto celular epitelial que juegan un papel en la función barrera del tracto intestinal mamífero. La *P. aeruginosa* produce una alteración profunda en la permeabilidad de unión estrecha según se mide mediante la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) tanto de células caco-2 como células T-84.

Las células caco-2 son células epiteliales del colon humano bien caracterizadas que mantienen un TEER estable en cultivo, y esta línea de células provee un modelo *in vitro* reconocido del comportamiento *in vivo* de los patógenos intestinales. Para determinar el efecto protector del PEG sobre las disminuciones de TEER de *P. aeruginosa* inducida por PA27853 de monocapas caco-2 cultivadas, se inocularon apicalmente 1×10^7 cfu/ml de PA27853 en dos monocapas de células caco-2 en presencia de PEG 3.35 al 10% o PEG 15-20 al 10%. La TEER se midió serialmente por 8 horas y se registró la máxima caída de TEER.

Solamente el PEG 15-20 protegió significativamente contra la disminución en TEER inducida por *P. aeruginosa* (Fig. 2a). Los datos presentados en la Fig. 2 representan la media $\pm$ SEM % de la máxima caída de TEER desde la línea de base de cultivos triplicados ($n=7$) observados durante 8 horas de exposición apical a 1×10^7 cfu/ml de PA27853. Una disminución estadísticamente significativa en el TEER, como se demostró en las células caco-2 expuestas a PA27853, fue revelada mediante ANOVA de una vía ($P<0.001$). Se demostró un efecto protector estadísticamente significativo sobre la caída de TEER inducida por PA27853 para PEG 15-20 ($P<0.001$). La Figura 2b muestra células caco-2 en presencia de PEG 3.35 y exposición apical a PA27853. Después de 4 horas de co-cultivo en presencia de PEG 3.35, se observó el trastorno de las monocapas de células caco-2 que muestran bacterias adherentes focalmente, con células flotando de 30-40 micrones por encima de las estructuras de la monocapa (Fig. 2b). En contraste, La Fig. 2C que muestra imágenes de células caco-2 expuestas apicalmente por 4 horas a PA27853 en presencia de PEG 15-20 no mostraron evidencia de células flotantes en ninguno de los planos examinados. El efecto protector del PEG 15-20 sobre la integridad de las células caco-2 se asoció con menor adherencia bacteriana, reflejada por una recuperación mayor a 15 veces de bacterias en los sobrenadantes de células seguido de una exposición por 4-horas a 1×10^6 cfu/ml de PA27853.

La resistencia de las células epiteliales intestinales humanas cultivadas en PEG a los efectos del trastorno de barrera de la *P. aeruginosa*, según lo juzgado por el mantenimiento de la TEER, ofrece un criterio práctico para estabilizar la función de barrera de unión estrecha al encarar el reto de patógenos invasores. Mayor evidencia del valor terapéutico del PEG 15-20

es que la función de transporte epitelial (intercambio Na^+/H^+ , transporte de glucosa) no está afectado por este compuesto.

Así, el PEG de PMA es relativamente inerte y tiene un efecto estabilizador en la barrera epitelial intestinal. La invención abarca métodos de tratamiento de anomalías de la barrera intestinal asociadas con patógenos intestinales tales como *P. aeruginosa*, mediante la administración de PEG de PMA a un animal tal como un mamífero, y preferiblemente un humano. Una anomalía de la barrera intestinal se puede revelar mediante cualquier técnica de diagnóstico, u otros medios conocidos en la técnica. Sin embargo, no es necesario identificar una anomalía de la barrera intestinal antes del tratamiento con PEG de PMA. El bajo costo y alto grado de seguridad asociado con el tratamiento de PEG de PMA hacen este enfoque adecuado tanto para aplicaciones profilácticas, preferiblemente dirigidas hacia organismos en riesgo, como para métodos de tratamiento aplicados a animales que muestran al menos un síntoma característico de una anomalía de barrera intestinal. Los métodos de tratamiento de PEG de PMA aliviarían un síntoma asociado con una anomalía de barrera intestinal; preferiblemente, los métodos reducirían o eliminarían los efectos de la sepsis derivada del intestino de un organismo tratado.

EJEMPLO 3

El PEG de PMA Inhibe la expresión de virulencia en patógenos

La expresión de la PA-I lectina/adhesina en la PA27853 de *P. aeruginosa* se aumentó en el ciego de ratones seguido de la hepatectomía, y jugó un papel clave en el efecto letal de la *P. aeruginosa* en el intestino del ratón. La PA-I funciona como una virulencia significativa determinante en el intestino del ratón facilitando la adherencia de PA27853 al epitelio, así como creando un defecto de barrera significativo a las citotoxinas, exotoxina A y elastasa. La expresión de PA-I en la *P. aeruginosa* es regulada mediante el regulador transcripcional RhIR y su activador compañero C4-HSL. La expresión de PA-I en PA27853 no solo aumentó por la exposición a C4-HSL, sino que también por el contacto con células caco-2, preparaciones de membrana de células caco-2 y sobrenadantes de cultivos de célula caco-2.

Se usó la hibridización al norte para analizar la expresión de PA-I en el nivel transcripcional. El RNA total de *P. aeruginosa* se aisló mediante el método de tres detergentes modificado. Las sondas fueron generadas mediante PCR usando plantillas de PA-I:

F(ACCCTGGACATTATTGGGTG) (SEC ID NO: 1),
R(CGATGTCATTACCATCG-TCG) (SEC ID NO: 2) y plantillas 16S:
F(GGACGGGTGAGTAATGCCTA) (SEC ID NO: 3),
R(CGTAAGGGCCATGATGACTT) (SEC ID NO: 4), y se clonaron en el vector pCR2.1 (Invitrogen, Inc.). Los insertos fueron secuencias que se acoplaron a la secuencia de PA-I o 16S. Las sondas de cADN específicas para PA-I y 16S fueron radiomarcadas con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP. La radioactividad específica fue medida mediante un phosphorimager Storm 860 (Molecular Dynamics, CA), y los cambios de porcentaje relativos comparados con el control fueron calculados con base en la relación de intensidad de PA-I y 16S. Se usó manchado Western para el análisis de la proteína PA-I, usando anticuerpos anti-PA-I policlonales purificados por afinidad de conejo. Un ml de células de *P. aeruginosa* se lavó con PBS y se calentó a 100°C en amortiguador de lisis (SDS al 4%, Tris-HCl 50 mM, pH 6.8); se realizó el análisis de inmunotransferencia mediante electrotransferencia de proteínas después de Tricita SDS-PAGE. La PA-I lectina fue detectada mediante el reactivo de ECL (Amersham, NJ).

La exposición de PA27853 de *P. aeruginosa* a la molécula C4-HSL de señal de quorum sensing 1 mM, produjo un aumento estadísticamente significativo ($P < 0.001$ ANOVA de una vía) en la expresión de la proteína de PA-I que fue parcialmente inhibida en presencia de PEG 3.35 al 10%, y se inhibió en una extensión mucho mayor con PEG 15-20 al 10% (Fig. 3). La concentración inhibidora mínima de PEG 15-20 sobre la expresión de PA-I inducida por C4-HSL fue del 5% ($P < 0.01$, ANOVA de una vía). El examen microscópico de electrón de células bacterianas individuales expuestas a C4-HSL en presencia y ausencia de PEGs, demostró que la C4-HSL causó un cambio morfológico en la forma y expresión Pili de *P. aeruginosa* (Fig. 3b). El efecto morfológico inducido por C4-HSL se eliminó completamente en presencia de PEG 15-20, pero no se eliminó completamente en presencia de PEG 3.35. Se vio un efecto del tipo halo alrededor de PA27853 expuesta al PEG 15-20 (Fig. 3b). La exposición de PA27853 a C4-HSL 0.1 mM

produjo un aumento estadísticamente significativo ($P < 0.001$ ANOVA de una vía) en la expresión de *PA-I* mRNA usando manchado Northern. La expresión de *PA-I* mRNA se inhibió en gran medida con PEG 15-20 al 10%. La Fig. 3d. muestra que el aumento en *PA-I* mRNA inducido por una exposición de 4 horas a células caco-2 se inhibió en presencia de PEG 15-20, pero no en PEG 3.35 ($P < 0.001$ ANOVA de una vía).

Los datos presentados aquí muestran que se observó una atenuación significativa (disminución de 3-4 veces) de la expresión de PA-I (proteína y mRNA) en PA27853, inducida por C4-HSL 100 μ M - 1mM, cuando las bacterias fueron pre-tratadas con PEG 15-20 al 10%. Este efecto no se observó con PEG 3.35 (Fig. 3a). También se observó la atenuación de la expresión de PA-I inducida por C4-HSL para PEG 3.35 al 10%, aunque el grado de atenuación fue significativamente menos que para PEG 15-20 al 10%. La concentración mínima de PEG 15-20 que inhibió la expresión de proteína PA-I inducida por C4-HSL fue del 5% (Fig. 3B). La microscopía de electrón de células bacterianas individuales expuestas a C4-HSL demostró que C4-HSL causó un cambio morfológico en la forma y expresión pili de PA27853 (Fig. 3b). El efecto morfológico inducido por C4-HSL se eliminó completamente en presencia de PEG 15-20, pero no en PEG 3.35 (Fig. 3b). La expresión de PA-I (mRNA), inducida por exposición de 4 horas a células caco-2, se inhibió en presencia de PEG 15-20 pero no en PEG 3.35 (Fig. 3B). El efecto protector de la expresión de PA-I inducido por células caco-2 con PEG 15-20 persistió en los experimentos de exposición durante la noche.

