



Bogotá D.C., 04 de marzo de 2019

Doctor

JOSÉ LUIS SALAZAR

Director de Nuevas Creaciones

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Carrera 13 No. 27-00

Expediente: 15303921

Asunto: Respuesta a requerimiento de fondo relacionada en el oficio No. 14444, de la solicitud de patente de invención a la creación titulada **“GLICINHIBIDORES DE ADHERENCIA DE STREPTOCOCCUS EN PECES”**

Solicitante: Universidad Nacional de Colombia

Respetado Director:

Respuesta a requerimiento

LAURA MARCELA MANZANO JIMÉNEZ, mayor de edad y vecina de la ciudad de Bogotá, identificada tal como aparece al pie de mi firma, en mi carácter de apoderada de la **UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA**, me permito presentar respuesta al requerimiento de fondo, dentro del plazo legal establecido por el Capítulo Quinto del Título I, de la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, y acorde al Código de Procedimiento Administrativo y de lo Contencioso Administrativo, en los siguiente términos:

4. De la solicitud de patente

- Reivindicaciones (Art. 30 D 486, Art. 22 PCT)

La reivindicación 1 no es clara porque presenta errores ortográficos en los nombres de las "sustancias" que comprenden el objeto de la solicitud, cuando se refiere a "Nacetyl galactosamine" y " α -methyl mannoside". Se recuerda que la terminación "-il" en español es con "i" latina; así como lo correcto es escribir "manósido". De la misma forma,

esta reivindicación presenta error de digitación en las unidades de la concentración de GalNac que se expresa como "Mm". Se sugiere hacer las respectivas correcciones.

En el capítulo reivindicatorio se han corregido las palabras sugeridas y las unidades de concentración Mm por mM. El capítulo reivindicatorio corregido se adjunta a esta solicitud (Anexo1).

- Descripción (Art. 28 y 29 D 486)

Para responder la inquietud presentada en los segmentos: *“La descripción no divulga la invención de manera suficiente porque la solicitud reclama una mezcla, caracterizada porque incluye dos de las sustancias del grupo conformado por GalNac, Neu5Ac, MeaMan, ECL; pero ninguna mezcla se encuentra descrita de forma en que la persona normalmente versada en la materia técnica tenga alguna motivación para ejecutarla o reproducirla, sin necesidad de realizar un esfuerzo inventivo que sea superior a sus habilidades ordinarias. Por el contrario, el soporte mostrado en los ejemplos de la descripción sólo enseña la actividad inhibidora de GalNac, Neu5Ac, MeaMan, ECL, por separado y nunca como alguna mezcla (varias moléculas glicoinhibidoras haciendo parte del mismo producto). De tal forma, cabe resaltar que para que la descripción sea suficiente debe demostrar que fueron obtenidas mezclas; donde como mezcla haya un efecto sorprendente en la inhibición de la adherencia de Streptococcus al intestino de peces” y “Al respecto se reitera que, dado que la solicitud reclama una mezcla, es necesario que el solicitante demuestre que ésta tiene un efecto técnico asociado; el cual no puede derivarse de la presunción relacionada al conocimiento de los mecanismos de acción de los compuestos por separado, sino que es necesario que exista una comprobación experimental del efecto técnico de alguna mezcla”* se presenta lo siguiente.

Se aporta como prueba en la respuesta al examen de patentabilidad la siguiente información que corresponde a un experimento realizado.

Con el objetivo de evaluar *in vivo* la eficiencia de la mezcla de la lectina ECL y el azúcar NeuAc en la presentación clínica de la infección por *Streptococcus agalactiae* (GBS), así como en la inducción de lesiones granulomatosas en tilapia, se desarrolló el experimento de exposición a la infección y tratamiento previo o posterior a la infección con la mezcla de ECL y/o NeuAc (dosis de acuerdo con lo descrito en la invención para completar un volumen máximo de 100 ul en cada pez), así como su efecto por separado.

