

Bogotá, 18 de noviembre de 2020.

Señora Directora

EDNA MARCELA RAMIREZ OROZCO
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

Referencia: Expediente No. NC2020/0013930

Asunto: Solicitud de patente para

COMPOSICIÓN VIRICIDA Y BACTERICIDA

1. Yo, MARIO ANDRÉS ORTEGA MENDOZA, obrando como apoderado en el asunto antes identificado, me refiero al oficio No. 13907 del 17 de noviembre de 2020.
2. Mediante Oficio No. 13907 del 17 de noviembre de 2020 se puso en conocimiento del solicitante el informe que contiene las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente. Las observaciones se refieren a:

"1. Capítulo descriptivo

Revisada la solicitud se evidencia que no contiene una descripción de conformidad con lo establecido en el literal c) del artículo 33 de la Decisión 486 de 2000 de la Comisión de la Comunidad Andina, por consiguiente es necesario que allegue un capítulo descriptivo de acuerdo con las siguientes recomendaciones:

La descripción de la invención debe ser clara y completa, de manera tal que una persona versada en la materia pueda ejecutarla. Así mismo, deberá indicar:

- a)** el sector tecnológico al que se refiere o se aplica la invención;
- b)** la tecnología anterior conocida por el solicitante que fuese útil para la comprensión y el examen de la invención y las referencias a los documentos y publicaciones anteriores relativas a dicha tecnología.
- c)** incluye una descripción de la invención en términos que permitan la comprensión del problema técnico y de la solución aportada por la invención, exponiendo las diferencias y eventuales ventajas con respecto a la tecnología anterior,
- d)** menciona una reseña sobre los dibujos (si es el caso) utilizando el sistema Internacional de unidades SI
- e)** menciona una descripción de la mejor manera conocida por el solicitante para llevar a la práctica la invención, utilizando ejemplos y referencias a los dibujos, de ser estos pertinentes,
- f)** indica la manera en que la invención satisface la condición de ser susceptible de aplicación industrial, si ello no fuese evidente de la descripción o de la naturaleza de la invención.

Para tener mayor claridad sobre cómo se debe redactar el capítulo descriptivo y cómo se deben presentar los dibujos correspondientes, se debe prestar especial atención al anexo del presente documento, donde se han incluido unas recomendaciones de carácter informativo para facilitar dicho proceso".

3. Como respuesta a los requerimientos hechos, se hacen las siguientes aclaraciones:

El capítulo descriptivo de la solicitud de patente COMPOSICIÓN VIRICIDA Y BACTERICIDA de radicado No. NC2020/0013930, fue anexado a la solicitud de registro, el pasado 08 de noviembre de 2020. Sin embargo, por problemas técnicos con la plataforma SIPI no se incorporó dentro del expediente.

Por tal motivo, se incluye nuevamente como anexo dentro del presente documento.

Puesto que se ha dado respuesta a todas las objeciones formuladas por este Despacho, se solicita atentamente proceder con el trámite de registro de la presente patente de invención nacional.

Cordialmente,



MARIO ANDRÉS ORTEGA MENDOZA
T.P. 115 226
CC. 13540378

ANEXO

COMPOSICIÓN VIRICIDA Y BACTERICIDA

Sector tecnológico

La presente solicitud de patente se refiere a una composición para el tratamiento de infecciones de origen bacterial o viral. Más específicamente, se refiere a una composición donde sus componentes principales pueden extraerse de plantas ampliamente conocidas en todo el mundo.

Tecnología anterior

Debido a la creciente incidencia de infecciones bacterianas y virales – especialmente de cepas patógenas resistentes a los medicamentos disponibles— son necesarias composiciones terapéuticas, nuevas o mejoradas. Además, debe tenerse en cuenta que existe un amplio patrimonio de plantas medicinales que han permitido el desarrollo de nuevos nutraceuticos en el tratamiento de trastornos metabólicos e infecciosos. Dentro de las sustancias biosintetizadas por las plantas se encuentran los aceites esenciales que son líquidos de naturaleza aceitosa, volátil y aromática, obtenidos especialmente de hojas y flores (Cfr. Stashenko, 2018). Las fracciones liquidas volátiles, son generalmente destilables por arrastre con vapor de agua (Martínez, 1996), y son conocidas por sus propiedades antioxidantes, antibacterianas, antifúngicas, insecticidas y antivirales (Agudelo et al., 2010; Cutillas et al., 2018; Tariq et al., 2019).

Los aceites esenciales presentes en las plantas aromáticas desde tiempos ancestrales han sido fuente importante de la etno-farmacología propia de las diferentes culturas en el mundo. Poseen componentes químicos como los terpenos, aromáticos y terpenoides (Cfr. Bakkali, Averbek, Averbek & Waomar 2008) que pueden ser empleados en tratamientos viricidas o bactericidas. Por ejemplo, los terpenoides pueden desplazarse fácilmente a través de las membranas celulares— debido a su bajo peso molecular— para estimular diferentes actividades biológicas, funcionando como antioxidantes naturales y conservantes (Cfr. Adegoke et al., 1998).

En la actualidad, la industria avícola –que presenta un acelerado crecimiento debido al avance en diferentes componentes como la genética y la nutrición– se ve afectada por diferentes agentes virales. Particularmente se encuentra «la enfermedad de Newcastle» causada por un *paramixovirus* tipo 1 –de la familia *Paramixoviridae* (OIE, 2008)— el cual es capaz de infectar gran diversidad de especies de aves, generando afecciones de variada gravedad que incluyen infecciones respiratorias, digestivas y nerviosas dependiendo del hospedador y la cepa (Alexander, 1986). También se encuentra la bronquitis infecciosa que es producida por un virus envuelto del género *Coronavirus* –de la familia *Coronaviridae*— cuya principal vía de infección es aerógena; no obstante, se puede propagar por contacto directo o por medio de fómites, generando infecciones respiratorias además de tener la capacidad de afectar la calidad del huevo en gallinas ponedoras (OIE, 2008).

En relación con lo anterior, en la actualidad se conocen propiedades antibacterianas, antifúngicas y antivirales de algunos aceites esenciales y sus componentes, especialmente proporcionadas por su composición química, siendo creciente su utilización en diversas industrias como la farmacéutica, alimentos y productos de aseo. Por ejemplo, se ha demostrado la capacidad antiviral que poseen algunos aceites esenciales en el caso de la influenza aviar, virus que fue inhibido por extractos de *Echinacea purpurea* (Wu et al., 2010). Existen reportes del uso etnofarmacéutico y etnomédico de *Lippia origanoides* (Oliveira, Leitao, Fernandes, & Leitao, 2014), *Lippia alba* (Henebelle, Sahpaz, Joseph, & Bailleul, 2008), *Rosmarinus officinalis* (Horváth & Ács, 2014) y *Eucaliptus globulus* en el tratamiento de tos, bronquitis, dolor de garganta y dolencias respiratorias en general. También se conocen estudios relacionados con el romero (*R. officinalis*) y diferentes especies de *Lippia*, como agentes viricidas para las enfermedades de Newcastle y Bronquitis infecciosa. Se ha establecido que los compuestos volátiles presentes en la mezcla de aceites esenciales tienen su blanco en la pared celular (en el caso de bacterias Gram +) y membrana alterando la producción de ATP y la homeostasis y también en el transcriptoma, proteoma y el sistema *quorum sensing* (Henebelle, Sahpaz, Joseph, & Bailleul, 2008). También se ha descubierto que ciertos componentes (*carvacrol*, *1-8 cineole*) de los aceites esenciales interactúan con canales iónicos localizados en las vías aéreas (receptores de potencial

transitorio, o TRP por sus siglas en inglés), asociados a la aparición y mantenimiento de enfermedades respiratorias en humanos, por lo que podrían considerarse candidatos a blanco para modular la reacción inflamatoria.

Por otro lado, el llamado COVID-19 ha sido la noticia central del 2020. Sin embargo, y como lo señala Elizabeth Doughman —citando a Mark Jackwood, jefe de departamento y profesor en el Departamento de Salud de la Población, Centro de Investigación y Diagnóstico Avícola de la Universidad de Georgia— la industria avícola está muy familiarizada con otro coronavirus llamado «bronquitis infecciosa». La «bronquitis infecciosa» es causada por una cepa que ha generado pérdidas generalizadas a nivel mundial en las aves de corral. Los coronavirus son el virus de ARN monocatenario más grande que se conocen. Tienen picos en el exterior que son importantes para la forma en que dicho virus produce la enfermedad. La proteína de pico permite que estos virus se unan a los receptores de la célula huésped. Sin embargo, no todos los coronavirus utilizan el mismo receptor de la célula huésped. COVID-19 y SARS utilizan el receptor ACE2. La «bronquitis infecciosa» utiliza el receptor de ácido siálico. Aunque los coronavirus se pueden encontrar en numerosas especies, el virus es muy específico del huésped. Varios estudios han demostrado que es muy poco probable que las aves de corral y el ganado puedan infectarse con COVID-19. Sin embargo, cuando los animales tienen receptores similares, pueden infectarse con la enfermedad. Por ejemplo, los murciélagos, visones y hurones pueden infectarse con COVID-19.

Dentro de las plantas empleadas para tratamientos bactericidas y viricidas, la *Lippia* —género que pertenece a la familia de las *verbenáceas* y contiene aproximadamente 200 especies de arbustos tropicales que se encuentran en todo el mundo (cfr. <https://plantasyflores.pro/lippia-alba/> consultada el 15 de octubre de 2020)— es una de las más empleadas con una gran diversidad de aceites esenciales, que varían según la especie, y que incluyen estragol, carvacrol, Linalol o limoneno. Una especie en particular, la *Lippia Alba* —originaria de Brasil y partes de los Estados Unidos, incluidas muchas partes de California; además, se encuentra en Estados Unidos, México, el Caribe, América Central, América del Sur, Australia e India—, es usada con propósitos terapéuticos y medicinales por sus características anatómicas, calmantes, antidepresivas y sedantes. Un té hecho de las hojas es un remedio doméstico favorito en América Central para los trastornos

intestinales y respiratorios, incluida la gripe. Utilizadas externamente, las hojas aromáticas se utilizan en baños de hierbas, para curar fiebres y dolor de estómago intenso, y para limpiar la vejiga. Diferentes estudios en la literatura han mostrado como este tipo de plantas puede tener efectos viricidas y/o bactericidas.

En el mismo sentido *Rosmarinus* es un exiguo género de plantas herbáceas ramificadas, aromáticas y perennes nativo de la región del Mediterráneo, perteneciente a la familia *Lamiaceae* (Cfr. <https://es.wikipedia.org/wiki/Rosmarinus> consultada el 15 de octubre de 2020). Algunas de sus partes tienen propiedades bactericidas, fungicidas y viricidas (<https://core.ac.uk/download/pdf/80862006.pdf> consultado el 15 de octubre de 2020).

Así se puede encontrar documentos que listan propiedades benéficas de las plantas ya citadas, tales como:

- WO2015124542 (Fungicidal compositions of pyrazolecarboxylic acid alkoxyamides)
- EP1702675 (Continuous multi-microencapsulation process for improving the stability and storage life of biologically active ingredients)
- US6197305B1 (Anti-fungal compositions with prolonged activity)
- WO0115680A1 (Composition for treatment of infections of humans and animals)
- WO2015063240A1 (Exopolysaccharide for the treatment and/or care of the skin, culture media and compositions thereof)
- US2011064778A1 (Continuous multi-microencapsulation process for improving the stability and storage life of biologically active ingredients)
- US2008311234A1 (Oil-in-Water Emulsified Composition, and External Preparation for Skin and Cosmetics Using the Composition)
- US2008038298 (Medicament and System for the Percutaneous Preparation of Medicaments)
- CN102065699A (Lipid-containing compositions and methods of use thereof)
- US2015282491A1 (Package for plant antimicrobial treatment)
- US2003176364A1 (Antimicrobial therapeutic compositions and methods of use)

Sin embargo, existe la necesidad de establecer composiciones específicas que tengan óptimas propiedades viricidas y bactericidas y que tengan efectos demostrables tanto en algunos animales (como las aves) como en el ser humano.

Descripción detallada de la invención

La presente invención presenta una novedosa composición, donde sus componentes preferiblemente son extraídos de plantas, particularmente del género *Lippia* y del género *Rosmarinus*. Más particularmente la composición tiene los siguientes componentes con sus respectivos porcentajes:

- 1,8-Cineol entre 6.20 – 7.00%
- Alcanfor entre 3.60 – 4.10%
- Geranial (isómero z) entre 2.80 – 3.80%
- β - Pineno entre 2.40 – 2.70%
- Timol entre 2.10 – 2.70%
- Carvacrol entre 1.90 – 2.50%
- α-Pineno entre 1.80 - 2.20%
- Óxido de Cariofileno entre 1.25 – 1.55%
- p-Cimeneno entre 1.20 – 1.30%
- Carvacrol entre 1.10 – 1.30%

Más aún, la composición puede contener trazas de:

- γ-Terpineno entre 0.90 – 1.20%
- α- Terpineno entre 0.70 – 0.90%
- α-Humuleno entre 0.70 – 0.90%
- Trans-β-Cariofileno entre 0.45 – 0.70%
- α-Terpineol entre 0.45 – 0.60%
- γ -Terpineno entre 0.40 – 0.60%
- p - Cimeno entre 0.40 – 0.60%
- Geraniol entre 0.40 – 0.60%
- 6-metil-5-hepten-2-ona entre 0.10 – 0.20%
- Limoneno entre 0.10 – 0.20%
- Trans-Bisaboleno entre 0.10 – 0.20%
- Nerol entre 0.10 – 0.20%
- β -Mirceno entre 0.05 – 0.10%

- Linalol entre 0.05 – 0.09%
- Dietilfenol entre 0.002 – 0.006 %

Los excipientes se emplean para llegar al 100% de la composición. Dentro de los excipientes empleados se encuentra aceite –particularmente aceite de girasol—, polisorbato y agua.

Basado en los estudios de Oliveira, Leitao, Fernandes, & Leitao (2014), los de Henebelle, