



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 15-303921- -00000-0000

Fecha: 2015-12-22 11:59:23 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra 2 PATENTES Eve 1 REGDEPOSITO
Act. 411 PRESENTACION Folios 31

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO Glicoinhibidores de adherencia de
Streptococcus en peces

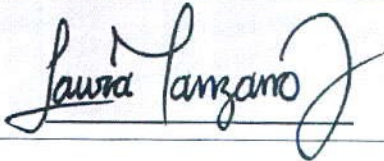
51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE Universidad Nacional de Colombia

DOMICILIO Cra 45# 26-85. Edit. Uriel Gutierrez

74. APODERADO Laura Manzano Jimenez

22. BOGOTÁ, D. C., _____

10	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i>			
☐ SI ☒ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i>			
☐ SI ☒ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado o número de registro.			
12	REDUCCIÓN DE TASAS		
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i>			
☐ SI ☒ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☒			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 15 de anexos			
13	PARA PUBLICAR A PARTIR DE LA FECHA DE PRESENTACIÓN O DE LA PRIORIDAD INVOCADA:		14 COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO
Si es Patente de Invención ☐ 6 meses ☐ 12 meses ☒ 18 meses ☐ Otro Cual:		Si es Patente de Modelo de Utilidad ☐ 6 meses ☐ 12 meses ☐ Otro Cual:	N° Fecha
15	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL <i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)</i>		
 C.C. 1091666812 T.P. 248536 Apoderada			
16	ANEXOS		
Documentación Técnica 1. ☒ Descripción N° de folios: 11 2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 8 3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 6 4. ☒ Resumen. 5. ☐ Documento de Prioridad. 6. ☐ Traducción del documento de prioridad. 7. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso. 8. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso. 9. ☐ Arte final 12 x 12. 10. ☐ Anexo formato digital.		Documentación Jurídica 11. ☒ Poderes, si fuera el caso. 12. ☒ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante. 13. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, si fuera el caso. 14. ☐ Copia de la licencia o autorización de conocimientos tradicionales, o Certificado o número de registro, si fuera el caso. 15. Reducción de tasas Micro, pequeñas o medianas empresas ☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004. Universidades públicas o privadas ☒ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación Entidades sin ánimo de lucro ☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☐ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar 16. ☐ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. 17. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. 18. ☐ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.	



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN
DIRECCIÓN NACIONAL DE EXTENSIÓN, INNOVACIÓN Y
PROPIEDAD INTELECTUAL

DNEIPI-721

Bogotá D. C. 22 de diciembre de 2015

Señores

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

Delegatura para la Propiedad Industrial

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Carrera 13 no. 27-00

Bogotá.

Asunto: Remisión de documentos para el registro de la patente de invención
"Glicoinhibidores de adherencia de streptococcus en peces."

Titularidad Patrimonial: Universidad Nacional de Colombia

Inventores: Carlos Arturo Iregui y Paola Andrea Barato Gómez

Respetados Señores:

De manera respetuosa, remito de manera física los documentos para el registro de la patente de invención: "Glicoinhibidores de adherencia de streptococcus en peces" creación que ha sido desarrollada por integrantes de la comunidad académica y de la cual la Universidad Nacional de Colombia es titular patrimonial (Solicitante).

Se remite la siguiente documentación:

1. Formulario diligenciado de la solicitud de patente nacional. (Folios 1 a 2)
2. Descripción de la Invención. (Folios 5 a 13)
3. Reivindicaciones. (Folio 14)
4. Figuras. (Folios 15 a 20)
5. Resumen. (Folio 21)
6. Referencias. (Folios 22 a 23)
7. Cooia de las cesiones de derechos de los creadores Carlos Arturo Iregui y Paola Andrea Barato Gómez. (Folio 24)
8. Documentos que acreditan la existencia y representación legal del profesor Diego Fernando Hernández Losada. (Folios 25 a 27)
9. Copia del poder para actuar otorgado por el Vicerrector de Sede Bogotá de la Universidad Nacional de Colombia a la abogada Laura Marcela Manzano Jiménez. (Folio 28)

10. Copia del acta de reconocimiento institucional de la Universidad Nacional de Colombia emitida por el Ministerio de Educación. (Folios 29 a 31)
11. Formulario de reducción de tasas suscrito por la Vicerrectora de Investigación Dolly Montoya Castaño. (Folio 32)
12. Comprobante de pago de la tasa de solicitud de la Patente Nacional con reducción de las tasas para Universidades Públicas. (Folio 33)

Agradecemos de antemano su amable colaboración

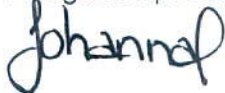
Cordialmente,


Laura Marcela Manzano Jiménez

C.C. 1091666812

T.P. 248536

Abogada apoderada de la Universidad Nacional de Colombia



Sector técnico

La presente invención está relacionada con glicohibidores de adherencia del *Streptococcus* a monosacáridos específicos presentes en glicoconjugados naturales tales como glicoproteínas y glicolípidos presentes en la superficie del epitelio intestinal de la tilapia (*Oreochromis* sp.).

Introducción de la invención

La estreptococosis es una de las enfermedades más importantes en la industria de la tilapia en el mundo, causa serias pérdidas económicas en la acuicultura de peces, que en 2008 fueron estimadas en 250 millones de dólares en el ámbito mundial (Klesius, Shoemaker & Evans, 2008). La enfermedad en tilapia es causada por cocos del género *Streptococcus* tales como *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Lactococcus garviae* (Eldar, Bejerano & Bercovier, 1994; Perera, Collins, Johnson & Lewis, 1994; Evans, Klesius & Shoemaker, 2009; Netto, Leal & Figueiredo, 2011).

Durante el curso de las enfermedades infecciosas, la adherencia es el primer paso en la interacción entre el hospedero y el patógeno, esta es una fase crucial para el patógeno. Muchos, si no todos los patógenos, se unen específicamente a secuencias de oligosacáridos en las superficies de células animales. Los estreptococos han desarrollado mecanismos para usar esos residuos para la adherencia, pero las adhesinas usadas por el *S. agalactiae* y los receptores en el epitelio gastrointestinal de la tilapia son desconocidos. La presente invención ilustra que el *S. agalactiae* usa monosacáridos específicos y oligosacáridos como receptores en la superficie del epitelio intestinal para su adherencia. Estos receptores pueden ser bloqueados por azúcares específicos y una lectina que impiden la adherencia del *S. agalactiae*.

Se han descrito algunos mecanismos de interacción glicobiológica para diferentes *Streptococcus*, por ejemplo, el *Streptococcus pneumoniae* produce tres exoglicosidasas asociadas a la superficie: una neuraminidasa, NanA; una β -galactosidasa, BgaA y una β -N-acetilglucosaminidasa, StrN. NanA, BgaA y StrH actúan secuencialmente para remover el ácido siálico, la galactosa y la N-acetilglucosamina y exponer la manosa en glicoproteínas humanas a las que se unen los neumococos. Adicionalmente, ambas BgaA y NanA contribuyen a la adherencia de neumococos no encapsulados a las células epiteliales humanas, en ensayos *in vitro* (King, Hippe & Weiser, 2006). *S. pyogenes* exhibe una pululanasa unida en la superficie, Pula, que combina la actividad de unión a glicoproteína (para tiroglobulina, mucina submaxilar, fetuina y asialofetuina) y la actividad degradadora de carbohidratos (hidrolización de pululan y degradación del almidón) en la misma molécula y estas propiedades permiten la función enzimática de azúcares adicionalmente a la actividad de adhesión (estreptadhesina) (Hytönen, Haataja & Finne, 2003). Para *S. agalactiae* (también denominado Streptococcus del grupo B, GBS) ha sido descrita la proteína C- α (ACP) como adhesina a receptores glicosaminoglicanos en

células del modelo de *Drosophila melanogaster* (Baron, Wong, Nybakken, Carey & Madoff, 2009). Sin embargo, ACP no está presente en cepas de GBS-específicas de peces o GBS-asociadas a peces (Delannoy, Zadoks, Crumlish, Rodgers, Lainson, Ferguson...& Fontaine, 2014).

Desde el punto de vista del hospedero, modelos *in vitro* (células S2 de embriones de *D. melanogaster*, Caco-2 y HT-29 de epitelio intestinal humano) e *in vivo* (*D. melanogaster*), han demostrado que la presencia de glicoconjugados (Syndecan-1 en líneas celulares intestinales humanas) confieren susceptibilidad a la infección por GBS (Henry-Stanley, Hess, Erlandsen & Wells, 2004; Baron *et al.*, 2009).

La terapia glicobiológica antiadhesiva como alternativa para inhibir este primer paso de interacción (adherencia) entre el patógeno y el hospedero ha solo emergido lentamente durante las últimas décadas (Karlsson, 1998). Tal intervención basada en carbohidratos puede ser considerada más leve y amable, más ecológica y segura, comparada con los actuales tratamientos antibióticos (Sharon, 2006). En peces, este tipo de terapia no ha sido probada y el ambiente acuático es un desafío para asegurar la interacción final entre los azúcares con las adhesinas del patógeno o el receptor del hospedero.

Esta invención describe azúcares específicos y una lectina que inhibe la adherencia del *S. agalactiae* al epitelio intestinal de la tilapia (*Oreochromis* sp.) en un modelo *ex vivo*. Esta invención tiene un importante uso potencial en la prevención, control y tratamiento de las infecciones por *Streptococcus* en peces, ya que los GBS-específicos y GBS-asociados a peces y especies patógenas de peces como *Streptococcus ictaluri* y *Streptococcus iniae* tienen una vía metabólica común para el uso de tales azúcares.

Patentes previamente publicadas como WO2003002127 y US20040176320 describen glicoinhibidores de enzimas para prevenir la formación de nuevos receptores oligosacáridos para *Helicobacter pylori* y otras bacterias y virus (Natunen J., Miller-Podraza H., Tneberg S., Ansgrom J., Karlsoon K-A, 2003 and 2004). El mecanismo usado por los glicoinhibidores definido en ambas patentes está relacionada con el uso enzimático de azúcares por la bacteria. La presente invención usa los azúcares y la lectina, que inhiben la adherencia por interacción con adhesinas de *S. agalactiae* y/o ocupando receptores para esta bacteria en el epitelio intestinal de la tilapia. Esta invención describe un mecanismo patogénico diferente al descrito en WO2003002127 y US20040176320 y estas patentes no reivindican el uso de glicoinhibidores para infecciones por *S. agalactiae*, *S. iniae* o *S. ictaluri*, ni su uso en peces.

Breve descripción de la invención

La presente invención presenta glicoinhibidores de la adherencia compuestos por *N*-acetilgalactosamina (GalNAc y moléculas asociadas a ella como Gal β 1 $\rightarrow$ /GalNAc, oligosacáridos relacionados con Gal β 1, *N*-acetilactosamina (LacNAc) y lactosa), ácido siálico (Neu5Ac), α -metil manosido (MeaMan) o lectina *Erythrina crystagalli* (ECL) para prevenir la adherencia de *S.*

7

agalactiae al epitelio intestinal de la tilapia (*Oreochromis* sp.). Las concentraciones de cada azúcar y lectina son: GalNAc (10 -12mM), Neu5Ac (5-9mM), Me α Man (12-14mM) y ECL (10-30 μ g/ml). Estos monosacáridos y oligosacáridos podrían presentarse en monómeros u oligómeros y/o en combinación entre ellos.

Como consecuencia, cualquier glicoinhibidor de adherencia descrito en esta invención podría ser usado para la fabricación de medicamentos para la prevención, tratamiento o control de la estreptococosis en peces, en los que los azúcares o la lectina seleccionada bloqueen la adherencia de *S. agalactiae*, *S. iniae* y *S. ictaluri* que inducen enfermedad en peces, en cualquier modelo sea *ex vivo*, *in vitro* e *in vivo*.

La presente invención también reporta estos azúcares y una lectina como potenciales suplementos dietarios que interfieran con las interacciones receptor-adhesina entre *S. agalactiae* y el epitelio intestinal de la tilapia (*Oreochromis* sp.).

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Patrón lectinohistoquímico (LHC) de la superficie apical del epitelio intestinal de tilapias (saludables y con estreptococosis) y cachamas (*Piaractus brachypomus*). Esta última especie no es susceptible a sufrir estreptococosis. LHC fue positivo para la lectina *Erythrina cristagalli* en tilapias con estreptococosis y negativo en tilapias sanas y en cachamas. LHC contrastada con hematoxilina, 400X.

Figura 2. Patrón lectinohistoquímico (LHC) de la superficie apical del epitelio intestino de tilapias (saludables y con estreptococosis) y cachamas (*Piaractus brachypomus*). LHC fue positiva a la aglutinina *Dolichos biflorus* (DBA) en tilapias sanas y tilapias con estreptococosis, pero negativa en cachamas. LHC contrastada con hematoxilina, 400X.

Figura 3. Ensayo de puntos de unión a lectina con *S. agalactiae* tipo salvaje-WT (SaTiBe08-18) y su mutante sin cápsula Δ cps (Δ cpsSaTiBe08-18). Cada cuadrado corresponde a una lectina: 1. Concanavalina A (ConA), 2. Aglutinina de soya (SBA), 3. Aglutinina de germen de trigo (WGA), 4. Aglutinina *Dolichos biflorus* (DBA), 5. Aglutinina *Ulex europaeus* I (UEA I), 6. Aglutinina *Ricinus communis*₁₂₀ (RCA₁₂₀), 7. Aglutinina de maní (PNA), 8. Lectina *Griffonia simplicifolia* I (GSLI), 9. Aglutinina *Pisum sativum* (PSA), 10. Aglutinina *Lens culinaris* (LCA), 11. Aglutinina *Sophora japonica* (SJA), 12. Aglutinina de germen de trigo succinilada (sWGA), 13. Lectina *Griffonia simplicifolia* II (GSLII), 14. Lectina *Datura stramonium* (DSL), 15. Lectina *Erythrina cristagalli* (ECL), 16. Jacalina, 17. Lectina *Lycopersicon esculentum* (LEL), 18. Lectina *Solanum tuberosum* (STL), 19. Aglutinina *Vicia villosa* (VVA), 20. Bacteria sin lectina, y 21. PBS.

Figura 4. Adherencia de *S. agalactiae* WT (SaTiBe08-18) en un modelo *ex vivo* de explantes intestinales de tilapia (experimento I). ECL, Me α Man, GalNAc and Neu5Ac fueron más efectivos para inhibir la adherencia bacteriana. La lectina y los azúcares fueron incubados con los explantes 30 minutos antes de la infección con SaTiBe08-18.

Figura 5. Adherencia de la mutante sin cápsula de *S. agalactiae* Δ cps (Δ cpsSaTiBe08-18) en un modelo de infección *ex vivo* en explantes intestinales de tilapia (experimento I). La lectina y los azúcares fueron incubados con los explantes 30 minutos antes de la infección con Δ cpsSaTiBe08-18. $P > 0.05$; ***, $P < 0.0001$; *, $P < 0.05$.

Figura 6. Adherencia del *S. agalactiae* WT (SaTiBe08-18) en un modelo de infección *ex vivo* en explantes intestinales de tilapia (experimento II). ECL y Neu5Ac inhibieron significativamente la adherencia. La lectina y el azúcar fueron incubados con la bacteria 30 minutos antes de infectar los explantes. $P > 0.05$; ***, $P < 0.0001$; *, $P < 0.05$.

Figura 7. Adherencia de la mutante sin cápsula de *S. agalactiae* Δ cps (Δ cpsSaTiBe08-18) en un modelo de infección *ex vivo* en explantes intestinales de tilapia (experimento II). ECL, MeaMan y GalNAc inhibieron significativamente la adherencia. La lectina y los azúcares fueron incubados con la bacteria 30 minutos antes de infectar los explantes. $P > 0.05$; **, $P < 0.0005$.

Figura 8. Inmunohistoquímica (IHC) contra el antígeno específico del grupo B del *Streptococcus* (GBS) en explantes de intestino de tilapia incubados con ECL y Neu5Ac, 30 minutos antes de la infección con Δ cpsSaTiBe08-18 (Experimento I). POS: Control positivo. Ambos azúcares redujeron la adherencia de *S. agalactiae* al epitelio intestinal. Contrastado con hematoxilina, POS y ECL 400X, y Neu5Ac 1000X.

Figura 9. Inmunohistoquímica (IHC) contra el antígeno específico del grupo B del *Streptococcus* (GBS) en explantes de intestino de tilapia. Δ cpsSaTiBe08-18 fue incubada con ECL y GalNAc durante 30 minutos antes de la infección del explante (experimento II). POS: control positivo. Ambos, el azúcar y la lectina, redujeron la adherencia de *S. agalactiae* al epitelio intestinal. Contrastado con hematoxilina, 400X.

Tabla 1. Lectinas biotiniladas con su azúcar de unión y porcentaje de anillos con LHC positiva en cada grupo experimental. ^aEl dato en paréntesis (n) en cada grupo experimental es el número de anillos intestinales evaluados, con tres réplicas para HT, HC y TS y dos réplicas para WT y Δ cps. *Información de Iskratsch et al. (2009) para ECL y para las otras lectinas de Vector Laboratories (Table of Lectin Properties). HT: tilapia sana; HC: cachama sana; TS: Tilapia con estreptococosis; WT: SaTiBe08-18 tipo salvaje; Δ cps: mutante sin cápsula de SaTiBe08-18.

Descripción detallada de la invención

La invención reivindicada describe carbohidratos y una lectina que inhiben la adherencia de *S. agalactiae* al epitelio intestinal de la tilapia en un modelo *ex vivo*. La adherencia bacteriana es una capacidad clave que le permite a la bacteria sobrevivir y proliferar en su respectivo hospedero, ya que es un prerrequisito para establecer una infección y para el subsecuente desarrollo de la enfermedad en la mayoría de las infecciones entéricas y respiratorias. Esta área del conocimiento se está convirtiendo en una fuente de nuevas terapéuticas en un intento para prevenir y tratar enfermedades bacterianas (Cozens & Read, 2012). Las terapias anti-adhesivas tiene particulares ventajas, como que ellas no causan directamente la muerte de la bacteria, lo

que no presiona al desarrollo de adaptaciones evolutivas, como ocurre con los tratamientos antibióticos. La selección, diseño y síntesis de inhibidores de adhesión de dichas bacterias son necesarios para la invención de nuevas terapias para la prevención y posible tratamiento de infecciones bacterianas (Pieters, 2011). Las bacterias se unen a sus hospederos usando los glicoconjugados de los mismos. La interacción entre adhesina/lectina del patógeno y los glicoconjugados del hospedero tienen alta especificidad y la mayoría de las veces son uniones multivalentes que generan alta afinidad de unión (Imberty & Varrot, 2008).

El ingreso vía oral ha sido descrito como una importante ruta de infección para *Streptococcus iniae* en tilapia (Perera, Johnson & Lewis, 1997) y para *Streptococcus agalactiae* en el mero de Queenslar d (*Epinephelus lanceolatus*) y en la tilapia (Delamare-Deboutteville, Bowater, Condon, Reynolds, Fisk, Aviles & Barnes, 2014; Iregui, Comas, Vásquez & Verján, 2015). Aquí se reivindican azúcares y una lectina, que bloquean la adherencia de *S. agalactiae* al epitelio intestinal de la tilapia.

Patrones de carbohidratos en epitelio intestinal de tilapia. La lectinohistoquímica fue usada para construir un patrón de carbohidratos en la superficie del epitelio intestinal de la tilapia. La presencia diferencial de azúcares fue comparada entre tilapias con estreptococosis y tilapias sanas. Adicionalmente, el intestino de la cachama (*Piaractus brachipomus*) fue usado para completar la comparación. Las cachamas son peces que viven con las tilapias que sufren estreptococosis, consumen tilapias enfermas y muertas por estreptococosis pero nunca desarrollar la infección o enfermedad por *Streptococcus agalactiae*.

Porciones de intestino anterior de tilapias sanas (HT), cachamas sanas (HC) y tilapias con estreptococosis (TS) fueron disecados, los anillos de este órgano fueron cortados y fijados en formalina buferada al 3,7%, embebidos en parafina, cortados a 4µm de grosor y ubicados en láminas cargadas para ser procesados por lectinohistoquímica (LHC). Once anillos intestinales de HT, doce anillos intestinales de HC y trece anillos intestinales de TS fueron evaluados con 16 lectinas con tres réplicas de cada uno (Tabla 1).

Se observó una afinidad específica de la lectina *Erythrina crista-galli* (ECL) por la superficie del epitelio intestinal de tilapias con estreptococosis (Fig. 1, Tabla 1). Esta lectina fue negativa para detectar azúcares en el intestino de tilapias y cachamas sanas. ECL se une a oligo-antennary Galβ1→4GlcNAc, *N*-acetillactosamina y lactosa. GalNAc es su ligando activo (Wu, Wu, Tsai, Yang, Sharon & Herp, 2007). Las tilapias con estreptococosis expresan Gal, GalNAc, *N*-acetillactosa y/o lactosa en la superficie apical del epitelio intestinal.

Por otro lado, la superficie del epitelio intestinal de las tilapias sanas y las tilapias con estreptococosis fueron positivas a la detección de azúcares por lectinas con afinidad por Gal and GalNAc, como: aglutinina *Dolichos biflorus* (DBA) (Fig. 2), aglutinina de soya (SBA), aglutinina *Ricinus communis*₁₂₀ (RCA₁₂₀), lectina *Griffonia simplicifolia* I (GSLI) y aglutinina *Vicia villosa* (VVA). Este resultado sugiere que las cachamas no tienen Gal y/o GalNAc en la superficie del epitelio intestinal en su porción anterior (Tabla 1).

Ya que la LHC con ECL resultó positiva en tilapias con estreptococosis pero no en tilapias sanas, se decidió ver si ECL tenía la misma afinidad por la superficie del epitelio en explantes intestinales infectados *ex vivo* con WT y Δcps de GBS. Una mutante sin cápsula de WT (SaTiBe08-18) fue creada. SaTiBe08-18 es una cepa bien caracterizada de *Streptococcus agalactiae* que fue aislada del riñón de una tilapia con estreptococosis en Colombia. Esta bacteria no es hemolítica, es serotipo Ib, ST260, no amplifica ninguno de los genes que codifican para las proteínas de superficie descritas hasta ahora (*bca*, *rib*, *epsilon*, *alp2/3* and *alp4*) (Barato, Martins, Melo-Cristino, Iregui & Ramirez, 2015).

Brevemente, la construcción de la mutante se hizo usando *E. coli* DH5 α (Gibco, Invitrogen, Paisley, Scotland) que creció en caldo Luria-Bertani y WT fue cultivada en caldo Todd Hewitt (THB) o agar (THA) (Difco Laboratories, Detroit, USA). Se adicionó eritromicina a una dosis de 150 μgml^{-1} para *E. coli* y 5 μgml^{-1} para SaTiBe08-18. El grupo de genes *cps* de *S. agalactiae* WT fue eliminado por reemplazo de genes de alta eficiencia a través de integración homóloga de doble cruzamiento, como ha sido previamente descrito con algunas modificaciones (Biswas, Gruss, Ehrlich & Maguin, 1993). Los iniciadores fueron diseñados para las regiones que comprendían los lados terminales del grupo de genes *cps*, con una superposición de 21 bp del ADN genómico de GBS (cepa NEM316, número de acceso NC_004368).

Los fragmentos fueron unidos por PCR de extensión y superposición y clonados en un vector sensible a la temperatura pJRS233 con ADN polimerasa de alta fidelidad (Phusion High-Fidelity DNA polymerase, New England BioLabs, Beverly, USA) (Bryksin & Matsumura, 2010). La transformación e intercambio alélico en *E. coli* fue desarrollado como se ha descrito previamente con menores modificaciones (Framson, Nittayajarn, Merry, Youngman & Rubens, 1997). La extracción del DNA plasmídico de *E. coli* se hizo con el kit Genopure Plasmid Midi Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). El constructo de delección en el plásmido pJRS233 (1000ng) fue introducido en SaTiBe08-18 competente (sucrosa 0.625M) por electroporación en una cubeta de 0.1cm a 1.8 kV (18kV/cm), 200 Ω , y 25 μF con Gene Pulser Xcell Electroporation System (Bio-Rad, Hercules, USA). Después del intercambio alélico, las colonias sensibles a eritromicina fueron evaluadas con la delección esperada por amplificación por PCR con primers diseñados para las regiones laterales terminales del grupo de genes capsulares de GBS, *cspY* y *ung*. Por microscopía electrónica de transmisión con el método de fijación de lisina-hexamina rutenio tricloro (LHRT) (Hammerschmidt, Wolff, Hocke, Rosseau, Müller & Rohde, 2005) se observó Δcps SaTiBe08-18 (Δcps) sin cápsula y SaTiBe08-18 (WT) con cápsula en un microscopio electrónico de transmisión JEOL[®] 1400. Δcps fue congelada a -70°C con el sistema Cryobank[®] (Copan Diagnostics Inc, Corona, CA).

Dieciséis explantes intestinales de tilapia fueron expuestos a *S. agalactiae* WT (SaTiBe08-18) y once explantes expuestos a su mutante sin cápsula Δcps , ambas bacterias fueron incubadas con 10⁹ CFUml⁻¹ por 30 minutos y evaluadas por LHC, con dos réplicas de cada ensayo.

Cincuenta y seis por ciento (56%) (18/32) explantes infectados con WT y setenta y tres por ciento (73%) (16/22) explantes infectados con Δ cps de GBS mostraron lectinohistoquímica positiva leve y multifocal con ECL (Tabla 1.) En dos explantes infectados con Δ cps de GBS, la LHC positiva fue observada sobre el epitelio en contacto directo con la bacteria mutante. Los casos restantes con lectinomarcación positiva para ECL fueron localizados al azar en varios pliegues de los explantes intestinales. Los explantes sin infección fueron LHC negativos para ECL. Los controles negativos (sin lectina o con el azúcar inhibidor de la lectina) fueron todos negativos.

Patrones de carbohidratos en S. agalactiae (ST-260) de tilapia (SaTiBe08-18 y Δ cpsSaTiBe08-18). Para determinar el patrón de carbohidratos de la superficie de la cápsula de SaTiBe08-18 (WT) y de su pared celular (Δ cps, mutante sin cápsula), se hizo un ensayo de puntos de unión a lectinas con diecinueve lectinas biotiniladas (Fig. 3). WT y Δ cps fueron cultivadas en TBS hasta alcanzar la fase exponencial a $OD_{620nm}=0.3$. Fueron lavadas dos veces con PBS frío y resuspendidas en PBS a $OD_{620nm}=1.5$. La suspensión bacteriana (2.5 μ l) fue inoculada en una membrana de nitrocelulosa en un diseño que permitía la evaluación de diecinueve lectinas biotiniladas (Fig. 3). Los sitios de unión inespecíficos fueron bloqueados con BSA 5% (Merck, Darmstadt, Alemania). Se hicieron dos lavados con PBS+Tween 20 (Thermo Scientific, Massachusetts, USA) y 2 μ l de cada lectina (1 μ g/ml) fueron incubados en cada punto de inoculación de cada bacteria. Las lectinas biotiniladas BK-1000, BK-2000 y BK-3000 (Vector Labs, California, USA) evaluadas fueron: Concanavalina A (ConA), soya (SBA), germen de trigo (WGA), *Dolichos biflorus* (DBA), *Ulex europaeus* I (UEAI), *Ricinus communis*₁₂₀ (RCA₁₂₀), maní (PNA), *Griffonia simplicifolia* I (GSLI), *Pisum sativum* (PSA), *Lens culinaris* (LCA), *Sophora japonica* (SJA), germen de trigo succinilada (sWGA), *Griffonia simplicifolia* II (GSLII), *Datura stramonium* (DSL), *Erythrina cristagalli* (ECL), Jacalina, *Lycopersicon esculentum* (LEL), *Solanum tuberosum* (STL) y *Vicia villosa* (VVA).

Solo la sWGA (aglutinina de germen de trigo succinilada) mostró diferencias en la afinidad entre ambas bacterias, reaccionando con la mutante sin cápsula pero no con la cepa WT. sWGA se une selectivamente a GlcNAc no sialilado. WGA se une a ambos residuos de GlcNAc y ácido siálico y fue positivo para ambas bacterias WT y Δ cps. La sWGA provee un sistema para distinguir entre glicoconjugados sialilados y aquellos que contienen solo GlcNAc, sugiriendo que la cápsula de WT SaTiBe08-18 es sialilada.

En general, el polisacárido capsular sialilado de GBS (CPS) provee protección antifagocítica al impedir la deposición del complemento C3 activo por opsonización en la superficie bacteriana y mimetizar molecularmente al GBS para evadir la respuesta inmune (Carlin, Lewis, Varki & Nizet, 2007; Maisey, Doran & Nizet, 2008). También, el resultado sugiere que la superficie de WT no tiene GlcNAc, esta molécula está presente en la superficie de Δ cps. Cuando la cápsula se pierde, la lectina es capaz de alcanzar estructuras que eran "cubiertas" por la cápsula y que tiene este azúcar, podrían ser el antígeno del grupo B de la clasificación Lancefield y el peptidoglicano (Caliot, Dramsi, Chapot-Chartier, Courtin, Kulakauskas, Péchoux, Trieu-Cuot & Mistou, 2012).

Para otras lectinas, ambas bacterias tuvieron resultados similares: fueron positivos para LEL (un grupo de GlcNAc); ConA, PSA y LCA (un grupo de Man/Glucose (Glc)); PNA, SBA, ECL, Jacalina, DBA y RCA₁₂₀ (un grupo de Gal/GalNAc); y UEAI (un grupo de Fucose (Fuc)). UEAI, PNA, SBA, PSA, ECL y Jacalina mostraron una afinidad leve comparada con las otras lectinas positivas. Ambas bacterias fueron negativas para GSLII, DSL y STL (un grupo de GlcNAc) y VVA y GLSI (un grupo de Gal/GalNAc).

Glicoinhibidores de adherencia. En el modelo de infección *ex vivo* con *S. agalactiae* SaTiBe08-18 (WT) y Δcps SaTiBe08-18 (Δcps) en explantes de intestino de tilapia (*Oreochromis* sp.), se evaluaron las propiedades inhibitorias de adherencia de siete azúcares (Gal, GalNAc, Neu5Ac, Fuc, α -methyl glucoside (Me α Glc) y Me α Man) y una lectina. Dos tipos de experimentos fueron desarrollados: azúcar o lectina incubadas con los explantes 30 minutos antes de la adición de la bacteria (experimento I) y bacteria incubada con azúcar o lectina 30 minutos antes de la infección del explante (experimento II).

Tilapias sanas (<20g de peso corporal) estuvieron en ayuno por 5 días y luego se sacrificaron por sobredosis de anestesia con MS-222 metasulfonato de tricaina (Argent Labs, Washington, USA). La porción anterior del intestino (aproximadamente 4cm) fue disectada en cada pez e inmediatamente depositada en cajas de Petri de 140mm conteniendo 20ml de Medio Mínimo Esencial Eagle modificado Dulbecco DMEM (Gibco, Invitrogen, Paisley, Scotland) alto en glucosa a 28°C. El lumen intestinal fue cuidadosamente lavado con jeringa y aguja 21G con DMEM con el objetivo de eliminar el moco y los residuos de comida. Siete explantes (5mm de grosor) manteniendo su estructura tubular fueron obtenidos de cada pez.

WT y Δcps fueron cultivados en Brain Heart Infusion BHI caldo (Becton Dickinson, New Jersey, USA) a 30°C hasta alcanzar la fase tardía de crecimiento a $OD_{620nm} = 0.890-0.920$. La cepa WT fue centrifugada a 4000rpm y 18°C por 25min con el objetivo de eliminar el caldo BHI. WT fue lavado una vez con DMEM y centrifugada en las mismas condiciones, después se hizo un lavado final con solución salina estéril (SSS) a pH5 por 25min. Nuevamente fue centrifugada y el pellet se resuspendió en DMEM+BSA 10% para infectar los explantes. Δcps fue tratada de la misma forma que WT, excepto en que la centrifugación se hizo por 15min y los dos lavados fueron hechos solo con DMEM.

Para el experimento I, los explantes fueron cuidadosamente transferidos a placas de cultivo de 24 pozos (en duplicado) conteniendo DMEM con cada azúcar o lectina y albúmina sérica bovina (BSA) al 10% e incubados a 28°C en una atmósfera con CO₂ al 5% y humedad del 80% con agitación lenta. Un explante de cada pez fue macerado y cultivado en agar BHI (Becton Dickinson, New Jersey, USA) para evaluar su esterilidad. Después de 30 minutos de incubación, los explantes fueron lavados dos veces con DMEM. Los explantes fueron infectados con WT y Δcps a una dosis de 10^9 CFUml⁻¹ durante 30 minutos.

Para el experimento II, cada bacteria (WT y Δcps) fue incubada con cada azúcar o lectina a 28°C durante 30 minutos. Después, los explantes fueron incubados con la mezcla (bacteria y

azúcar o bacteria y lectina) a 28°C, en una atmósfera de CO₂ al 5% y humedad del 80% con agitación lenta durante 30 minutos más. Como control negativo y con el objetivo de evaluar el efecto de los azúcares y la lectina en el crecimiento de la bacteria, cada azúcar y lectina fue cultivado a 28°C durante 8 horas con cada bacteria y se construyó una curva de crecimiento midiendo la OD₆₂₀. Ningún azúcar o lectina redujo o incrementó el crecimiento bacteriano (WT y Δ cps).

Después de la incubación, los explantes fueron fijados en formalina buferada al 3.7% y procesados por la técnica de rutina Hematoxilina-Eosina (H&E). Se hizo detección por inmunohistoquímica (IHC) de WT y Δ cps en los explantes.

ECL (10-30µg/ml), Neu5Ac (5 – 9mM), Me α Man (12-14mM) y GalNAc (10-12mM) redujeron significativamente la adherencia de WT y Δ cps al epitelio intestinal (Figs. 4, 5, 6 y 7). Para ECL y Neu5Ac una inhibición significativa de la adherencia fue encontrada con WT en el experimento II (P<0,0001 y P<0.05, respectivamente) y con Δ cps en el experimento I (Neu5Ac:P<0,0001 y ECL:P<0.05) (Figs. 5 y 6). ECL también inhibió significativamente la adherencia de Δ cps en el experimento II (P<0.0005) (Fig. 7). Me α Man y GalNAc bloquearon la adherencia significativamente con Δ cps en el experimento II (P<0.0005) (Fig. 7).

GalNAc está presente en la superficie del epitelio intestinal de las tilapias con y sin estreptococosis pero no en cachamas, y este azúcar inhibió la adherencia de Δ cps cuando fue incubado el azúcar con la bacteria antes de infectar los explantes intestinales (Figs. 1, 2, 7 y 9). Todos los resultados sugieren que GalNAc es un componente de los receptores para *S. agalactiae* en el epitelio intestinal de las tilapias.

Células blanco. El epitelio gastrointestinal es la principal vía de entrada de *S. agalactiae* en tilapia. Esta invención tiene aplicación en el epitelio intestinal. El modelo de infección *ex vivo* con explantes intestinales de tilapia infectados con Δ cpsSaTiBe08-18 demostraron la eficiente adherencia de la bacteria cuando no fueron usados azúcares o lectinas y la inhibición de la adhesión cuando el intestino fue incubado con ECL y Neu5Ac antes de ser infectado con *S. agalactiae* (Figs. 5 y 8).

Dado que los GBS-específicos y los GBS-asociados a peces y especies patógenas de peces, como son el *Streptococcus ictaluri* y el *Streptococcus iniae*, observan una vía metabólica común para el uso de los azúcares objeto de estudio, la invención aquí reivindicada presenta un importante potencial en la prevención, control y tratamiento de las infecciones por *Streptococcus* en peces.

Reivindicaciones

1. Un glicoinhibidor de adherencia de *Streptococcus* en peces CARACTERIZADO PORQUE comprende al menos una de las siguientes sustancias:
 N-acetylgalactosamine (GalNAc) (10-12mM),
 ácido siálico (Neu5Ac) (5-9mM),
 α -metyl mannoside (Me α Man) (12-14mM),
 Lect na *Erythrina crystagalli* (ECL) (10 – 20 μ g/ml)
2. El glicoinhibidor para prevenir la adherencia de *Streptococcus* en peces de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE para prevenir, tratar y controlar la estreptococosis por *S. agalactiae* comprende la mezcla de GalNAc (10-12mM) y Neu5Ac (5-9mM).
3. El glicoinhibidor para prevenir la adherencia de *Streptococcus* en peces de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE para prevenir, tratar y controlar la estreptococosis por *S. agalactiae* comprende la mezcla de GalNAc (10-12mM) y Me α Man (12-14mM).
4. El glicoinhibidor para prevenir la adherencia de *Streptococcus* en peces de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE para prevenir, tratar y controlar la estreptococosis por *S. agalactiae* comprende la mezcla de Neu5Ac (5-9mM) y Me α Man (12-14mM).
5. El glicoinhibidor para prevenir la adherencia de *Streptococcus* en peces de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE para prevenir, tratar y controlar la estreptococosis por *S. agalactiae* comprende la mezcla de Me α Man (12-14mM) y ECL (10 – 20 μ g/ml).
6. El glicoinhibidor para prevenir la adherencia de *Streptococcus* en peces de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE para prevenir, tratar y controlar la estreptococosis por *S. agalactiae* comprende la mezcla de GalNAc (10 - 12mM), Neu5Ac (5 - 9mM) y Me α Man (12 - 14mM).
7. El glicoinhibidor para prevenir la adherencia de *Streptococcus* en peces de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE para prevenir, tratar y controlar la estreptococosis por *S. agalactiae* comprende la mezcla de Neu5Ac (5 - 9mM), Me α Man (12 - 14mM) y ECL (10 – 20 μ g/ml).
8. El glicoinhibidor para prevenir la adherencia de *Streptococcus* en peces de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE para prevenir, tratar y controlar la estreptococosis por *S. agalactiae*, *S. iniae* y *S. ictaluri* comprende la mezcla de GalNAc (10-12mM) y ECL (10 – 20 μ g/ml).

DRAWINGS



Figura 1

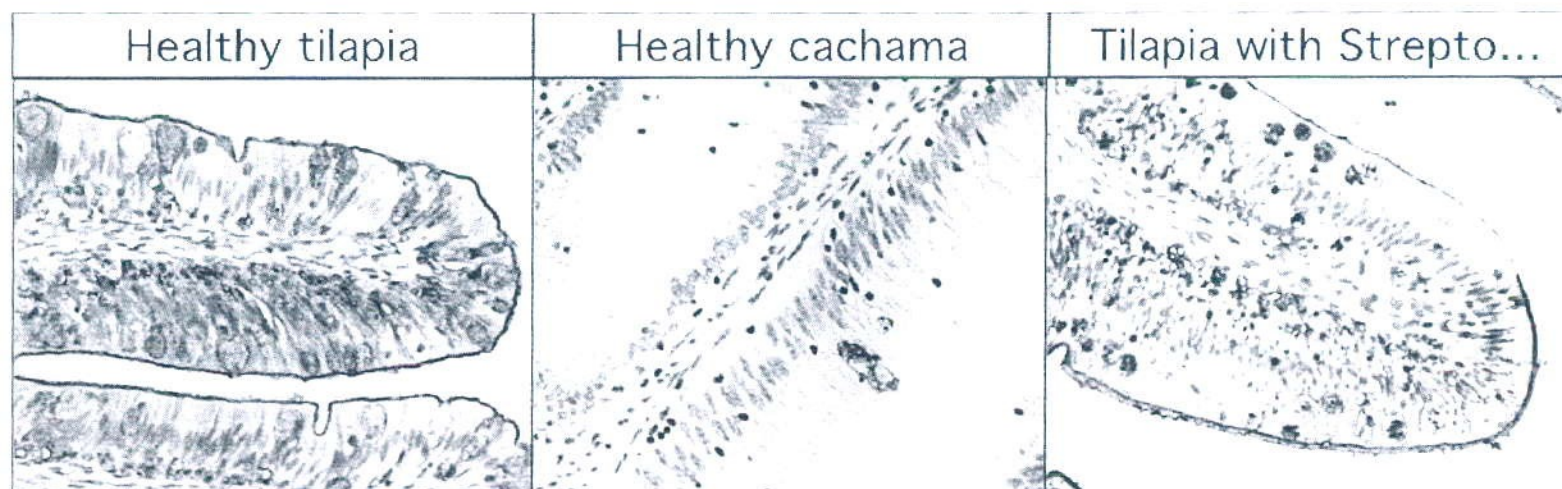


Figura 2

Lectins	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	13	14	15	16	17	18	19	20	21			
WT												
												
Δcps												
												

Figura 3

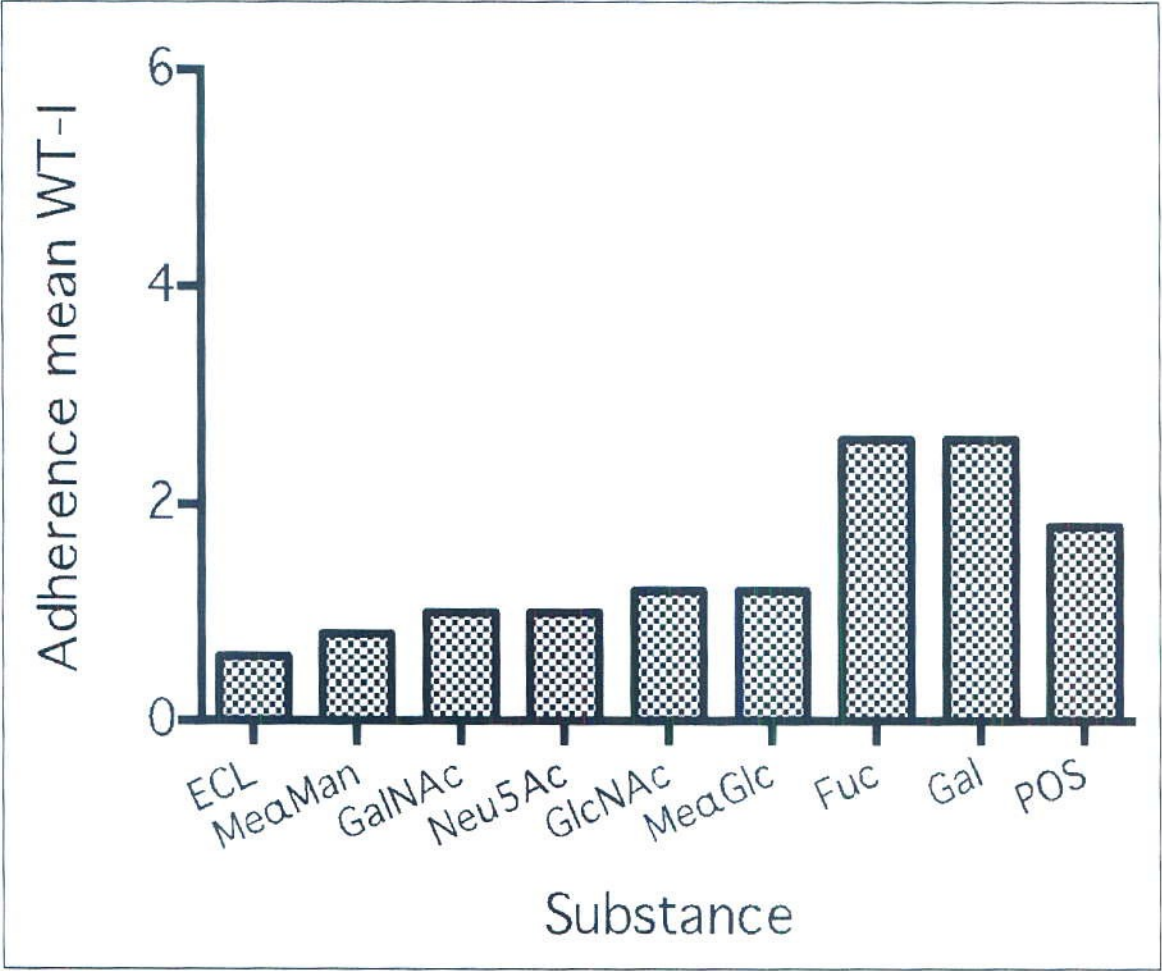


Figure 4

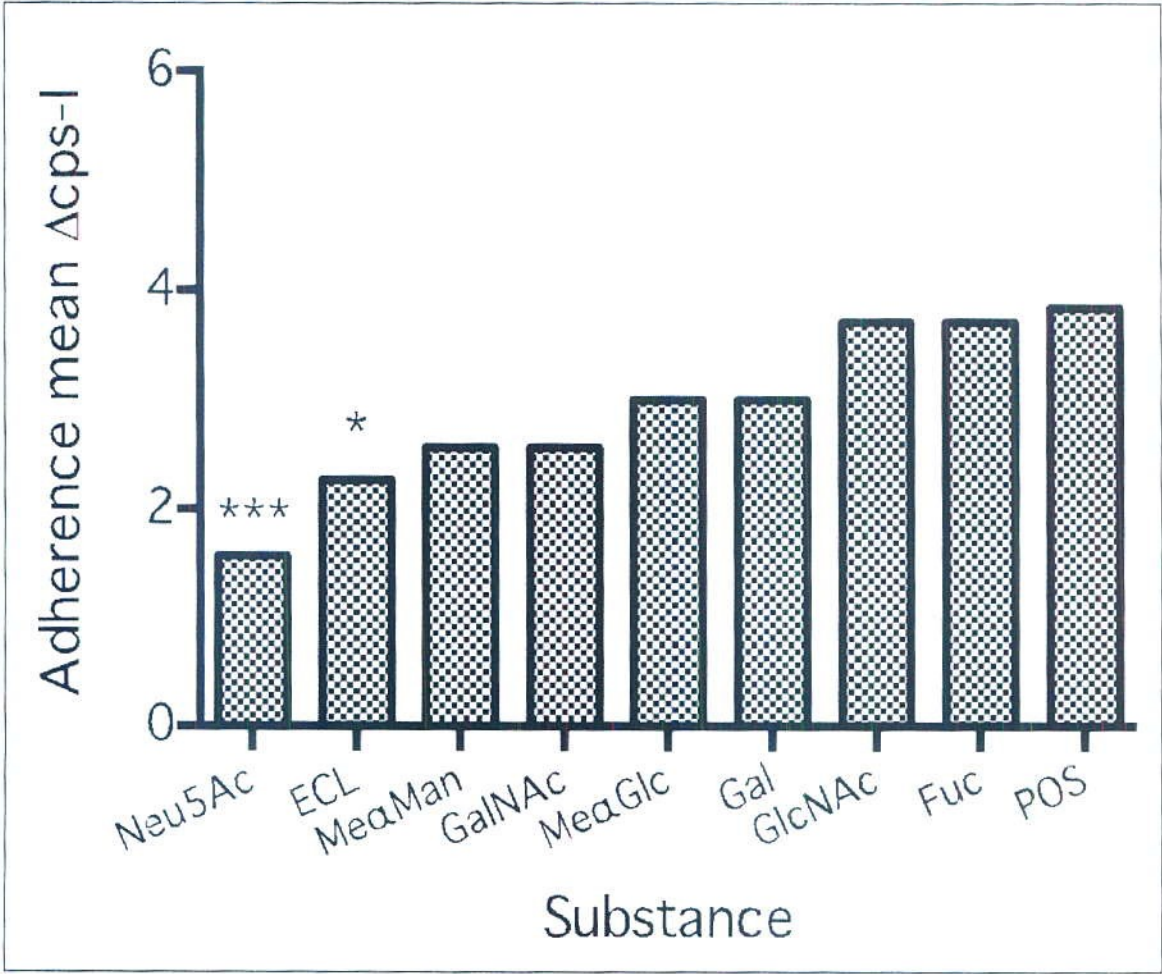


Figure 5

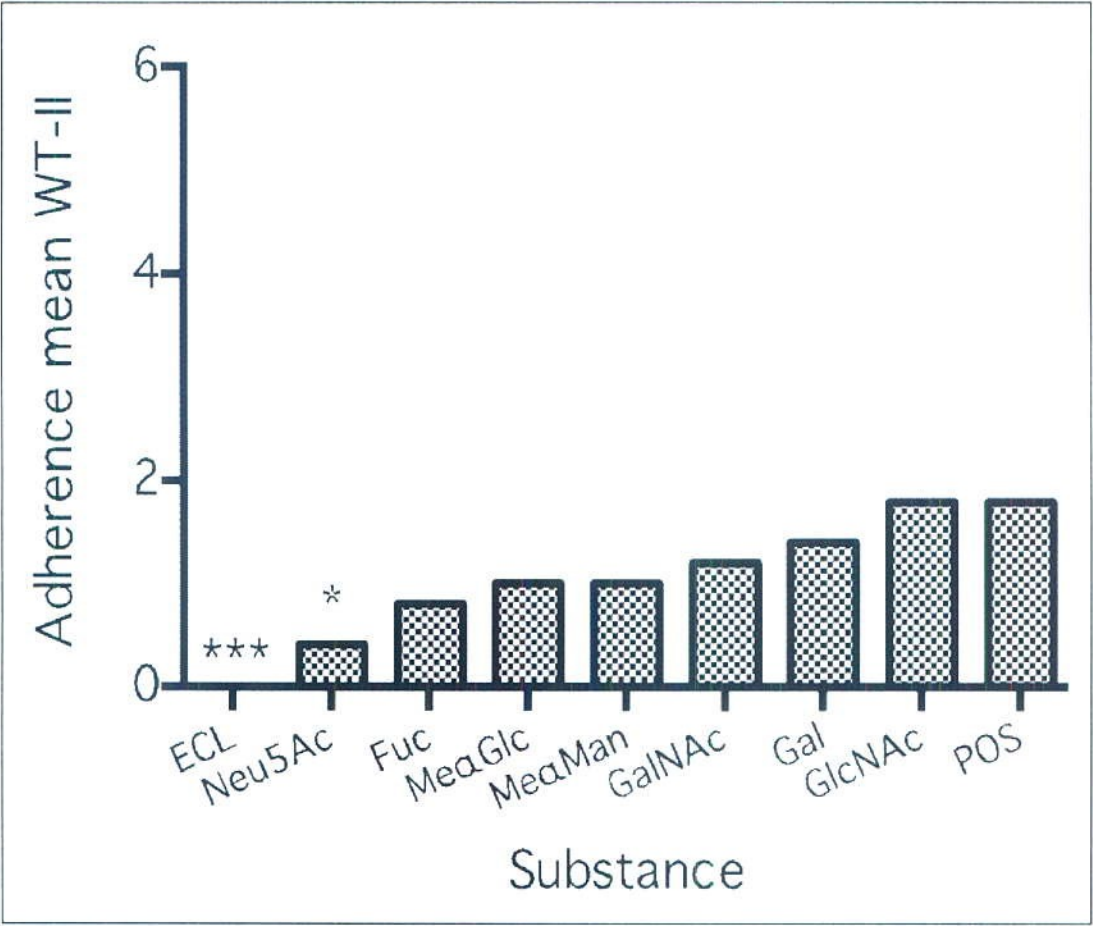


Figure 6

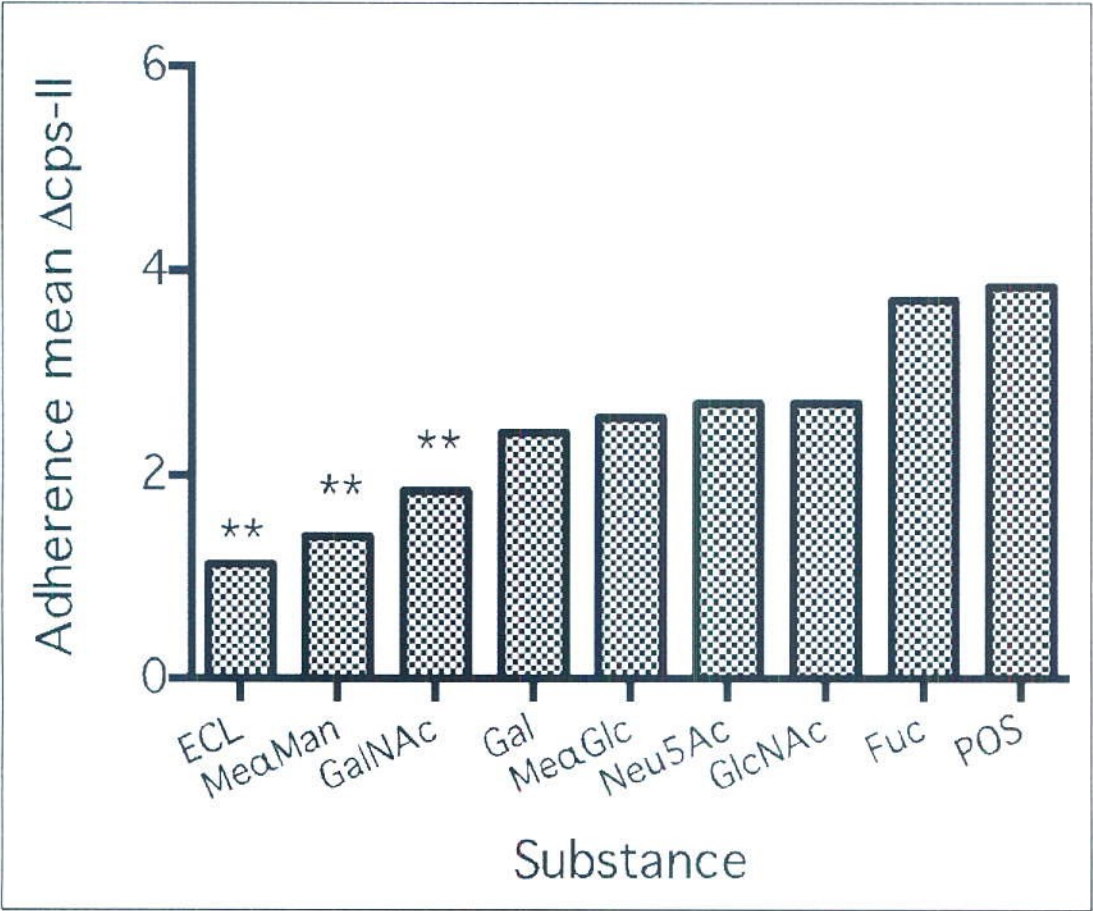
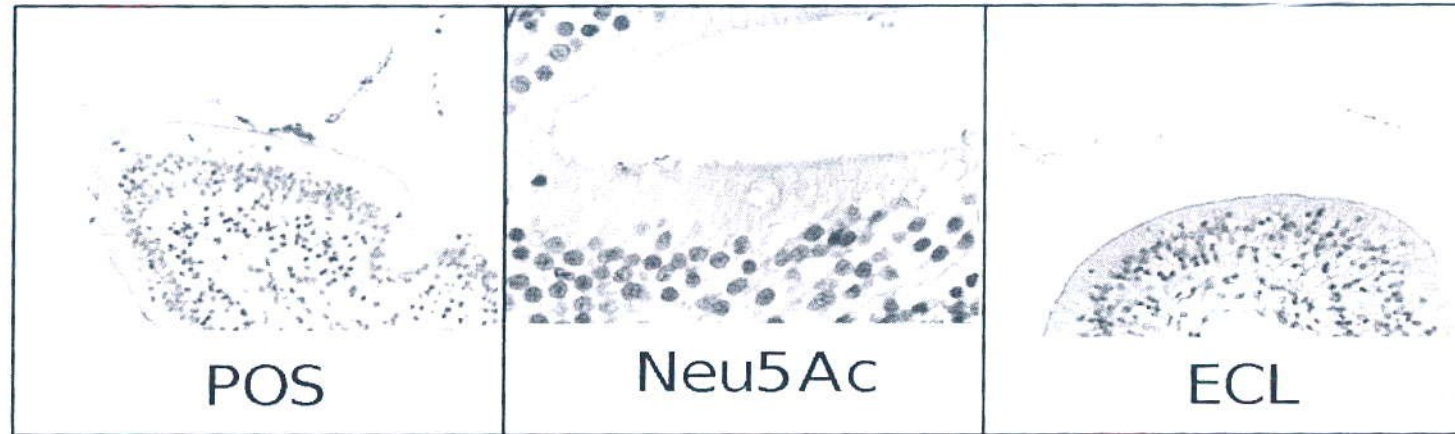
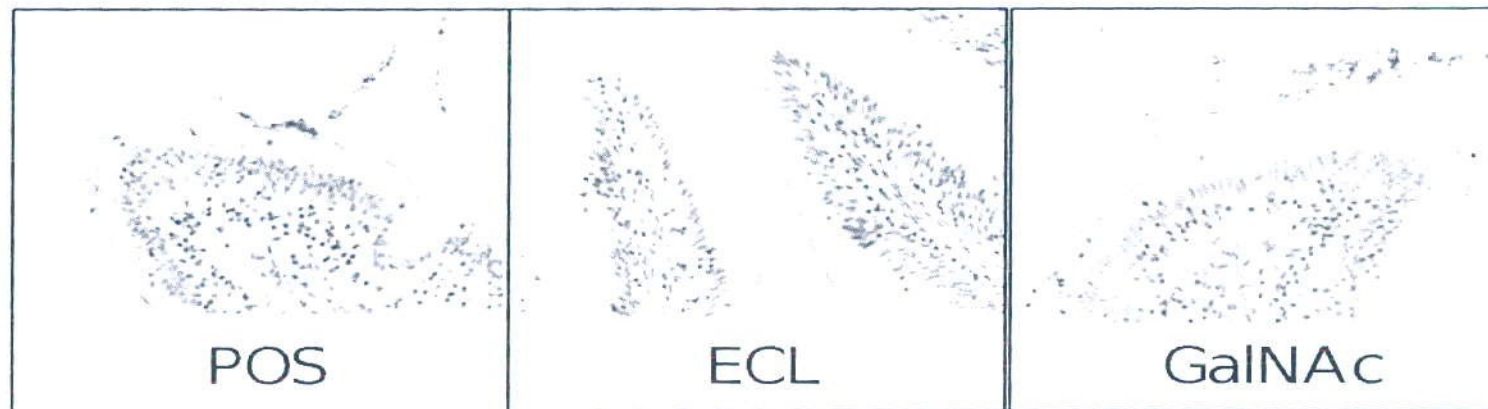


Figure 7



Intestine, IHC, 400x and 1000x

Figura 8



Intestine, IHC, 400x

Figura 9

Tabla 1

Lectina	Abreviatura	Especificidad de azúcar preferido*	Patrón positivo LHC	Grupo experimental				
				HT (11) ^a	HC (12) ^a	TS (13) ^a	WT (16) ^a	Δcps (11) ^a
<i>Erythrina cristagalli</i> lectina	ECL	β1,4Gal β1,4GalNAc Lac LacNAc	I	0	0	75%	56%	73%
<i>Vicia villosa</i> aglutinina	VVA	α-βGalNAc	II	100%	0	100%		
<i>Dolichos biflorus</i> aglutinina	DBA	α-βGalNAc		100%	0	100%		
Soybean aglutinina	SBA	α-βGalNAc		100%	0	100%		
<i>Griffonia simplicifolia</i> I	GSLI	αGal αGalNAc		100%	0	100%		
<i>Ricinus communis</i> I aglutinina	RCA ₁₂₀	α-βGal		70%	0	70%		
<i>Solanum tuberosum</i> lectina	STL	GlcNAc		100%	0	100%		
<i>Lens culinaris</i> aglutinina	LCA	αMan αGlc		100%	0	100%		
Aglutinina de germen de trigo	WGA	GlcNAc Sialic acid	III	100%	0	100%		
Aglutinina succinilada de germen de trigo	sWGA	GlcNAc		70%	0	70%		
<i>Lycopersicon esculentum</i> lectina	LEL	GlcNAc		100%	100%	100%		
<i>Datura stramonium</i> lectina	DSL	GlcNAc		100%	100%	100%		
Jacalina	Jacalin	GalNAc Man Glc MurAc NeuAc		100%	100%	100%		
Concanavalina A	ConA	αMan αGlc		100%	100%	100%		
<i>Griffonia simplicifolia</i> II	GSLII	α-βGlcNAc	Negativo	0	0	0		
<i>Pisum sativum</i> aglutinina	PSA	αMan αGlc		0	0	0		

Resumen

La invención aquí reivindicada presenta azúcares específicos y una lectina, que bloquean la adherencia del *Streptococcus* al epitelio intestinal de tilapias de cultivo. La invención tiene potencial de uso médico e industrial para prevenir estreptococosis en peces, ya que los *Streptococcus* específicos-de peces y asociados-a peces tienen vías metabólicas propias que usan los azúcares aquí descritos y las comparten con otros *Streptococcus* que afectan peces como *S. iniae* y *S. ictaluri*.

Referencias

- Barato P., Martins E.R., Melo-Cristino J., Iregui C.A. & Ramirez M. (2015) Persistence of a single clone of *Streptococcus agalactiae* causing disease in tilapia (*Oreochromis sp*) cultured in Colombia over 8 years. *Journal of Fish Diseases* DOI:10.1111/jfd.12337.
- Baron M.J., Wong S.L., Nybakken K., Carey V.J. & Madoff L.C. (2009) Host Glycosaminoglycan Confers Susceptibility to Bacterial Infection in *Drosophila melanogaster*. *Infection and Immunity* **77**, 860-866.
- Delamare-Deboutteville J., Bowater R., Condon K., Reynolds A., Fisk A., Aviles F. & Barnes A.C. (2014) Infection and pathology in Queensland grouper, *Epinephelus lanceolatus*, (Bloch), caused by exposure to *Streptococcus agalactiae* via different routes. *Journal of Fish Diseases* DOI:10.1111/jfd.12273.
- Delannoy C.M.J., Zadoks R.N., Crusmish M., Rodgers D., Lainson F.A., Ferguson H.W. & Fontaine M.C. (2014) Genomic comparison of virulent and non-virulent *Streptococcus agalactiae* in fish. *Journal of Fish Diseases* DOI:10.1111/jfd.12319.
- Caliot É, Dramsi S, Chapot-Chartier M-P, Courtin P, Kulakauskas S, Péchoux C, Trieu-Cuot P, Mistou M-Y. (2012). Role of the Group B antigen of *Streptococcus agalactiae*: a peptidoglycan-anchored polysaccharide involved in cell wall biogenesis. *PLoS Pathogens*. **8**:e1002756
- Carlin, A.F. Lewis A.L., Varki A. & Nizet V. (2007) Group B Streptococcal Capsular Sialic Acids Interact with Siglecs (Immunoglobulin-Like Lectins) on Human Leukocytes. *Journal of Bacteriology* **189**, 1231-1237.
- Cozens D. & Read R.C. (2012) Anti-adhesion methods as novel therapeutics for bacterial infections. *Expert Review of Anti-infective Therapy* **10** 1-12.
- Eldar A., Bejerano Y. & Bercovier H. (1994) *Streptococcus shiloi* and *Streptococcus difficile*: Two New Streptococcal Species Causing a Meningoencephalitis in fish. *Current Microbiology* **28**, 139-143
- Evans J.J., Klesius P.H. & Shoemaker C.A. (2009) First isolation and characterization of *Lactococcus garvieae* from Brazilian Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), and pintado, *Pseudoplathystoma corruscans* (Spix & Agassiz). *Journal of Fish Diseases* **32**, 943-951
- Henry-Stanley M.J., Hess D.J., Erlandsen S.L., Wells C.L. (2004) Ability of the heparin sulphate proteoglycan syndecan-1 to participate in bacterial translocation across the intestinal epithelial barrier. *Shock* **24**, 571-576
- Hytönen J., Haataja S. & Finne J. (2003) *Streptococcus pyogenes* Glycoprotein-Binding Strepadhesin Activity Is Mediated by a Surface-Associated Carbohydrate-Degrading Enzyme, Pullulanase. *Infection and Immunity* **71**, 784-793
- Imberty A & Varrot A. (2008) Microbial recognition of human cell surface glycoconjugates. *Current Opinion in Structural Biology* **18** 567-576
- Iregui C.A., Comas J., Vásquez G.M. & Verján N. (2015) Experimental early pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* infection in red tilapia *Oreochromis spp*. *Journal of Fish Diseases* DOI:10.1111/jfd.12347
- Iskratsch T., Braun A., Paschinger K., Wilson I.B.H. (2009) Specificity analysis of lectins and antibodies using remodeled glycoproteins. *Analytical Biochemistry* **386**, 133-146
- Karlsson K-A. (1998) Meaning and therapeutic potential of microbial recognition of host glycoconjugates. *Molecular Microbiology* **29**, 1-11

- King S.J., Hippe K.R., Weiser J.N. (2006) Deglycosylation of human glycoconjugates by the sequential activities of exoglycosidases expressed by *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology* **59**, 961-974
- Klesius P.H., Shoemaker, C.A. & Evans J.J. (2008) Streptococcus: A worldwide fish health problem. 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture. Cairo, pp. 83-107.
- Lermo A., Campoy S., Barbé J, Hernández S., Alegret S. & Pividori M.I. (2007) *In situ* DNA amplification with magnetic primers for the electrochemical detection of food pathogens. *Biosensors and Bioelectronics* **22**, 2010-2017.
- Maisey H.C., Doran K.S. & Nizet V. (2008) Recent advances in understanding the molecular basis of group B *Streptococcus* virulence. *Expert reviews in molecular medicine* **10**, e27.
- Natunen J., Miller-Podraza H., Tenebergs S., Angstrom J., Karlsson K-A. (2003) Use of at least one glycoinhibitor substance. Patent WO2003002127.
- Natunen J., Miller-Podraza H., Tenebergs S., Angstrom J., Karlsson K-A. (2004) Use of at least one glycoinhibitor substance. Patent US20040176320.
- Netto L.N., Leal C.A.G. & Figueiredo H.C.P. (2011) *Streptococcus dysgalactiae* as an agent of septicemia in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L). *Journal of Fish Diseases* **34**, 251-254.
- Ogara Y., Seto H., Murakami T., Hoshino Y. & Miura Y. (2013) Affinity Separation of Lectins Using Porous Membranes Immobilized with Glycopolymer Brushes Containing Mannose or *N*-Acetyl-D-Glucosamine. *Membranes* **3**, 169-181.
- Perera R.P., Collins M.D., Johnson S.K. & Lewis D.H. (1994) *Streptococcus iniae* associated with mortality of *Tilapia nilotica* x *T. aurea*. *Journal Aquatic animal Health* **6**, 335-340
- Perera R.P., Johnson S.K., Lewis D.H. (1997) Epizootiological aspects of *Streptococcus iniae* affecting tilapia in Texas. *Aquaculture* **152**, 25-33.
- Sharon N. (2006) Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases. *Biochimica et Biophysica Acta* **1760**, 527-537.
- Wu A.M., Wu J.H., Tsai M-S., Yang Z., Sharon N. & Herp A. (2007) Differential affinities of *Erythrina cristagalli* lectin (ECL) toward monosaccharides and polyvalent mammalian structural units. *Glycoconjugates Journal* **24**, 591-604.

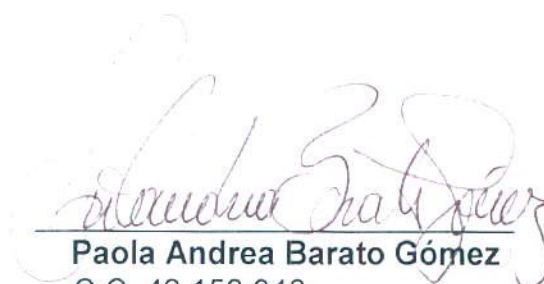
Declaración de Cesión de Derechos de Inventor

Nosotros, los abajo firmantes, **Carlos Arturo Iregui** y **Paola Andrea Barato Gómez**, ciudadanos colombianos domiciliados en la ciudad de Bogotá, por el presente documento declaramos bajo juramento ser los únicos y verdaderos inventores de la invención titulada "**Glicoinhibidores de adherencia de streptococcus en peces**" y que cedemos en plena propiedad y sin reserva ni limitación alguna, todos nuestros derechos sobre la misma a favor de la UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA domiciliada en la Carrera 45 No. 26 – 85, Bogotá, D.C., Colombia, quien podrá solicitar y obtener a su nombre, la respectiva Patente de Invención en los territorios que la Universidad considere pertinentes.

Para constancia firmamos hoy 18 DIC. 2015 en la ciudad de Bogotá, D.C., Colombia.



Carlos Arturo Iregui Castro
C.C. 19.245.919 de Bogotá



Paola Andrea Barato Gómez
C.C. 42.158.346

Acepto:



Diego Fernando Hernández Losada
C.C. 16.267.500 de Palmira (Valle)
Universidad Nacional de Colombia





UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

RECTORIA

RESOLUCIÓN NÚMERO 265 DEL 01 ABR 2013

"Por la cual se comisiona al profesor **DIEGO FERNANDO HERNÁNDEZ LOSADA** en el cargo de Vicerrector de Sede 0160-17 LNR, adscrito a la Vicerrectoría de la Sede Bogotá"

EL RECTOR DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

En uso de sus atribuciones legales y estatutarias, y,

CONSIDERANDO

Que de conformidad con lo establecido en el artículo 6 del Acuerdo N°24 de 2007, expedido por el Consejo Superior Universitario, el docente de carrera se encuentra en comisión interna para el ejercicio de un cargo académico – administrativo cuando haya sido designado por la autoridad competente para desempeñar un cargo académico administrativo o directivo de aquellos establecidos por el Consejo Superior Universitario en una Facultad, Centro o Instituto, en las Sedes, Sedes de Presencia Nacional o en el Nivel Nacional de la Universidad. En el evento en que un docente se encuentre en esta situación, podrá escoger entre la remuneración del cargo o la que le corresponda como docente, o se le podrán asignar las bonificaciones o estímulos que la autoridad competente haya previsto para estos casos.

RESUELVE :

ARTÍCULO PRIMERO.- Comisionar a partir de la fecha de posesión al profesor **DIEGO FERNANDO HERNÁNDEZ LOSADA**, identificado con la cédula de ciudadanía No. 16,267,500 expedida en Palmira en el cargo de Vicerrector de Sede 0160-17 LNR, adscrito a la Vicerrectoría de la Sede Bogotá, con una asignación básica mensual de \$4.965.292 y gastos de representación de \$4.731.634, de conformidad con los considerandos de la presente resolución.