Larvas de tilapia roja (*Oreochromis* sp.) se recibieron en el área de cría del bioterio de Corpavet para ser alimentadas hasta alcanzar el peso de 30g (periodo de cría 4 meses). Los animales fueron evaluados mensualmente por histopatología, aislamiento bacteriológico y análisis molecular (para GBS, *E. tarda*, *E. anguillarum*) para certificar su estado sanitario óptimo y libre de infección por GBS antes del inicio del experimento. Noventa y nueve (99) peces entre 25 a 30 g se ubicaron en acuarios de 20 litros, ubicando un número de 7 a 11 peces en cada uno de los acuarios para organizar los cinco (5) grupos experimentales descritos en la tabla 1. La temperatura del agua se mantuvo durante los 8 días experimentales a 30° C. Cuarenta y ocho (48) horas antes del inicio del experimento los animales estuvieron en ayuno. El diseño experimental y los resultados de la mortalidad se presentan en la tabla 1.

GRUPO EXPERIMENTAL	16/09/2018	No. peces por ensayo 2 acuarios por ensayo	17/09/2018	18/09/2018		19/09/2018	20/09/2018	21/09/2018	22/09/2018	23/09/2018	24/09/2018	MORTALIDAD TOTAL ACUMULADA/ TOTAL INOCULADOS	
	INOCULACIÓN		DÍA 1 PI	DÍA 2 PI	Observaciones	DÍA 3 PI	DÍA 4 PI	DÍA 5 PI	DÍA 6 PI	DÍA 7	DÍA 8		
A CONTROL NEGATIVO	PBS (n=7)	15	0	0		0	0	0	0	0	0	0/15	0%
B ECL/GBS/ NeuAc	GBS (n=11) 40min después de ECL	21	0	0	Aplicación NeuAc	0	0	0	0	0	0	0/21	0%
C NeuAc/ GBS/ECL	GBS (n=11) 40min después de NeuAc	22	1	0	Aplicación ECL	0	2	0	1	2	1	6/22	27%
D ECL+NeuAc/ GBS	GBS (n=11) 40min después de ECL+NeuAc	21	0	0		0	0	0	0	0	0	0/21	0%
E CONTROL POSITIVO	GBS (n=10)	20	1	0		0	0	0	1	1	0	3/20	15%

Tabla 1. Diseño experimental y resultados de la mortalidad de la infección por *Streptococcus agalactiae* 108 UFC/ml) vía intragástrica en tilapia (*Oreochromis sp.*)

A los grupos experimentales B y C se les aplicó vía gástrica inicialmente la lectina ECL (Grupo B) o el azúcar NeuAc (Grupo C) 40 minutos antes de la inoculación intragástrica de *S. agalactiae* y 48 horas después se aplicó el azúcar NeuAc (Grupo B) o la lectina ECL (Grupo C). Al grupo D se le aplicó la mezcla de ECL + NeuAc 40 minutos antes de la inoculación intragástrica de GBS. Los grupos A y E corresponden a los controles negativo y positivo, respectivamente (Tabla 1 y Fig. 1).

El grupo C (NeuAc + GBS + ECL) y el grupo E (Control positivo) tuvieron mortalidad del 27% y 15% respectivamente. Los demás grupos no presentaron mortalidad.

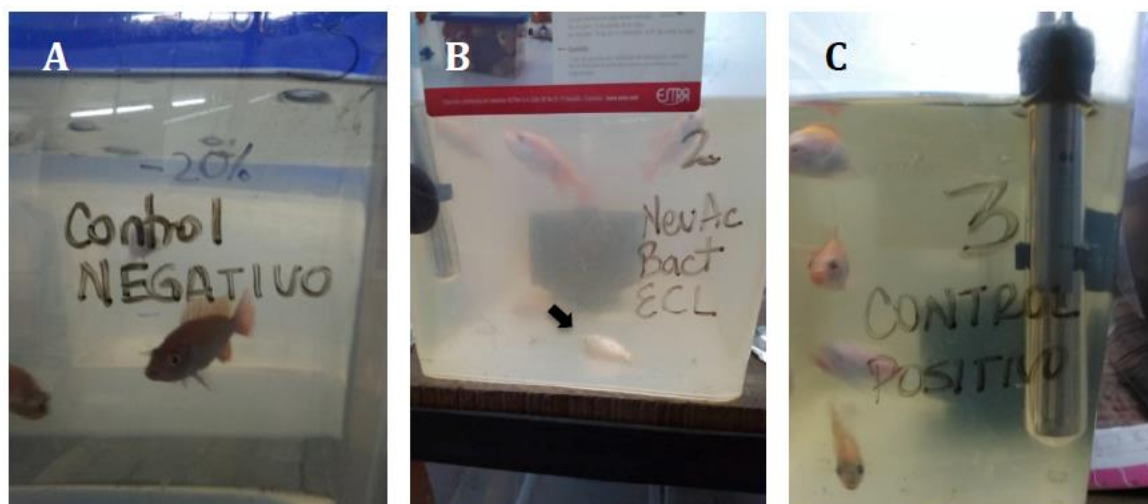


Figura 1. Acuarios experimentales. A. Grupo A control negativo, B. Grupo C NeuAc + GBS + ECL, se observa la mortalidad en el fondo del acuario (flecha). C. Grupo E, control positivo.

En el momento de la mortalidad y al final del periodo de experimental de cada grupo se tomaron muestras de encéfalo, ojo, branquias, corazón, hígado, bazo, riñón, estómago e intestino de todos los peces. Se hizo pool de muestras por grupo y se presentan los resultados en la tabla 2 y en la figura 2.

GRUPO EXPERIMENTAL	HALLAZGOS HISTOPATOLÓGICOS	DIAGNÓSTICO
A CONTROL NEGATIVO	Branquitis linfocítica moderada generalizada (Fig. 2A) Activación leve de centros melanomacrófagos en bazo Los demás órganos sin cambios relevantes	Animales en condición sanitaria aceptable
B ECL/GBS/ NeuAc	Abundante acúmulo de moco y algas en la luz intestinal y gástrica (Fig. 2B) En bazo moderada activación de centros melanomacrófagos (Fig. 2C) Los demás órganos sin cambios relevantes	Animales en condición sanitaria aceptable
C NeuAc/ GBS/ECL	Esplenitis granulomatosa moderada multifocal (Fig. 2D) Branquitis linfocítica moderada generalizada Mineralización moderada y multifocal de la luz tubular renal Los demás órganos sin cambios relevantes	Infección esplénica granulomatosa, Estreptococosis
D ECL+NeuAc/GBS	Moderado acúmulo de moco y algas en la luz gástrica (Fig. 2E) Moderada activación de centros melanomacrófagos en bazo Los demás órganos sin cambios relevantes	Animales en condición sanitaria aceptable
E CONTROL POSITIVO	Coroiditis, meningoencefalitis y esplenitis granulomatosa moderada (Fig. 2F)	Estreptococosis sistémica

Tabla 2.Evaluación histopatológica de tilapias inoculadas vía intragástrica con *S. agalactiae* (GBS) y tratadas con ECL y/o NeuAc

El control negativo (Grupo A) se comportó como tal, sin presentar lesiones relevantes en los tejidos ni mortalidad en el desafío in vivo por el procedimiento de inoculación intragástrica con PBS. Los hallazgos histopatológicos en este grupo (Grupo A) de branquitis linfocítica y leve activación en centros melanomacrófagos (CMM) corresponden con las condiciones naturales de la especie en el ambiente acuático al que fueron expuestos (Fig. 2A).

El control positivo (Grupo E) se comportó de acuerdo con la infección inducida, es decir con lesiones la inoculación intragástrica de *Streptococcus agalactiae*. Se observó inflamación granulomatosa en múltiples órganos (encéfalo, plejo corioideo y bazo), así como la mortalidad del 15% de los peces inoculados (Fig. 2F).

Los grupos B y D en los que se suministró vía intragástrica la lectina ECL (*Erythrina crista-galli*) sola (Grupo B) o en mezcla con NeuAc (Grupo D) antes de la infección con GBS y en el grupo B con la posterior aplicación de NeuAc a las 48 horas postinfección, no presentaron mortalidad en los 8 días de evaluación experimental.

Adicionalmente, histopatológicamente no se observaron lesiones compatibles con infección por GBS (Fig. 2B, 2C y 2E). Llama la atención la abundante presencia de moco en la luz intestinal, que podría estar relacionada, entre otras causas, con el mecanismo innato de barrera para evitar el ingreso del microorganismo.

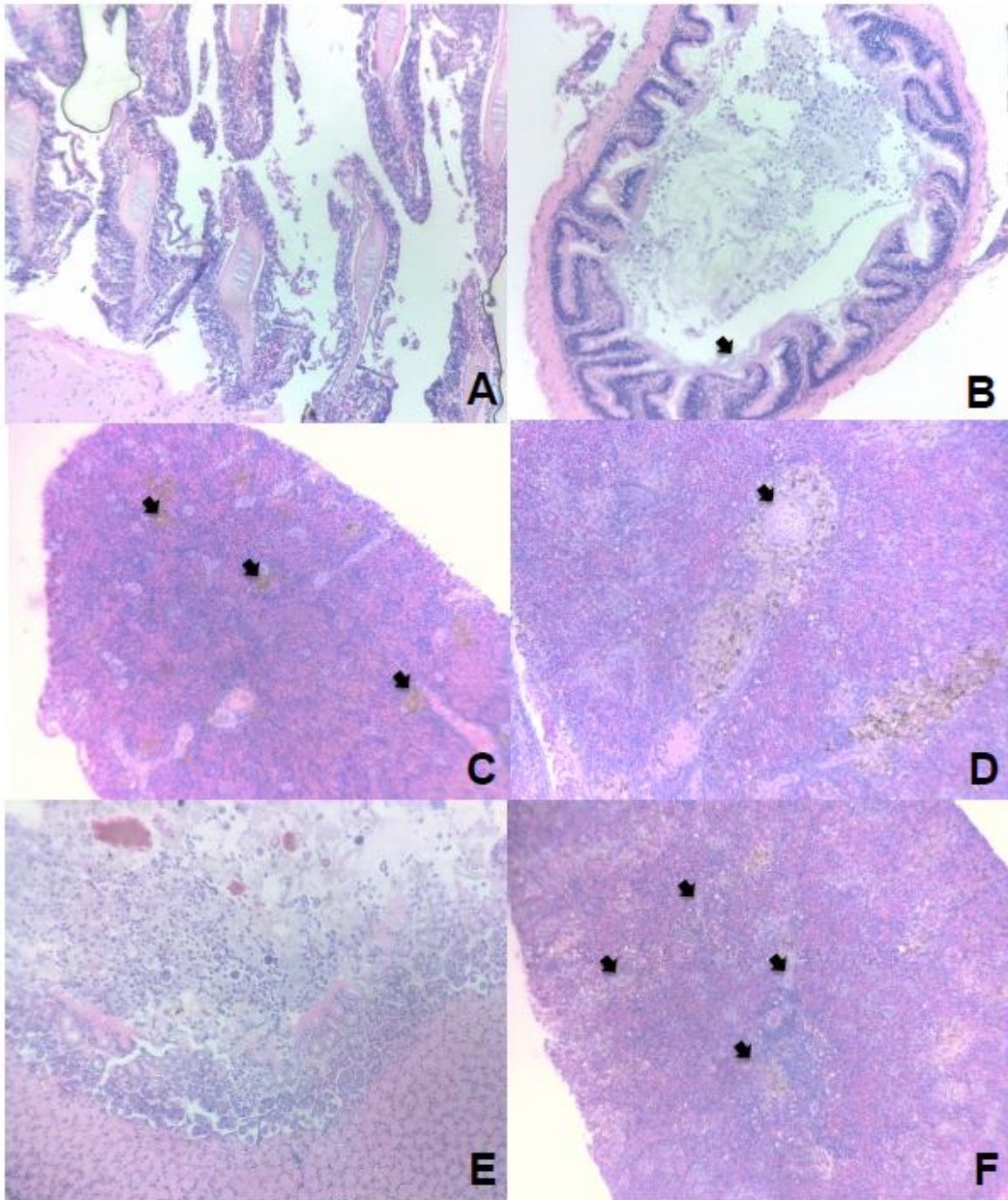


Figura 2. Tilapia, H&E. A. Grupo A, branquias, branquitis linfocítica moderada generalizada. B. Grupo B, intestino, abundante moco y algas en la luz intestinal, moco adherido a la superficie apical del epitelio intestinal (flecha). C. Grupo B, bazo, leve activación de CMM (flechas). D. Grupo C, bazo, esplenitis granulomatosa (flecha) moderada con infiltrado de CMM. E. Grupo D, estómago, abundante acumulo de moco y algas en la luz gástrica. F. Grupo E, bazo, esplenitis granulomatosa (flechas) moderada multifocal con leve depleción linfoide.

Finalmente, el grupo C que correspondió al suministro vía intragástrica del azúcar NeuAc antes de la inoculación experimental con GBS y 48 horas después el suministro de ECL presentó una mortalidad del 27%. En este grupo se observaron lesiones

granulomatosas en el bazo que sugieren la infección por *Streptococcus agalactiae* (Fig. 2D), por lo que el tratamiento no fue eficiente para evitar el ingreso de la bacteria y por lo tanto se desarrolló la enfermedad.

Conclusiones:

La eficiencia de la mezcla ECL y NeuAc, así como del suministro de ECL antes de la infección con posterior uso de NeuAc para evitar el ingreso de *Streptococcus agalactiae* en tilapia fue demostrada al controlar la presentación de signos clínicos y mortalidad, así como también para evitar el desarrollo de lesiones granulomatosas que son la característica morfológica de la estreptococosis en tilapia (Tabla 2, Fig. 2).

El mecanismo descrito para ECL en la presente invención explicaría la eficiencia de su efecto, ya que actúa directamente en la superficie epitelial intestinal para cubrir los lugares de adherencia de la bacteria al pez, antes de su ingreso. El uso en mezcla con NeuAc mejora su efecto, ya que el mecanismo de este azúcar se da sobre la bacteria, favoreciendo su aglutinación en la luz intestinal aumentando la eficiencia del mecanismo de inhibición de adherencia al hospedero.

La ineficiencia de NeuAc para controlar la infección por GBS (Grupo C) reafirma la importancia de la mezcla con ECL antes de la infección con *Streptococcus agalactiae* para inhibir la adherencia bacteriana y posterior desarrollo de enfermedad.

Se concluye que el uso combinado de ECL y NeuAc es eficiente para evitar la infección con *Streptococcus agalactiae* en tilapia y es por esta razón que se decide cambiar el preámbulo de la reivindicación independiente para hacer énfasis que el uso conjunto de las sustancias puede ser reivindicado como un kit de partes, que de acuerdo al documento guía de examen de patentes “El kit de partes es una modalidad de las invenciones por combinación en la que se reúnen elementos conocidos que aunque se conocen de forma individual a partir de preparaciones independientes, al combinarse pueden llegar a ser o convertirse en una nueva solución técnica a un problema técnico”.

Con respecto a la mención relacionada con los documentos más cercanos en el estado de la técnica:

Cabe mencionar que los documentos WO03002127 y “Differential affinities of Erythrina cristagalli lectin (ECL) toward monosaccharides and polyvalent mammalian structural units” divulgan la materia reclamada en la presente solicitud. De tal forma, el documento WO03002127 pretende proteger glicoinhibidores seleccionados del grupo comprendido por GlcNAc β , GalNAc β , Gal β , Gal α , GalNAc α , Fuca, Man α y Neu5Ac α (Reivindicación 1); en cuanto que el documento de Wu, A M et al. Estudia la adhesión de ECL a ligandos y glicanos. (Resumen).

Para dar respuesta a la aseveración anterior, se reitera que el experimento realizado y adjunto como soporte a esta respuesta, presenta efectivamente un efecto sorprendente del uso en conjunto de las sustancias sobre el uso de las sustancias por separado. Como se explica en el descriptivo, los mecanismos de acción de las diferentes sustancias son complementarios, donde la lectina (ECL) actúa sobre el intestino del pez, mientras que el mecanismo con los azúcares Neu5Ac, Me α Man y GalNAc actúan sobre la bacteria. Sus mecanismos son diferentes y por ello no interfieren entre sí, confiriendo a su uso en conjunto la posibilidad de ser reivindicados.

La invención con la información remitida con este documento describe el efecto eficiente en la inhibición de la mortalidad, enfermedad y lesiones histopatológicas generadas por la inoculación de *Streptococcus agalactiae*, demostrando que el uso en conjunto de ECL+NeuAc (Grupo D) es eficiente para evitar la infección por GBS en tilapia. Este tipo de conjunto no ha sido descrito ni para peces, ni para ninguna otra especie animal para evitar la infección por GBS.

Con respecto al segmento: “Se aclara que no es así porque el documento WO030021271 divulga que moléculas como como GalNAc α , Neu5Ac α , Man α , entre otras (pág 5, líneas 6 a 10) son glicoinhibidores porque inhiben la adhesión de patógenos (pág. 5, línea 1 a 3). Indica que dentro de los patógenos que se adhieren a tejidos y células animales mencionados en este documento está *Streptococcus* (pág. 2, líneas 15 a 17); respecto al que el documento cita que éste se une a receptores del epitelio de animales que pueden ser sacáridos como GlcNAc β 3Gal β , Gal β 3GlcNAc, Gal β 3/4GlcNAc β 3Gal β 4Glc y Gal β 4Glc β (Pág. 2, líneas 15 a 17). Siendo que dichas estructuras de sacáridos se encuentran también en receptores naturales de células animales, para *Helicobacter pylori*, como GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc, GalNAc β 3Gal β 4GlcNAc, GalNAc α 3Gal β 4GlcNAc, entre otros. De tal forma, es esperado que los sacáridos divulgados en este documento como glicoinhibidores, que comprende GlcNAc, GalNAc, Neu5Ac, entre otros; sean asumidos como inhibidores de la adhesión de microorganismos como *H. pylori* o *Streptococcus* a células y tejidos animales. Cabe resaltar que los usos no son patentables, por lo que implementar en peces los glicoinhibidores divulgados en este documento, no es susceptible de ser patentado.

Se aclara de acuerdo con el examen, que las adhesinas glicosílicas y proteicas en los microorganismos varían entre las especies animales infectadas (peces, humanos, bovinos) y entre los mismos patógenos (no son los mismos para *H. pylori* o *S. agalactiae*, e incluso varían entre *S. agalactiae* que infecta peces y humanos). En el caso de la diferencia en las adhesinas del *Streptococcus agalactiae* entre especies animales (peces, humanos y bovinos) se reporta en la literatura científica la ausencia en el microorganismo que infecta los peces de proteínas de superficie usadas como adhesinas por este microorganismos en humanos, así que los mecanismos de adhesión son diferentes y no se puede asumir iguales solo por ser el mismo microorganismo (Godoy et al., 2013).

Agradezco de antemano la atención prestada y la atenta colaboración en las gestiones requeridas.

Cordialmente,

LAURA MARCELA MANZANO

Abogada

C.C. No. 1.091.666.812

TP 248.536

Universidad Nacional de Colombia

Anexo 1: Capítulo reivindicatorio corregido.

Reivindicaciones

Se reclama:

1. Un kit-de-partes suplementario de sustancias que inhiben la adherencia de la bacteria *Streptococcus* que afecta el tracto digestivo de los peces CARACTERIZADO PORQUE incluye dos de las sustancias del grupo conformado por:
 - N*-acetilgalactosamina (GalNAc) (10-12mM),
 - ácido siálico (Neu5Ac) (5-9mM),
 - α -metil manósido (Me α Man) (12-14mM),
 - Lectina *Erythrina crista-galli* (ECL) (10 – 20 μ g/ml)
2. El kit suplementario que inhibe la adherencia de *Streptococcus* en peces de la reivindicación 1 CARACTERIZADA PORQUE está comprendida por GalNAc (10-12mM) y Neu5Ac (5-9mM).
3. El kit suplementario que inhibe la adherencia de *Streptococcus* en peces de la reivindicación 1 CARACTERIZADA PORQUE está comprendida por GalNAc (10-12mM) y Me α Man (12-14mM).
4. El kit suplementario que inhibe la adherencia de *Streptococcus* en peces de la reivindicación 1 CARACTERIZADA PORQUE está comprendida por Neu5Ac (5-9mM) y Me α Man (12-14mM).
5. El kit suplementario que inhibe la adherencia de *Streptococcus* en peces de la reivindicación 1 CARACTERIZADA PORQUE está comprendida por Me α Man (12-14mM) y ECL (10 – 20 μ g/ml).
6. El kit suplementario que inhibe la adherencia de *Streptococcus* en peces de la reivindicación 1 CARACTERIZADA PORQUE está comprendida por GalNAc (10 - 12mM), Neu5Ac (5 - 9mM) y Me α Man (12 - 14mM).
7. El kit suplementario que inhibe la adherencia de *Streptococcus* en peces de la reivindicación 1 CARACTERIZADA PORQUE está comprendida por Neu5Ac (5 - 9mM), Me α Man (12 - 14mM) y ECL (10 – 20 μ g/ml).
8. El kit suplementario que inhibe la adherencia de *Streptococcus* en peces de la reivindicación 1 CARACTERIZADA PORQUE está comprendida por GalNAc (10-12mM) y ECL (10 – 20 μ g/ml).