El PEG de PMA también afecta la expresión de virulencia de *P. aeruginosa* en respuesta a un estímulo conocido. La atenuación de la expresión de PA-I inducido por C4-HSL en PA27853 puede ser un efecto protector mayor de PEG 15-20, dado que la señalización de quorum sensing es un mecanismo bien establecido de expresión de virulencia para este patógeno. Se espera que la interferencia inducida por PEG 15-20 con la expresión de PA-I inducido por célula caco-2 sea un aspecto importante del efecto protector del PEG 15-20. Se encontró que el PEG 15-20 tiene un efecto protector en animales huésped a través de la atenuación de la expresión de PA-I de *P. aeruginosa* (PA27853) en respuesta a los

contenidos cecales filtrados (heces) de ratones seguido de hepatectomía al 30%. Se espera que la habilidad del PEG 15-20 para blindar la *P. aeruginosa* de factores huésped que aumentan su expresión virulencia sea aún otro mecanismo mediante el cual los organismos son protegidos de la sepsis derivada del intestino.

En consecuencia, la invención incluye materiales en forma de kits y los métodos correspondientes para administrar un PEG de PMA a un animal, para prevenir o tratar una condición caracterizada por el expresión de un factor de virulencia o determinante, por un patógeno intestinal, como una de las *seudomonas*. Un determinante de virulencia puede contribuir a la virulencia directa o indirectamente. Un ejemplo de una contribución indirecta es el efecto de la PAI lectina/adhesina de *P. aeruginosa* sobre la adhesión del patógeno intestinal a los epitelios intestinales, y/o la generación de un defecto de barrera a las citotoxinas, exotoxina A y elastasa.

EJEMPLO 4

El PEG no afecta el crecimiento celular, o Integridad de membrana celular de patógenos

Se evaluó el efecto de las dos soluciones de PEG (PEG 3.35 y PEG 15-20) sobre la integridad de la membrana bacteriana mediante un método de manchado que consiste de SYTO 9 y yoduro de propidio. Ninguna solución de PEG tuvo ningún efecto sobre la permeabilidad de la membrana bacteriana (Fig. 4a). La integridad de membrana se determinó usando un kit de viabilidad bacteriana vivo/muerto L-3152 (Molecular Probes). Las bacterias fueron cuantificadas y los conteos expresados como cfu/ml, mediante colocación en placas de diluciones de 10 veces de muestras tomadas a diferentes tiempos de incubación. Las curvas de crecimiento de *P. aeruginosa* crecida durante la noche en medio de TSB que contiene cualquiera de las dos soluciones de PEG no mostró ningún efecto inhibitor por ninguna solución de PEG sobre la cantidad bacteriana (Fig. 4b). De hecho, el patrón de crecimiento en cada uno de los medios que contienen PEG fue indistinguible del patrón de crecimiento en el medio de TBS libre de PEG. Se midió la actividad de una enzima doméstica involucrada en el metabolismo de energía, la deshidrogenada lactato (LDH) a diferentes

SS

puntos de tiempo durante las fases de crecimiento exponencial y estacionaria. Se midió la actividad de LDH en un ensayo de diaforasa enzimática acoplada usando una mezcla de sustrato de CytoTox 96 (Promega). Se determinó la concentración de proteína usando el Ensayo de Proteína BCA (Pierce). No se observó ningún cambio en la actividad de LDH en los sobrenadantes libres de célula de *P. aeruginosa* cultivados en presencia de los PEGs. Los resultados de este experimento indican que el PEG de PMA tiene un efecto insignificante en los patrones de crecimiento bacteriano.

Los métodos de la invención y los productos correspondientes (e.g. kits) proveen el beneficio de prevenir o tratar enfermedades o condiciones anormales asociadas con sepsis derivada del intestino sin influenciar significativamente la composición de la flora intestinal. Igualmente, los métodos y productos de la invención se pueden usar para aliviar un síntoma asociado con tales enfermedades o condiciones anormales sin cambio significativo de la composición microbiana del intestino. El experto en la técnica reconoce que los métodos (y kits) que no perturban significativamente la composición de la flora intestinal son deseables en cuanto a que no se esperaría que tales métodos condujeran a complicaciones de salud secundarias que surjan de tal perturbación.

EJEMPLO 5

Microscopía de Fuerza atómica del patógeno recubierto con PEG

Alícuotas de uno por ciento de un cultivo de PA27853 cultivado durante la noche fueron sub-cultivadas en caldo de soya triptico (TSB), con o sin PEG de PMA al 10%, por 4 horas a 37°C. Se retiró una gota de cada subcultivo y las células PA27853 de *P. aeruginosa* fueron lavadas extensivamente con PBS, secadas sobre la parte superior de mica en aire soplado por 10 minutos, y se representó inmediatamente. Se realizó la imagen de las bacterias secas con AFM del modo de golpeteo ligero, en aire con un Microscopio de Sonda de Rastreo Nanoscopio Multimodo IIIA (MMAFM, Digital Instruments). Las células caco-2 sub-confluentes fueron tratadas con PEG de PMA al 10% por 4 horas, y se lavaron extensivamente con PBS. La imagen de AFM de las células se realizó en PBS sin usar un

56

anillo O. Para la electroscopía de electrón, se inoculó PA27853 en TBS con y sin C4-HSL 1 mM, y PEG de PMA al 10%, y se inoculó durante la noche. Una gota de *P. aeruginosa* al 1% fue manchada con acetato de uranilo y se lavó con NaCl 0.5 M antes del examen bajo la microscopía de electrón.

La microscopía de fuerza de electrón de células caco-2 mostró una superficie no uniforme clásica con microvellocidades de tipo borde de cepillo, mientras que las células expuestas a PEG 3.35 demostraron una apariencia plana lisa sobre la superficie de las células epiteliales (Figs. 5a,c). El PEG 15-20 parece tapar las células caco-2 por el llenado de asimetrías a lo largo del plano definido topográficamente (Fig. 5e), produciendo una cubierta compleja definida topográficamente. En una técnica de alguna forma similar, las células de PA27853 expuestas al PEG 3.35 demostraron un patrón de recubrimiento liso del polímero a las células bacterianas y cubrieron las bacterias circunferencialmente en una forma más asimétrica topográficamente. El análisis transversal de la medida de fuerza atómica del diámetro bacteriano en PEG 15-20 mostró un aumento significativo de la envoltura bacterias/PEG en la solución de PEG (Fig 5e, f). En otras palabras, el PEG 3.35 forma una envoltura lisa alrededor de las células bacterianas individuales (Fig. 5e), mientras que el PEG 15-20 cubre estrechamente las células individuales (Fig. 5f) y aumenta el diámetro de polímero/bacteriano (Figs. 5g, 5h), distanciando así las bacterias individuales entre sí.

Sin intentar estar ligado por la teoría, el PEG de PMA ejerce sus efectos benéficos mediante el simple distanciamiento físico de la *P. aeruginosa* del epitelio intestinal. Alternativamente, el PEG de PMA puede proveer beneficios mediante la prevención de la formación de una señal de activación del quorum sensing patológico que surge de la interacción célula-célula de las células patológicas. De nuevo, sin pretender estar ligado a la teoría, es posible que el recubrimiento de superficies biológicas con PEG de PMA produzca una pérdida de la libertad conformacional de las cadenas de PEG de recubrimiento, y la repulsión de las proteínas de proximidad. Las interacciones polar-polar entre el PEG de PMA y las células caco-2 podrían afectar la elasticidad de las cadenas de PEG, restringiendo ciertas cadenas laterales de PEG de PMA a un constructo molecular que repele la proteína. Los datos presentados aquí soportan la conclusión que las células caco-2

recubiertas con PEG de PMA son más repelentes a *P. aeruginosa* que las células caco-2 no recubiertas, debiéndose tal vez a una pérdida de la "entropía conformacional" como resultado de alguna interacción dinámica del PEG de PMA con células caco-2.

El resultado de este experimento establece que el tratamiento de PEG de PMA tiene un efecto en las células tratadas, que afectan notablemente la topología de superficie de tales células. Más aún, el efecto de la exposición de PEG de PMA en tales células es diferente del efecto que el PEG 3.35 tiene en tales células. Sin pretender estar ligado al a teoría, los resultados revelados aquí si proveen una correlación física para el efecto marcadamente diferente sobre las células mostradas con PEG de PMA con relación a PEGs de peso molecular bajo, tal como PEG 3.35.

EJEMPLO 6

El PEG de PMA afecta las Interacciones célula-célula

Para observar directamente el efecto de las soluciones de PEG en la orientación espacial de *P. aeruginosa*, se realizaron experimentos con cepas vivas de *P. aeruginosa* PA27853/EGFP que porta el gen *egfp* que codifica la proteína fluorescente verde. Los experimentos se realizaron en presencia y ausencia de células caco-2. Con el fin de representar el efecto de los PEGs tanto en las bacterias y su interacción con los epitelios cultivados, se usó la microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC) y representación de GFP.

El gen *EGFP* que codifica la proteína fluorescente verde se amplificó usando el plásmido pBI-EGFP (Clontech) como un template. Los sitios de restricción *Xba*I y *Pst*I fueron introducidos usando plantillas TCTAGAACTAGTGGCTCCCCGCGGATG (SEC ID NO: 5) y GCAGACTAGGTCGACAAGCTTGATATC (SEC ID NO: 6). El producto de PCR fue clonado directamente en el vector pCR 2.1 usando un kit de clonación de TA (Invitrogen), seguido de la transformación del constructo pCR2.1/EGFP en DH5a de *E. coli*. El gen *EGFP* fue extirpado de su constructo mediante la digestión con *Xba*I y *Pst*I, y el fragmento que contenía el gen extirpado fue clonado en el vector en enlace de *E.coli-P.aeruginosa*

pUCP24, que había sido digerido con las mismas enzimas de restricción. El constructo resultante (i.e., pUCP24/EGFP), que contenía el gen *EGFP* en el vector de enlace, fue electroporado a 25 μ F y 2500 V en las células de PA27853 electro-competentes. Las células que contienen PA27853/EGFP fueron seleccionadas sobre placas de LB-agar que contienen 100 μ g/ml de gentamicina (Gm).

Las células que portan PA27853/EGFP fueron cultivadas durante la noche en LB que contiene 100 μ g/ml de Gm, y 1% del cultivo se usó para inocular LB fresco que contiene 50 μ g/ml de Gm. Después de 3 horas de cultivo, se agregó isopropil- β -D-tiogalactopiranosida (IPTG) hasta una concentración final de 0.5 mM, y los cultivos fueron incubados por 2 horas adicionales. 100 μ l del cultivo bacterial se mezclaron con 1 ml del medio HDMEM (Gibco BRL) amortiguado con HEPES, y que contiene suero fetal bovino al 10% (HDMEM HF) y PEG de PMA al 10%. Células caco-2 de cuatro días de edad (p10-p30) cultivadas en discos de dTC3 de 15 mm de espesor (Biotech) en HDMEM HF fueron lavadas una vez en HDMEM HF con o sin PEG de PMA. Un ml de suspensión bacterial preparada como antes, se agregó a un plato dTC3 que contiene células caco-2. El patrón de dispersión de células bacterianas en los platos dTC3 se observó directamente con un microscopio de fluorescencia invertida Axiovert 100 TV usando filtros de fluorescencia DIC y GFP, en una magnificación de objetivo de 63 X. La temperatura se ajustó con un sistema de control de temperatura de termostato Biopetechs. Se usaron lámparas de tungsteno (100 V) tanto para la excitación DIC como GFP. Se usó el software de imágenes de 3D (slidebook) de Intelligent Imaging Innovations para representar el patrón de dispersión de las células bacterianas en el plano Z usando el filtro GFP. Se vieron células de *P. aeruginosa* planctónicas en el medio sin células caco-2 en la imagen DIC (6a₁) y reconstrucción del plano Z (6a₂). En presencia de células caco-2, las células bacterianas desarrollaron una apariencia agregada (Fig. 6b₁) y se vieron adherentes a las células caco-2 (Fig. 6b₂). Una solución de PEG 3350 al 10% disminuyó la motilidad bacteriana e indujo la formación inmediata de microcolonias bacterianas en forma de hongos (Fig. 6c₁) que se adhieren al fondo del agujero (Fig. 6c₂). En presencia de células caco-2, las microcolonias bacterianas fueron aproximadamente 8 micrones por encima del plano de las células epiteliales (Fig. 6d_{1,2}). Una

solución de PEG 15-20 al 10% disminuyó en gran medida la motilidad de las células *P. aeruginosa*. Sin embargo, para las primeras 0.5-1 horas de incubación en medio que contenía PEG 15-20, las células bacterianas formaron microcolonias en forma de patas de araña que estaban cerca del fondo del agujero (Fig. 6e_{1,2}). En varias horas, las microcolonias en forma de patas de araña ocuparon el espacio/volumen total del medio. En presencia de las células caco-2, las células de *P. aeruginosa* perdieron la configuración tipo patas de araña y se vieron elevadas por encima del plano del epitelio (30-40 micrones) (Fig. 6f_{1,2}).

Para determinar la orientación espacial de las interacciones de células bacterianas-epiteliales en tres dimensiones, se realizaron las reconstrucciones del plano Z. Las imágenes demostraron que las dos soluciones de PEG tenían efectos diferentes en el comportamiento de agregación de *P. aeruginosa* y afectaron diferencialmente la orientación espacial de las bacterias dependiendo de la presencia o ausencia de células caco-2. En experimentos solamente con medio, se vio que la *P. aeruginosa* muestra un patrón uniformemente disperso (Fig. 6a). Sin embargo, las células bacterianas examinadas en presencia de células caco-2 desarrollaron una apariencia agregada y se vieron adyacentes al plano de las células epiteliales en el fondo de los agujeros (Fig. 6b). Las células bacterianas examinadas en presencia de PEG 3.35 solo, formaron grandes agregados y permanecieron en el fondo del agujero de cultivo (Fig. 6c), mientras que las células bacterianas examinadas con células caco-2 en medio que contenía PEG 3.35, permanecieron suspendidas por encima del plano de las células epiteliales (aproximadamente 8 micrones), manteniendo su apariencia agregada (Fig. 6d). Las células bacterianas examinadas en presencia de PEG 15-20 solo, mostraron un patrón uniforme de microagregación (Fig. 6e), mientras que las células bacterianas examinadas en presencia de caco-2 en medio que contenía PEG 15-20 fueron suspendidas más alto por encima del plano del epitelio (~32 micrones) en la formación agregación (Fig. 6f). En experimentos cronometrados, se observó que la motilidad bacteriana disminuyó con PEG 3.35 e incluso en un grado mayor, con PEG 15-20.

En una manera análoga al experimento revelado en el Ejemplo 5, este Ejemplo provee una correlación física para el efecto observado del PEG de

PMA sobre la interacción célula-célula, consistente con su actividad profiláctica y terapéutica benéfica como se reveló aquí. Se espera que el uso de PEG de PMA reducirá o eliminará las interacciones célula-célula dañinas en el intestino (e.g., entre las células epiteliales intestinales y los patógenos intestinales como las *seudomonas*), reduciendo el riesgo de enfermedades y/o condiciones anormales asociadas con sepsis derivada del intestino.

EJEMPLO 7

Métodos para prevenir enfermedades/condiciones anormales

La invención también provee métodos para prevenir una variedad de enfermedades y/o condiciones anormales en humanos y otros animales, particularmente mamíferos. En estos métodos, una cantidad efectiva de PEG de PMA es administrada a un paciente humano o animal en necesidad de este. El PEG puede ser administrado usando un horario de administración que es determinado usando procedimientos de optimización de rutina conocidos en la técnica. Preferiblemente, el PEG tiene un peso molecular promedio de 5,000 – 20,000 daltons, y más preferiblemente entre 10,000-20,000 daltons. Se contempla que al menos se administre PEG de PMA al 5%. El PEG de PMA se puede administrar en cualquier forma adecuada, e.g., como una solución, como un gel o crema, como una solución adecuada para nebulización (e.g., para uno inhalado), en una composición farmacéutica que comprende el PEG de PMA, y en una solución estéril, isotónica adecuada para inyección en un animal, la administración se puede realizar usando cualquier ruta convencional; particularmente se contempla que el PEG de PMA sea administrado oralmente o tópicamente. En algunas realizaciones, la composición de PEG de PMA que es administrada, comprende además un compuesto seleccionado del grupo consistente de L-glutamina recubierta de dextrán, inulina recubierta de dextrán, ácido butírico recubierto de dextrán, un fructo-oligosacárido, N-acetil-D-galactosamina, manosa recubierta con dextrán, galactosa y lactulosa. En otra realización, la composición de PEG de PMA comprende además L-glutamina recubierta de dextrán, inulina recubierta de dextrán, ácido butírico recubierto de dextrán, uno o más fructo-

oligosacáridos, N-acetil-D-galactosamina, manosa recubierta con dextrán, galactosa y lactulosa.

La invención provee métodos para prevenir una variedad de enfermedades y condiciones anormales, tales como oído de nadador, otitis media aguda o crónica, neumonía asociada con ventilador, sepsis derivada del intestino, enterocolitis necrotizante, diarrea inducida por antibióticos, colitis pseudomembranosa, enfermedades de intestino inflamatorio, enfermedad de intestino irritable, enterocolitis neutropénica, pancreatitis, síndrome de fatiga crónica, síndrome de disbiosis, colitis microscópica, infección crónica del tracto urinario, enfermedad transmitida sexualmente e infección (e.g., exposición a un ambiente contaminado por un agente bioterrorista tal como *Bacillus anthracis*, Virus de la viruela, *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *Clostridium difficile*, rotavirus, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacteria cloacae*, *Candida albicans*, y *Candida glabrata*, y similares). En una realización preferida del método para prevenir la infección crónica del trato urinario, o tratar dicha infección, el PEG de PMA es entregado en forma de un irrigador de vejiga. Para la prevención de enfermedad transmitida sexualmente, una composición de la invención se usa preferiblemente para lubricar un condón. En una realización preferida de un método para prevenir la infección por un agente bioterrorista, la composición según la invención se provee en forma de un gel o crema, adecuada para aplicación tópica. Se espera que tal aplicación tópica sea útil para prevenir una variedad de enfermedades/condiciones anormales asociadas con cualquier agente bioterrorista o asociadas con una variedad de agentes químicos o fisicoquímicos que representan una amenaza al hombre o animal en términos de supervivencia, salud o confort. Tales agentes químicos o fisicoquímicos, incluyen los agentes capaces de quemar o dañar de otra forma la piel, y que se hacen inactivos o pobremente solubles en las composiciones de la invención.

En una realización de los métodos preventivos, los ratones macho Balb/c son anestesiados y una solución acuosa de PEG 15-20 al 5% es inyectada a la base del ciego mediante punción de aguja directa. Con el fin de proveer una fuente constante de PEG por la duración de 48 horas del

experimento, la aguja es dirigida al intestino delgado (ileo) y se inyectó 1 ml del PEG 15-20 retrógrado en el intestino próximo. El sitio de punción fue amarrado con una sutura de seda y el ciego fue limpiado con alcohol. Los ratones fueron devueltos a sus jaulas y se les dio H₂O solamente. Cuarenta y ocho horas después, los ratones son sometidos a un procedimiento de hepatectomía convencional que involucra una excisión sin sangrado del 30% del hígado a lo largo del lóbulo izquierdo blando. Los ratones de control experimentarán manipulación del hígado sin hepatectomía. Se espera que el tratamiento preventivo que involucra la administración de PEG de PMA reduzca o elimine la incidencia de sepsis derivada del intestino asociada con cirugía en los ratones.

Estos métodos son aplicables más allá del cuidado preventivo de mascotas tales como ratones, conejillos de indias, perros y gatos hasta animales significativos agriculturalmente tales como ganado, caballos, cabras, ovejas, cerdos, pollos, pavos, patos, gansos, y cualquier otro animal domesticado. Más aún, se espera que estos métodos preventivos sean aplicables a humanos, mejorando la salud y expectativa de vida de muchos pacientes o candidatos en riesgo de desarrollar una enfermedad y/o condición anormal, tal como oído de nadador, otitis media aguda o crónica, neumonía asociada con ventilador, sepsis derivada del intestino, enterocolitis necrotizante, diarrea inducida por antibióticos, colitis pseudomembranosa, enfermedades de intestino inflamatorio, enfermedad de intestino irritable, enterocolitis neutropénica, pancreatitis, síndrome de fatiga crónica, síndrome de disbiosis, colitis microscópica, infección crónica del tracto urinario, enfermedad transmitida sexualmente y agentes infecciosos (e.g., composiciones bioterroristas) que incluyen pero no se limitan a ántrax y viruela. Como se notó anteriormente, los métodos preventivos comprenden la administración de una composición que comprende al menos PEG de PMA al 5% (5-20 kDa) mediante cualquier ruta de administración conocida o convencional, al hombre u otro animal. Preferiblemente, los métodos preventivos se practican en aquellos individuos en riesgo de desarrollar una o más de las enfermedades y/o condiciones anormales mencionadas anteriormente, pero se contempla que las composiciones y métodos de la invención sean útiles en cualquier papel profiláctico o terapéutico para tratar o prevenir ampliamente tales enfermedades o condiciones anormales en poblaciones enteras o sub-poblaciones de hombres u otros animales.

EJEMPLO 8

Métodos para monitorear la administración de PEG de PMA

La invención también contempla métodos para monitorear la administración de PEG de PMA, e.g., en un método o tratamiento. En tales métodos de monitoreo, el PEG de PMA marcado es administrado solo o en combinación con PEG de PMA no marcado, y el marcador es detectado durante el tratamiento en un horario continuo o intermitente, que incluye determinaciones del punto final simple. El término PEG de PMA "marcado" significa que un marcador, o compuesto detectable está unido directamente o indirectamente al PEG de PMA, o el PEG de PMA está unido a un compuesto reportero que es capaz de asociarse a un marcados con PEG de PMA (por supuesto, los marcadores no unidos al PEG de PMA o diseñados para estar asociados con este también están contemplados por la invención, como se nota más adelante). El PEG de PMA es marcado usando cualquier marcador detectable conocido en la técnica, y el PEG está marcado a un nivel suficiente para detectarlo. Los expertos en la técnica reconocerán que el nivel variará dependiendo del marcador y del método de detección. El experto en la técnica será capaz de optimizar el grado de marcado usando los procedimientos de optimización de rutina. El marcador está químicamente enlazado al PEG de PMA mediante un enlace no covalente o covalente que es estable en uso, y preferiblemente, en almacenamiento. Se prefiere el marcador enlazado covalentemente al PEG de PMA. La densidad de la unión del marcador es ajustada para conservar sustancialmente la actividad biológica del PEG de PMA (conservación de suficiente actividad biológica para reconocer un efecto profiláctico o terapéutico benéfico como se revela aquí). Este se logra típicamente mediante el ajuste de la relación PEG de PMA: marcador, como se conocería en la técnica. Dado el tamaño relativo de la molécula promedio del PEG de PMA, se espera que una amplia variedad de marcadores sea adecuada para la unión al PEG de PMA con una conservación sustancial de la actividad biológica de este.

Los marcadores contemplados por la invención son los marcadores conocidos en la técnica, que incluyen un radiomarcador, un cromóforo, un fluoróforo, y un reportero (incluyendo una enzima que cataliza la producción de un compuesto detectable y un compañero de ligamiento, como un

anticuerpo, que localiza un compuesto detectable en los alrededores del reportero). Los reporteros de enzima ejemplares incluyen un componente enzimático de un sistema de luminescencia y un catalizador de una reacción colorimétrica. Más particularmente, moléculas reporteras ejemplares incluyen biotina, avidina, estreptavidina, y enzimas (e.g., peroxidasa de rábano picante, luciferasa, fosfatasa alcalina, incluyendo fosfatasa alcalina secretada (SEAP); β -galactosidasa; β -glucuronidasa; cloramfenicol acetiltransferasa). El uso de tales reporteros es bien conocido por los expertos en la técnica y está descrito en, e.g., Patente U.S. No. 3,817,837, Patente U.S. No. 3,850, 752, Patente U.S. No. 3,996,345 y Patente U.S. No. 4,277,437. Sustratos de enzimas ejemplares, que se pueden convertir a compuestos detectables mediante enzimas reporteras, incluyen 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosida o Xgal, y Bluo-gal. Los sustratos de enzimas, como compuestos capaces de convertirse a compuestos detectables, también pueden ser marcadores en ciertas realizaciones, como se entendería en la técnica. Las patentes U.S., que enseñan marcadores y sus usos, incluyen la patente U.S. No. 3,817,837; Patente U.S. No. 3,850,752; Patente U.S. No. 3,939,350 y la Patente U.S. No. 3,996,345. Ejemplos de radiomarcadores son ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S y ^{125}I ; fluoróforos ejemplares son fluoresceína (FITC), rodamina, Cy3, Cy5, aequorin, y proteína fluorescente verde. Un marcador preferido es un fluoróforo como fluoresceína.

Los métodos de monitoreo de la invención también pueden involucrar más de un marcador. En una realización, un marcador sirve para identificar la ubicación del PEG de PMA siguiendo o durante el tratamiento, mientras que un segundo marcador es específico para uno o más microbios en la medida en que el marcador está detectablemente asociado con al menos un microbio. Por ejemplo, un método de monitoreo puede incluir fluoresceína unida al PEG de PMA en una manera que conserva substancialmente la actividad biológica del PEG de PMA, y Xgal o bluo-gal libre (i.e., no unido) para la detección de la actividad de β -galactosidasa específica de procariota. La fluoresceína localiza el PEG de PMA, mientras que un producto coloreado (azul) indica la presencia de un microbio procariótico que metaboliza lactosa, tal como una pseudomona. La invención también incluye métodos para monitorear, en donde un marcador simple provee esta

información (i.e., la ubicación del PEG de PMA y una indicación de la presencia de un microbio).

Se puede usar cualquier técnica de detección conocida en la técnica, para los métodos de monitoreo de la invención. Varios factores influenciarán la técnica de detección escogida, incluyendo el tipo de marcador, el biomaterial sometido a monitoreo (e.g., células epidérmicas de la piel, canal de la oreja, o intestino; muestras de heces, mucus o tejido), el nivel de discriminación deseado, si se espera cuantificación, y similares. Las técnicas de detección adecuadas incluyen inspección visual simple a simple vista, inspección visual con un instrumento como un endoscopio, opcionalmente equipado con una fuente de luz adecuada y/o cámara para grabación, el uso convencional de contadores Geiger, película de rayos X, contadores de escintilación, y similares, y cualquier otra técnica de detección conocida en la técnica.

El experto reconocerá que los métodos de monitoreo de la invención son útiles en la optimización de los métodos de tratamiento. Por ejemplo, se puede usar un método de monitoreo para optimizar la cantidad y/o concentración del PEG de PMA (e.g., para alcanzar una viscosidad deseada para una solución o mezcla de PEG de PMA), que es entregada a una célula epitelial, tales como las células epiteliales del canal de la oreja, para prevenir o tratar el oído de nadador. A manera de ejemplos adicionales, la optimización del intestino o tratamientos intestinales se puede facilitar mediante la inspección endoscópica de un tracto intestinal expuesto a PEG de PMA marcado, o mediante el monitoreo de muestras de heces.

Los métodos de monitoreo de la invención incluyen un ensayo de heces para un microbio capaz de adherirse a una célula epitelial intestinal, que comprende contactar un microbio y una célula epitelial intestinal, y detectar la adherencia del microbio a la célula epitelial usando cualquier técnica conocida en la técnica. En una realización preferida, la célula epitelial intestinal es inmovilizada en una superficie adecuada, como el fondo y/o lados de un agujero microtitulador. En otra realización preferida, un marcador directo, o un marcador indirecto como un reportero capaz de generar un producto detectable, se agrega antes o durante el paso de detección. Los métodos de monitoreo pueden además comprender un

marcador libre. Por ejemplo, bluogal libre es adicionado a una muestra sospechosa de contener un microbio procariótico que metaboliza lactosa; si está presente, la enzima microbiana β -galactosidasa clivará el Bluogal para producir un producto azul detectable.

En una realización, las células epiteliales intestinales disponibles comercialmente (e.g., células caco-2, ATCC HTB 37, y/o células IEC-6, ATCC CRL 1952) están fijadas a los agujeros de un disco microtitulador usando una técnica convencional. Una muestra de heces es recolectada y mezclada con un fluido como solución salina amortiguada con fosfato. Se obtiene la fase líquida de la mezcla, que contiene microbios suspendidos (e.g., mediante filtración adecuada (i.e., separación de sólidos gruesos de bacterias en suspensión de fluido), decantación, o similares) y se diluye en PBS 1:100. Se agrega bluogal a la suspensión microbiana viva. La suspensión microbiana es agregada a agujeros microtituladores por 1 hora a 24°C, seguido del lavado de los agujeros con un fluido adecuado (e.g., PBS) para remover los microbios no enlazados. Los microbios no enlazados y/o enlazados a las células epiteliales inmovilizadas son detectados, e.g., mediante el conteo usando microscopía de luz polarizada. En realizaciones alternativas, se usa un inmunoensayo para detectar la adherencia, con reactivos inmunológicos adecuados que son anticuerpos monoclonales o policlonales específicos de microbio(s), opcionalmente unidos a un marcador, tal como un radiomarcador, un fluoróforo o un cromóforo.

El experto en la técnica reconocerá que no se requiere inmovilizar ni la célula epitelial intestinal ni el microbio, aunque tal inmovilización puede facilitar la detección precisa de los microbios que se adhieren a las células epiteliales. Por ejemplo, en una realización, un microbio de las heces inmovilizado es puesto en contacto con una célula epitelial intestinal que no está inmovilizada. Además, el experto reconocerá que se puede usar cualquier fluido adecuado conocido en la técnica para obtener la suspensión microbiana, siendo fluidos preferidos cualquiera de los amortiguadores isotónicos conocidos. También, como se anotó anteriormente, se puede usar cualquier marcador conocido para detectar la adherencia de célula.

En un aspecto relacionado, la invención provee un kit para el ensayo de la adherencia de célula microbiana, que comprende una célula epitelial y un protocolo para ensayar la adherencia de célula microbiana a la célula epitelial. El protocolo describe un método conocido para detectar un microbio. Un kit preferido incluye una célula epitelial intestinal. Otros kits de la invención comprenden además un marcador, tal como un fluoróforo o un reportero.

Otro método de monitoreo contemplado por la invención es un ensayo de la hidrofobicidad microbiana. En este método se determina la hidrofobicidad relativa o absoluta de una célula microbiana usando cualquier técnica convencional. Una técnica ejemplar involucra la exposición de cualquier microbio a la cromatografía de interacción hidrofóbica, como se entendería en la técnica. Ukuku et al., J. Food Prot. 65: 1093-1099 (2002) incorporada aquí para referencia en su totalidad. Otra técnica ejemplar es una partición de fluido no polar:polar (e.g., 1-octanol: agua o xileno:agua) de cualquier microbio. Ver Majtan et al., Folia Microbiol (Praha) 47: 445-449 (2002), incorporada aquí para referencia en su totalidad.

En una realización de un ensayo de hidrofobicidad para monitorear la administración de PEG, una muestra de heces es suspendida en amortiguador de fosfato de sodio 50 mM (pH 7.4), que contiene NaCl 0.15 M. Los microbios en la suspensión son recolectados mediante centrifugación, y resuspendidos en el mismo amortiguador, y el ciclo de centrifugación-resuspensión se repite. Si es posible, los microbios son resuspendidos en el mismo amortiguador a una absorbancia de 0.4 a 660 nm, lo que permite monitorear espectrométricamente sin usar PEG marcado. La suspensión microbiana es tratada con xileno (2.5:1, v/v, Merck), la suspensión es vigorosamente mezclada por dos minutos, y la suspensión se deja sentar por 20 minutos a temperatura ambiente. La presencia de microbios en la fase acuosa es entonces determinada, por ejemplo, mediante determinación espectrofotométrica de absorbancia a 660 nm. Se usa un blanco que contiene el amortiguador de fosfato de sodio para eliminar el patrón.

En la obtención de las células microbianas de las muestras de heces para uso en estos métodos, se prefiere que el PEG de PMA sea

relativamente insoluble en el fluido usado para obtener la suspensión microbiana y cualquier fluido usado para diluir la suspensión microbiana.

La invención provee además un kit para realizar el método de monitoreo, que comprende un ensayo de la hidrofobicidad microbiana, que comprende una célula epitelial intestinal y un protocolo que describe la determinación de la hidrofobicidad microbiana. Un kit preferido incluye una célula epitelial intestinal. Los kits relacionados comprenden además un marcador, tal como un fluoróforo o un reportero.

Aún adicionalmente, la invención provee un método de monitoreo que comprende obtener una muestra de flora intestinal, y detectar la actividad de PA-I lectina/adhesina. Se puede usar cualquier técnica para detectar la actividad de PA-I lectina/adhesina conocida en la técnica. Por ejemplo, se puede detectar la PA-I lectina/adhesina usando un anticuerpo (fragmento de anticuerpo policlonal, monoclonal, tal como el fragmento Fab, cadena simple, quimera, humanizada o cualquier otra forma de anticuerpo conocida en la técnica) que reconoce específicamente PA-I lectina/adhesina. El inmunoensayo toma la forma de un formato de inmunoensayo conocido en la técnica, e.g., ELISA, Western, inmunoprecipitación, y similares. Alternativamente, se puede detectar una capacidad de ligamiento por carbohidrato de PA-I lectina/adhesina, o se puede medir la actividad de rompimiento de la barrera epitelial intestinal de PA-I lectina/adhesina, e.g., mediante el monitoreo de la resistencia eléctrica trans-epitelial o TEER de una capa epitelial, antes de, y/o durante la exposición a una muestra. En kits relacionados, la invención provee un compañero de ligamiento de PA-I lectina/adhesina y un protocolo para detectar la actividad de PA-I lectina/adhesina (e.g., actividad de ligamiento). Otros kits según la invención incluyen cualquier carbohidrato conocido por enlazar la PA-I lectina/adhesina y un protocolo para detectar la actividad de PA-I lectina/adhesina (e.g., actividad de ligamiento).

Numerosas modificaciones y variaciones de la presente invención son posibles en vista de las enseñanzas anteriores y están dentro del alcance de la invención. Las revelaciones totales de todas las publicaciones citadas aquí están incorporadas aquí para referencia.

60

REIVINDICACIONES

1. Un método para reducir la probabilidad de mortalidad en un animal con una condición anormal que comprende una superficie epitelial en riesgo de desarrollar un desorden mediado por microbios, que comprende la administración de una dosis efectiva de polietilen glicol (PEG) a un animal en necesidad de este, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 5,000 daltons.
2. El método según la reivindicación 1, en donde la condición anormal es seleccionada del grupo consistente de sepsis derivada del intestino, un daño por quemadura, enterocolitis necrotizante neonatal, neutropenia severa, colitis tóxica, enfermedad de intestino inflamatorio, enteropatía, rechazo de trasplante, bolsitis y abdomen de cerdo.
3. El método según la reivindicación 1, en donde el animal es seleccionado del grupo consistente de perro, gato, oveja, cabra, vaca, cerdo, pollo, caballo y humano.
4. El método según la reivindicación 3, en donde el animal es un humano.
5. El método según la reivindicación 1, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 15,000 daltons.
6. El método según la reivindicación 5, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio entre 5,000 y 20,000 daltons.
7. El método según la reivindicación 1, en donde el PEG está en una solución acuosa que comprende PEG al 10-20%.
8. El método según la reivindicación 7, en donde la solución acuosa comprende PEG al 10%.
9. Un método para inhibir la expresión de PA-I lectina/adhesina en un patógeno intestinal, que comprende administrar una dosis efectiva de

71

polietilen glicol (PEG) a un animal en necesidad de este, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 5,000 daltons.

10. El método según la reivindicación 9, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 15,000 daltons.

11. Un método para inhibir la activación inducida por intestino, de PA-I lectina/adhesina, que comprende administrar una dosis efectiva de polietilen glicol (PEG) a un animal en necesidad de este, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 5,000 daltons.

12. El método según la reivindicación 11, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 15,000 daltons.

13. Un método para inhibir el cambio morfológico inducido por C4-HSL de un patógeno intestinal, que comprende administrar una dosis efectiva de polietilen glicol (PEG) a un animal en necesidad de este, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 5,000 daltons.

14. El método según la reivindicación 13, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 15,000 daltons.

15. Un método para reducir la expresión de virulencia en un patógeno intestinal, que comprende administrar una dosis efectiva de polietilen glicol (PEG) a un animal en necesidad de este, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 5,000 daltons.

16. El método según la reivindicación 15, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 15,000 daltons.

17. Un método para aliviar la patogénesis intestinal mediante la prevención de la activación del quorum sensing patogénico, que comprende administrar una dosis efectiva de polietilen glicol (PEG) a un animal en necesidad de este, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 5,000 daltons.

18. El método según la reivindicación 17, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 15,000 daltons.

19. Un método para inhibir la adherencia de células bacterianas a un intestino mamífero, que comprende contactar el intestino con polietilen glicol (PEG), en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 5,000 daltons.

20. El método según la reivindicación 19, en donde la célula bacteriana es una seudomona.

21. El método según la reivindicación 20, en donde la seudomona es *pseudomonas aeruginosa*.

22. El método según la reivindicación 19, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 15,000 daltons.

23. Un método para reducir la expresión de PA-I lectina/adhesina en una célula bacteriana, que comprende contactar la célula bacteriana con polietilen glicol (PEG), en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 5,000 daltons.

24. El método según la reivindicación 23, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 15,000 daltons.

25. Un método para reducir la probabilidad de mortalidad en un animal que muestra un desorden epitelial mediado por microbios, que comprende administrar polietilen glicol (PEG) en una cantidad efectiva para inhibir la interacción de una célula epitelial intestinal mamífera y una célula bacteriana, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 5,000 daltons.

26. El método según la reivindicación 25, en donde el desorden epitelial mediado por microbios es seleccionado del grupo consistente de sepsis derivada del intestino, un daño por quemadura, enterocolitis necrotizante neonatal, neutropenia severa, colitis tóxica, enfermedad de intestino inflamatorio, enteropatía, rechazo de trasplante y bolsitis.

27. El método según la reivindicación 25, en donde el PEG se adhiere a una célula epitelial intestinal o una célula bacteriana en una forma topográficamente asimétrica.

28. El método según la reivindicación 25, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 15,000 daltons.

29. El método según la reivindicación 25, en donde la célula bacteriana es un patógeno intestinal y no hay modificación detectable de las características de crecimiento del patógeno intestinal.

30. El método según la reivindicación 25, que además comprende la introducción de una cantidad efectiva de un compuesto seleccionado del grupo consistente de dextrán, L-glutamina recubierta de dextrán e inulina recubierta de dextrán, en el intestino de dicho animal.

31. El método según la reivindicación 25, que además comprende la introducción de una cantidad efectiva de L-glutamina en el intestino de dicho animal.

32. Una composición farmacéutica que comprende polietilen glicol de al menos 15,000 daltons de peso molecular promedio, y un adyuvante, vehículo o diluyente adecuado.

33. La composición farmacéutica según la reivindicación 32, que además comprende un compuesto seleccionado del grupo consistente de dextrán, L-glutamina, L-glutamina recubierta de dextrán, inulina recubierta de dextrán, ácido butírico recubierto con dextrán, un fructo-oligosacárido, N-acetil-D-galactosamina, manosa recubierta con dextrán, galactosa y lactulosa.

34. Un kit para el tratamiento o prevención terapéutica de la sepsis derivada del intestino, que comprende la composición farmacéutica según la reivindicación 32, y un protocolo que describe el uso de la composición en el tratamiento o prevención terapéutica de la condición anormal.

35. Un método para prevenir una enfermedad o condición anormal, que comprende administrar una composición que comprende una dosis efectiva de polietilen glicol (PEG) a un animal, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 5,000 daltons.

36. El método según la reivindicación 35, en donde la enfermedad o condición anormal es seleccionada del grupo consistente de oído de nadador, otitis media aguda, otitis media crónica, neumonía inducida por ventilador, sepsis derivada del intestino, enterocolitis necrotizante, diarrea inducida por antibióticos, colitis pseudomembranosa, una enfermedad de intestino inflamatorio, enfermedad de intestino irritable, enterocolitis neutropénica, pancreatitis, síndrome de fatiga crónica, síndrome de disbiosis, colitis microscópica, una infección crónica del tracto urinario, una enfermedad transmitida sexualmente e infección.

37. El método según la reivindicación 36, en donde el animal es seleccionado del grupo consistente de perro, gato, oveja, cabra, vaca, cerdo, pollo, caballo y humano.

38. El método según la reivindicación 37, en donde el animal es un humano.

39. El método según la reivindicación 35, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 15,000 daltons.

40. El método según la reivindicación 35, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio entre 15,000 y 20,000 daltons.

41. El método según la reivindicación 35, en donde el PEG está en solución acuosa que comprende PEG al 10-20%.

42. El método según la reivindicación 41, en donde la solución acuosa comprende PEG al 10%.

43. El método según la reivindicación 35, en donde la composición comprende además un vehículo seleccionado del grupo consistente de una solución líquida, un gel tópico y una solución adecuada para nebulización.

44. El método según la reivindicación 35, en donde la composición además comprende un compuesto seleccionado del grupo consistente de L-glutamina, L-glutamina recubierta de dextrán, inulina recubierta de dextrán, ácido butírico recubierto con dextrán, un fructo-oligosacárido, N-acetil-D-galactosamina, manosa recubierta con dextrán, galactosa y lactulosa.

45. El método según la reivindicación 35, en donde la composición además comprende L-glutamina recubierta de dextrán, inulina recubierta de dextrán, ácido butírico recubierto con dextrán, un fructo-oligosacárido, N-acetil-D-galactosamina, manosa recubierta con dextrán, galactosa y lactulosa.

46. Un método para prevenir infección de la piel que comprende el paso de aplicar una composición que comprende una cantidad efectiva de polietilen glicol (PEG) a un animal, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 5,000 daltons.

47. El método según la reivindicación 46, en donde dicha composición comprende además un vehículo seleccionado del grupo consistente de un ungüento, una crema, un gel y una loción.

48. El método según la reivindicación 46, en donde el agente causante de dicha infección es seleccionado del grupo consistente de *Bacillus anthracis*, Virus de Viruela, *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *Clostridium difficile*, rotavirus, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacteria cloacae*, *Candida albicans*, y *Candida glabrata*.

49. Un método para prevenir infección respiratoria, que comprende el paso de administrar una cantidad efectiva de polietilen glicol (PEG) a un animal, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 5,000 daltons.

50. El método según la reivindicación 49, en donde la infección respiratoria es seleccionada del grupo consistente de neumonía asociada con ventilador e infección.

51. El método según la reivindicación 50, en donde el agente causante de dicha infección es seleccionado del grupo consistente de *Bacillus anthracis* y Virus de viruela.

52. Un método para irrigar al menos una porción del tracto urinario con el fin de prevenir una infección crónica del tracto urinario, que comprende el paso de entregar una cantidad efectiva de una composición que comprende PEG a una uretra, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 5,000 daltons.

53. El método según la reivindicación 52, en donde la porción del tracto urinario incluye al menos la vejiga.

54. Un método para prevenir una enfermedad transmitida sexualmente, que comprende el paso de aplicar polietilén glicol (PEG) a un condón, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 5,000 daltons.

55. Un condón que comprende al menos un recubrimiento parcial con polietilén glicol (PEG), en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 5,000 daltons.

56. Un método para prevenir un desorden del tracto digestivo, que comprende la administración de una dosis efectiva de una composición que comprende polietilén glicol (PEG) a un animal en necesidad de este, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 5,000 daltons

57. El método según la reivindicación 56, en donde el desorden del tracto digestivo es seleccionado del grupo consistente de enterocolitis necrotizante neonatal, diarrea inducida por antibióticos, colitis pseudomembranosa, una enfermedad de intestino inflamatorio, enfermedad de intestino irritable, enterocolitis neutropénica, pancreatitis, síndrome de disbiosis y colitis microscópica.

58. Un método para monitorear la administración de polietilén glicol (PEG) a un animal en necesidad de este, que comprende:

(a) la administración de una cantidad efectiva de una composición que comprende PEG marcado, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 5,000 daltons, a un animal en necesidad de este, y;

(b) detectar el PEG marcado.

59. El método según la reivindicación 58, en donde el marcador es un fluoróforo.

60. El método según la reivindicación 58, en donde la detección del PEG marcado comprende inspección endoscópica.

61. El método según la reivindicación 58, en donde el PEG marcado es detectado en una muestra de heces.

62. El método según la reivindicación 58, que además comprende la administración de un segundo marcador específico para un microbio, y detección del segundo marcador.

63. Un método para monitorear la administración de polietilen glicol (PEG) a un animal en necesidad de este, que comprende:

(a) obtener una muestra de un animal que recibe polietilen glicol, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 5,000 daltons;

(b) contactar la muestra con una célula epitelial; y

(c) medir la adherencia de un microbio en la muestra a la célula epitelial.

64. Un método para monitorear la administración de polietilen glicol (PEG) a un animal en necesidad de este, que comprende:

(a) obtener una muestra de un animal que recibe polietilen glicol, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 5,000 daltons,

(b) aislar un microbio de la muestra; y

(c) medir la hidrofobicidad de la superficie celular del microbio.

65. Un método para monitorear la administración de polietilen glicol (PEG) a un animal en necesidad de este, que comprende:

(a) obtener una muestra de un animal que recibe polietilen glicol, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 5,000 daltons; y

(b) detectar la actividad de PA-I lectina/adhesina en la muestra.

66. El método según la reivindicación 65, en donde la PA-I lectina/adhesina es detectada mediante el enlace a un patrón de enlace de PA-I lectina/adhesina.

67. Un kit para monitorear la administración de polietilen glicol (PEG) según la reivindicación 66, que comprende un patrón de enlace de PA-I lectina/adhesina, y un protocolo que describe el uso del patrón de enlace para detectar la PA-I lectina/adhesina, en la muestra.

68. Un kit para monitorear la administración de polietilen glicol, que comprende un PEG marcado y un protocolo que describe el uso del PEG marcado para monitorear la administración de este.

69. Un método para prevenir la pérdida de la capacidad de lactancia en un animal que muestra una superficie epitelial de una glándula mamaria en riesgo de desarrollar un desorden mediado por microbios que afecta la producción de leche, que comprende la administración de una dosis efectiva de un polietilen glicol (PEG), en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 5,000 daltons, a la superficie epitelial de la glándula mamaria.

70. El método según la reivindicación 69, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 15,000 daltons.

71. Un método para prevenir el desarrollo de un desorden epitelial mediado por microbios, en un animal en edad de amamantamiento, que comprende la administración de una dosis efectiva de polietilen glicol (PEG),

en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 5,000 daltons, al animal.

72. El método según la reivindicación 71, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 15,000 daltons.

73. El método según la reivindicación 71, en donde el PEG está mezclado con formula de Infante.

74. Una composición que comprende formula de Infante y polietilen glicol (PEG), en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 5,000 daltons.

75. La composición según la reivindicación 73, en donde el PEG tiene un peso molecular promedio de al menos 15,000 daltons.

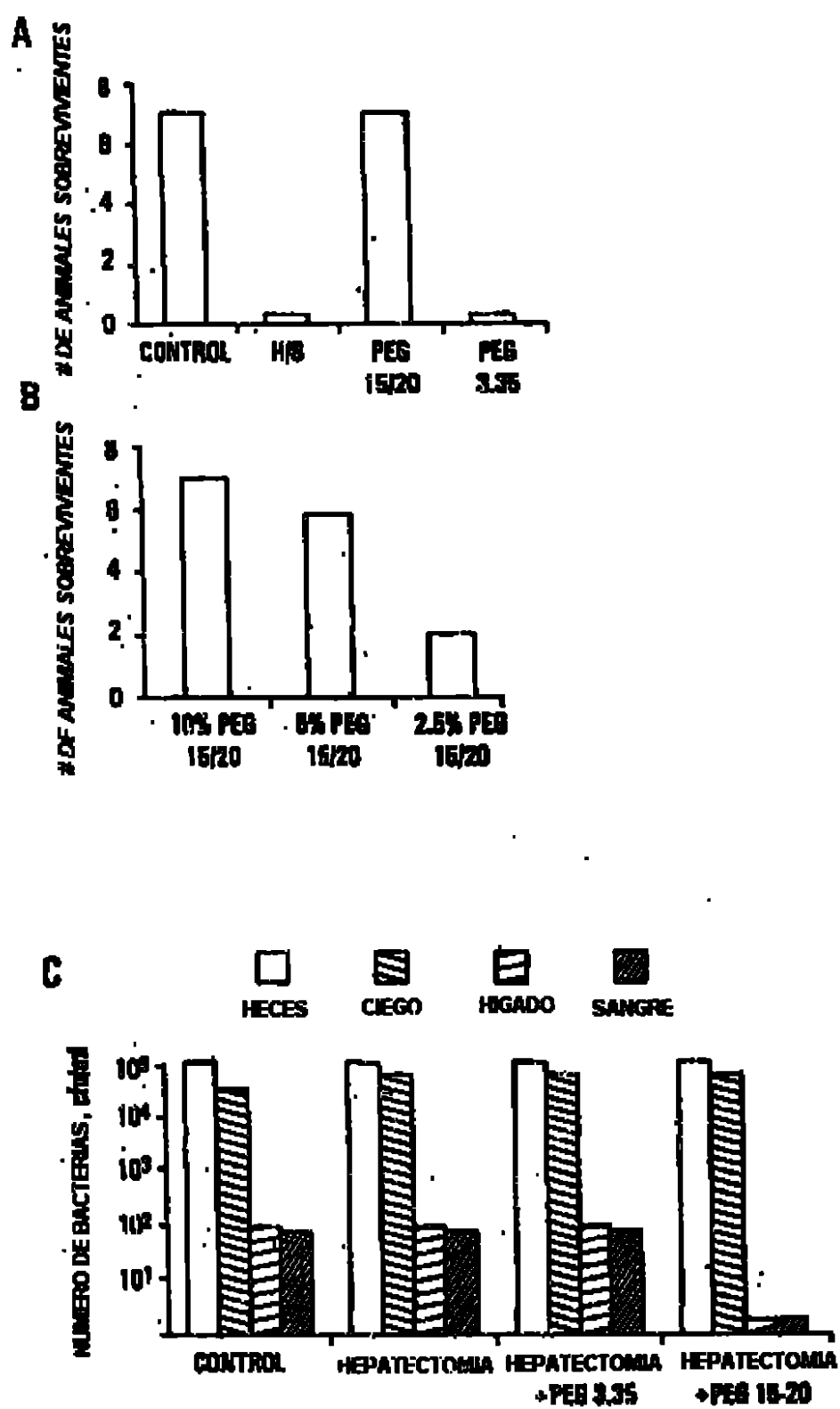


FIG. 1

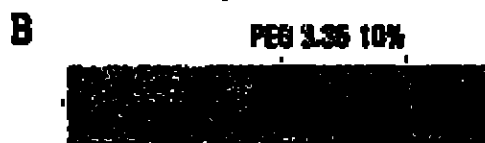
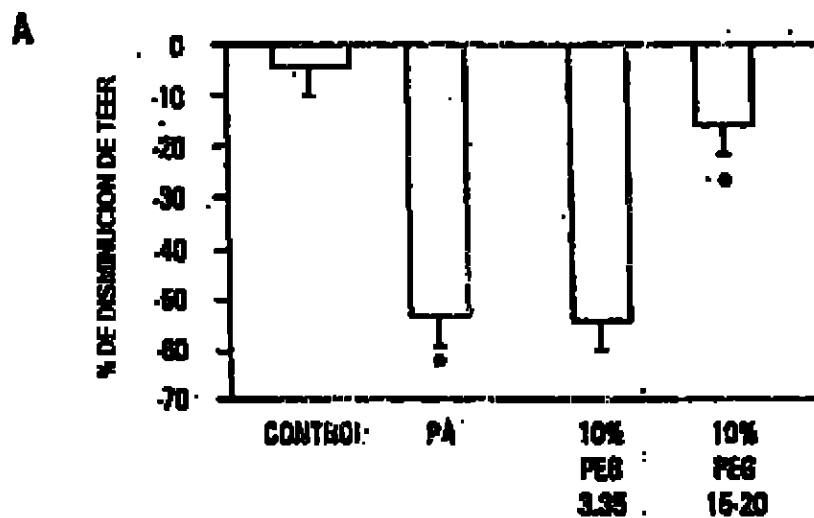


FIG. 2

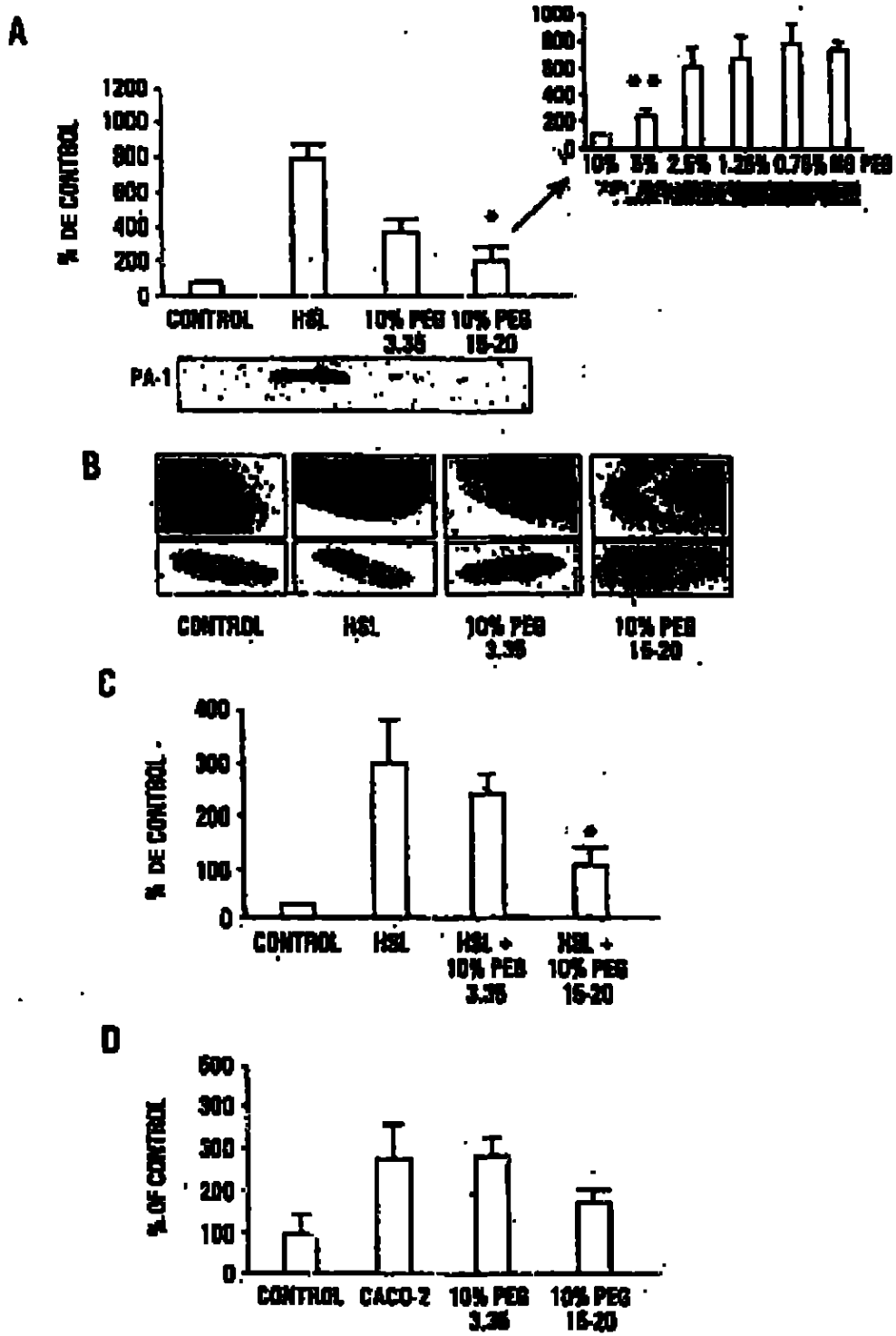
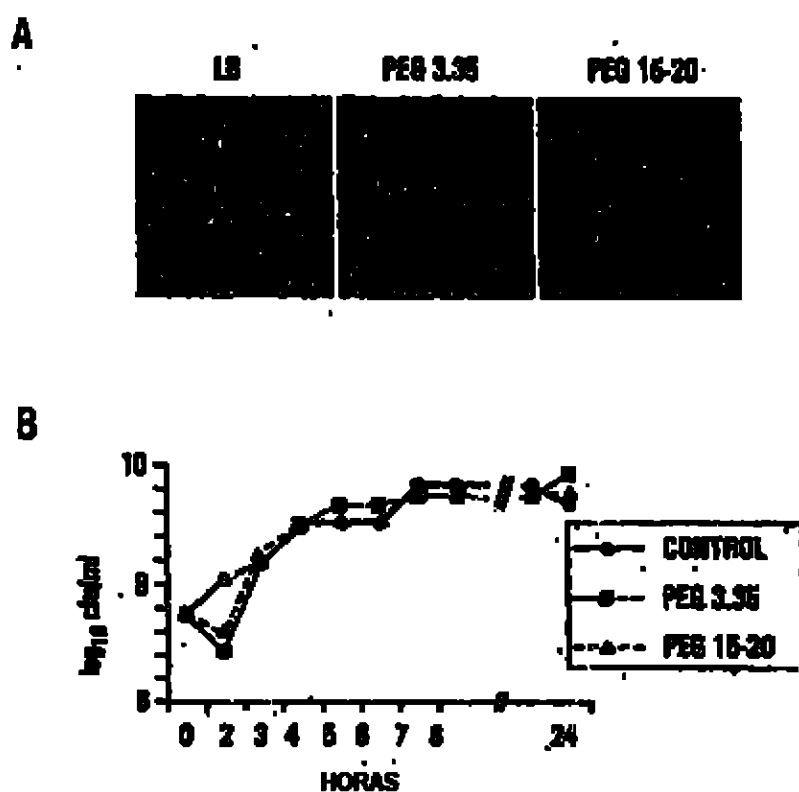


FIG. 3

**FIG. 4**

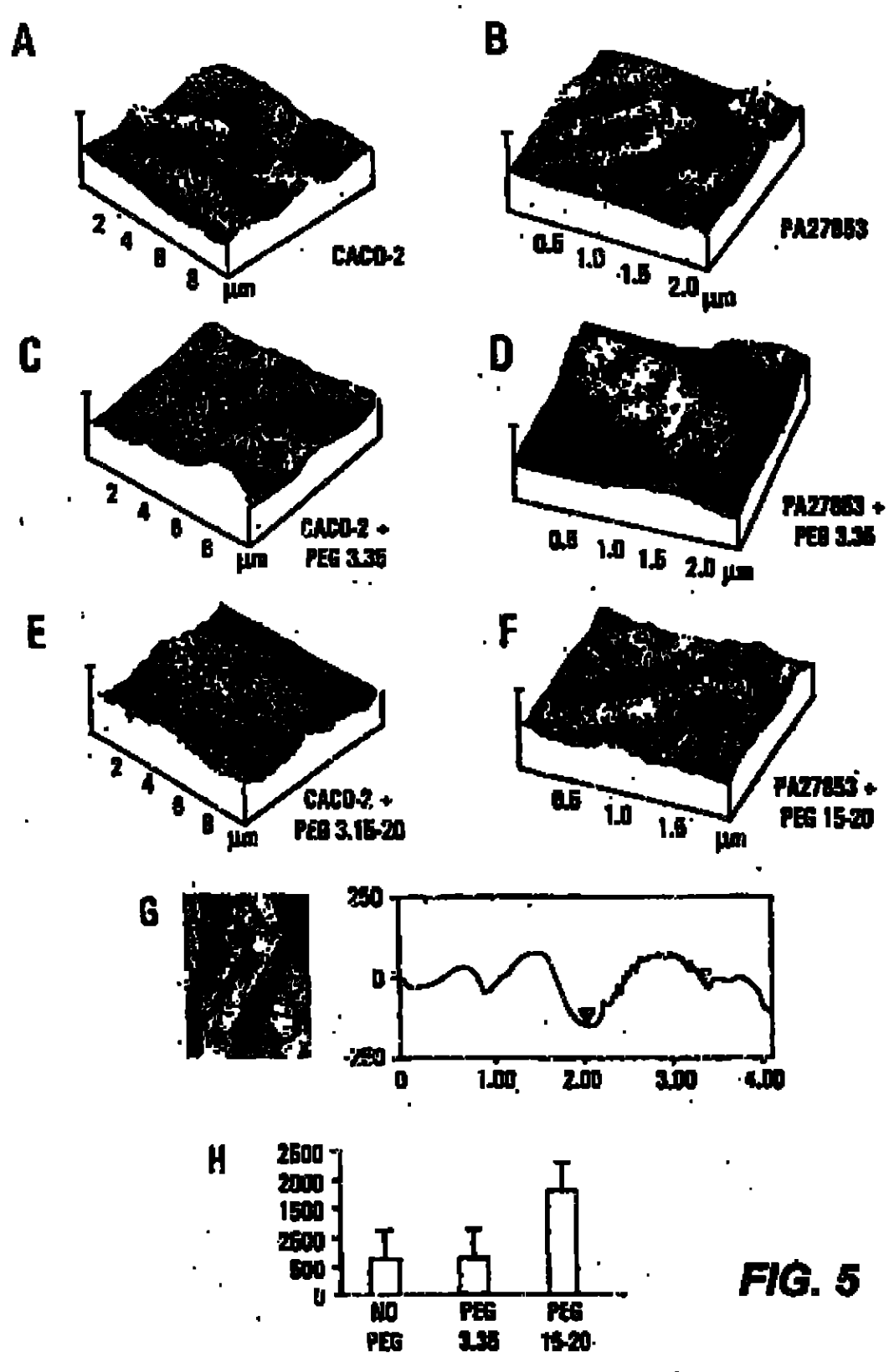


FIG. 5

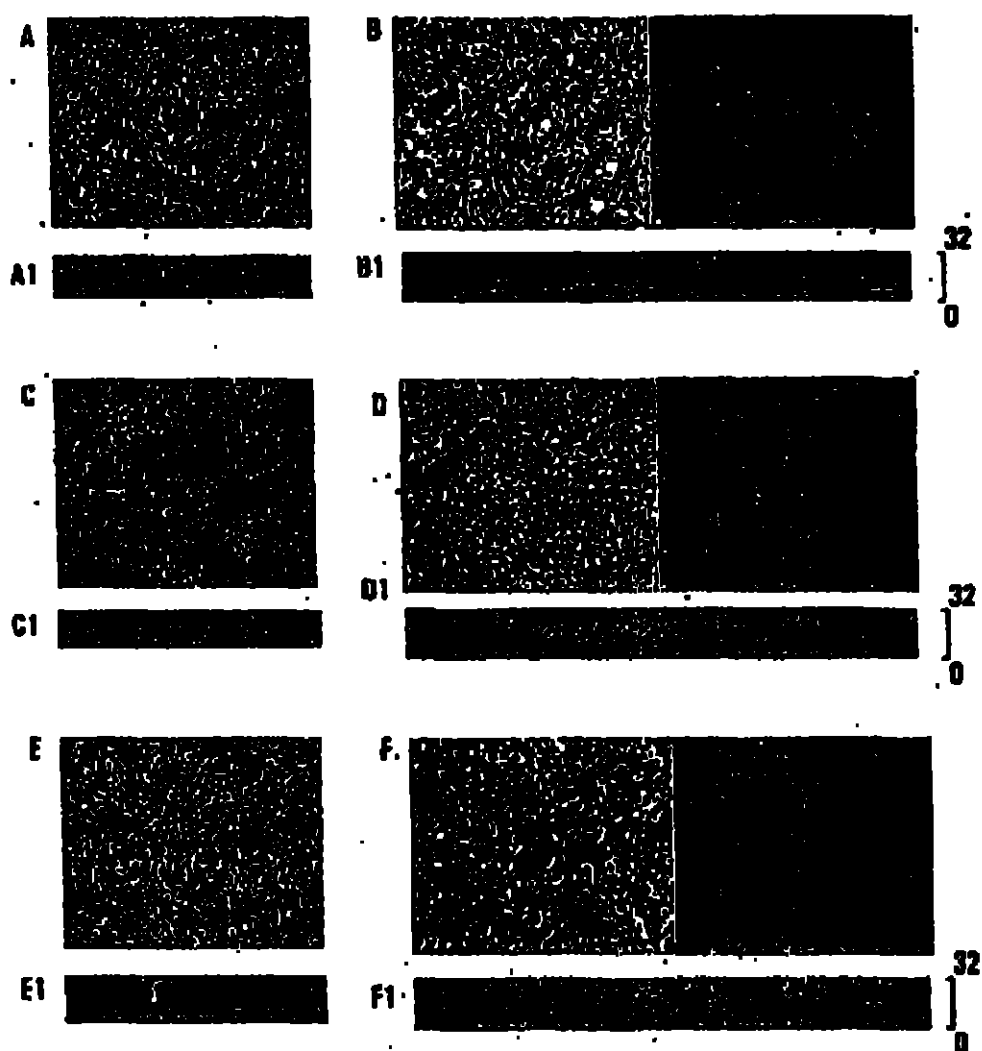


FIG. 6

8587



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION ☒ [x] MODELO DE UTILIDAD ☐ []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒ [x] 1
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒ [x] 1
- ◆ Descripción de la invención ☒ [x] 26
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☒ [x] 81
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒ [x] 2

COMPLETA ☒ [x] INCOMPLETA ☐ []

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ []

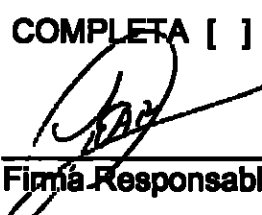
- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐ []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐ []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐ []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐ []

COMPLETA ☐ [] INCOMPLETA ☐ []

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐ []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐ []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐ []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐ []

COMPLETA ☐ [] INCOMPLETA ☐ []


Firma Responsable

Fecha mayo 23 de 2005

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

88-86

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA

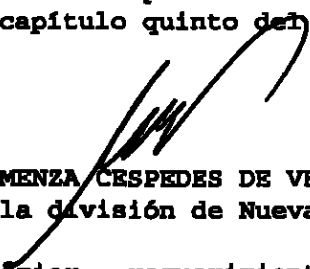
REFERENCIA	Radicación No.	5 49705
	Solicitud internacional	
	Fecha inicio fase nacional	
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	8877

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.
2. La solicitud no contiene el lugar de constitución de la sociedad solicitante (Art.27-c) Decisión 486.
3. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 30 SET. 2005
adpal