PARÁGRAFO.- El profesor **DIEGO FERNANDO HERNÁNDEZ LOSADA** es titular del cargo Profesor Asociado en dedicación Exclusiva, adscrito al Departamento de Ingeniería de Sistemas e Industrial de la Facultad de Ingeniería de la Sede Bogotá.

ARTÍCULO SEGUNDO.- Remítase copia de la presente resolución a Facultad de Ingeniería de la Sede Bogotá, a la Vicerrectoría de la Sede Bogotá, y a la Dirección Nacional de Talento Humano.

ARTÍCULO TERCERO.- La presente Resolución rige a partir de la fecha de expedición.

COMUNIQUESE Y CÚMPLASE.

Dada en Bogotá D.C.

01 ABR 2013


IGNACIO MANTILLA PRADA
Rector



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Dirección Nacional de Personal

ACTA DE POSESIÓN: 082
FECHA: 1 DE ABRIL DE 2013

EN LA CIUDAD DE BOGOTÁ, D.C., EL DÍA 1 DE ABRIL DE 2013 Y DE CONFORMIDAD CON EL ARTÍCULO 40 DE LA RESOLUCIÓN 040 DE 2001, SE PRESENTÓ A LA RECTORIA, EL PROFESOR DIEGO FERNANDO HERNÁNDEZ LOSADA CON EL OBJETO DE TOMAR POSESIÓN DEL CARGO DE VICERRECTOR DE SEDE 0160-17 LNR ADSCRITO A LA SEDE BOGOTÁ PARA EL CUAL FUE COMISIONADO MEDIANTE RESOLUCIÓN DE RECTORÍA N° 265 DE FECHA 1 DE ABRIL DE 2013, CON UNA ASIGNACIÓN BÁSICA MENSUAL DE \$4.965.292 Y GASTOS DE REPRESENTACIÓN DE \$4.731.634.

PERIODO DE LA COMISIÓN: DESDE EL 1 DE ABRIL DE 2013

EL POSESIONADO PRESENTÓ CÉDULA DE CIUDADANÍA N° 16,267,500 EXPEDIDA EN PALMIRA. ASÍ MISMO JURÓ CUMPLIR CON LA LEY, LOS ESTATUTOS Y REGLAMENTOS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA Y CON LAS FUNCIONES Y DEBERES DEL CARGO.

PARA CONSTANCIA SE FIRMA LA PRESENTE ACTA POR LA DIRECTORA NACIONAL DE PERSONAL Y EL POSESIONADO.

ALBA ESTHER VILLAMIL OCAMPO
Directora Nacional de Talento Humano

Maria B

DIEGO FERNANDO HERNÁNDEZ LOSADA

REPUBLICA DE COLOMBIA
IDENTIFICACION PERSONAL
CEDULA DE CIUDADANIA

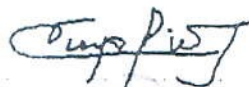
NUMERO **16.267.500**

HERNANDEZ LOSADA

APELLIDOS

DIEGO FERNANDO

NOMBRES


FIRMA



INDICE DERECHO

FECHA DE NACIMIENTO **27-JUN-1961**
PALMIRA
(VALLE)

LUGAR DE NACIMIENTO

1.76

A+

M

ESTATURA

G.S. RH

SEXO

27-JUN-1980 PALMIRA

FECHA Y LUGAR DE EXPEDICION *San José, Costa Rica*
REGISTRADOR NACIONAL
CARLOS ARIEL SANCHEZ TORRES



A-1500150-00371671-M-0016267500-20120429

0029756458A 1

1481821760

Bogotá, D. C. Octubre 16 de 2015

Señores,
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Calle 28 No 13ª-15 Piso 17.

Asunto: Poder para la solicitud y trámite de registro de la patente de Invención "Glicoinhibidores de adherencia de streptococcus en peces".

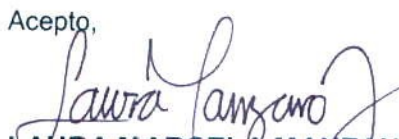
DIEGO FERNANDO HERNÁNDEZ LOSADA, domiciliado en la ciudad de Bogotá identificado con cédula de ciudadanía No. 16.267.500 de Palmira (Valle), actuando como Vicerrector de Sede Bogotá de la **UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA**, con NIT 899.999.063 – 3, competente para la materia en concordancia con el parágrafo del artículo 04 numeral 4, del Manual de Convenios y Contratos adoptado mediante Resolución de Rectoría No. 1551 del 19 de diciembre de 2014 y el artículo 50 del Acuerdo CSU 184 de 2015, por medio del presente documento, confiero poder especial a la Abogada **LAURA MARCELA MANZANO JIMÉNEZ**, identificada con cédula de ciudadanía No. 1.091.666.812 de Ocaña, tarjeta profesional No. 248.536 del C.S.J., con domicilio en la ciudad de Bogotá, para que presente la solicitud de examen de patentabilidad y todo los trámites requeridos para la obtención de la patente de invención titulada: "**Glicoinhibidores de adherencia de streptococcus en peces**".

En consecuencia, la apoderada queda facultada para realizar ante las autoridades administrativas todos los pasos necesarios en cumplimiento del objeto indicado, como son: Elevar solicitudes, descripciones, protestas, declaraciones, reposiciones y apelaciones, presentar observaciones, oposiciones, reclamos, responder observaciones y/o oposiciones y/o cancelaciones; solicitar renovaciones, modificaciones, afectaciones, recibir todos los documentos presentados, solicitar testimonios, enmendar solicitudes, percibir para oponerse y protestar contra cualesquiera solicitudes, que a juicio de la apoderada pudieran prestarse a confusión o infringir o de cualquier modo perjudicar el derecho del mandante. Al mandatario se le otorga autorización para contestar todos los reclamos presentados ante autoridades administrativas.

Atentamente,


DIEGO FERNANDO HERNÁNDEZ LOSADA
Vicerrector de Sede
CC: 16.267.500 de Palmira (Valle)

Acepto,


LAURA MARCELA MANZANO JIMÉNEZ
C.C. 1091666812 de Ocaña, Norte de Santander
T.P. No. 248.536 del C.S.J

Handwritten signature: cayo fu



NOTARIA 62

DILIGENCIA DE PRESENTACION PERSONAL Y RECONOCIMIENTO DE CONTENIDO Y FIRMA

Compareció ante el Notario 62 del Circulo de Bogotá
HERNANDEZ LOSADA DIEGO FERNANDO

quien exhibió C.C. 16267500
Tarjeta Profesional C.S.J

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

Bogotá, D.C. 10/11/2015

iOkOp188i8nik5il

DOCUMENTO CONTROLADO
DORA VELOSA C.C. 52.561.007

IDENTIFICACION Y CONTROL
C.C. 1.023.920.146

yabr

Carlos Arturo Serrano Galeano Notario 62



DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
FORMULARIO DE REDUCCIÓN DE TASAS

1. Identificación del Trámite

☒ **PATENTE DE INVENCION**

☐ **PATENTE DE MODELO DE UTILIDAD**

☐ **Examen de Patentabilidad**

☐ **Tasas de Mantenimiento**

2. BENEFICIARIO

Nombre: Universidad Nacional de Colombia
Dirección: Carrera 45 No. 26-85 – Ed. Uriel Gutiérrez
Teléfono: 3165000 Ext. 18167 – 18204
Nacionalidad o Domicilio: Colombia
Ciudad: Bogotá D.C.

IDENTIFICACIÓN

☐ C.C. ☒ NIT
☐ C.E. ☐ Otro

No. NIT 899999063-3

En caso de ser una persona natural y carecer de medios económicos y por tanto lo aplique la reducción de tasas a la que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.

3. Anexos

Persona Natural ☐

Persona Jurídica ☒

Universidad Nacional de Colombia

Nombre o denominación / Nombre o razón social

Tipo de empresa

Micro ☐

Pequeña ☐

Mediana ☐

Otra ☐

Documento de identificación: C.C. ☐ C.E. ☐ NIT ☒ Otro ☐ Número 899999063-3

Micro, pequeñas y medianas empresas

☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental donde
☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004

Universidades públicas o privadas

☒ Universidad pública

☐ Universidad privada

Copia acta de reconocimiento institucional emitida por el Ministerio de Educación

Entidades sin ánimo de lucro

☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio
☐ Hoja de información complementaria
☐ Otros respaldos

Nacionalidad/País de constitución
Colombia

Dirección y domicilio del titular
Carrera 45 No. 26-85 – Ed. Uriel Gutiérrez – Oficina 515

Dirección electrónica
dirjn_nal@unal.edu.co

No. Fax
3165075

Número telefónico
3165000 Ext. 18167

4. Firma

DOLLY MONTOYA CASTAÑO

Nombre del Firmante

C.C. 41.437.694

Firma

Tarjeta Profesional

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

30



RECIBO DE CAJA

No. 15 - 138492

Bogotá D.C., Diciembre 22 de 2015 - 11:45:12

RECIBIDO DE : UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

NI 899.999.063

RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	117556	28/10/2015	79.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	128471	26/11/2015	34.000.00
RECIBO DE CA	SIC ** RECIBO **	999999999	134471	15/12/2015	1.263.500.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1.50005-01-01 SOLICITUDES	2280 25% TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	397.500.00	397.500.00
			\$397.500.00

SON: **TRESCIENTOS NOVENTA Y SIETE MIL QUINIENTOS PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 15-303921- -00000-0000

Fecha: 2015-12-22 11:59:23 Dep: 2020 DIR NUEVASCR
Tra: 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act: 411 PRESENTACION Folios: 31

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

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

Diciembre 22 de 2015 - 11:45:13



No. 15-303921- -00000-0000

Fecha 2015-12-22 11:59:23 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
 Tra 2 PATENTES Eve 1 REGDEPOSITO
 Act. 411 PRESENTACION Folios 31



LISTA DE CHEQUEO ADMISIÓN A TRÁMITE – NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION ☐MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

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

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

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

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

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

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

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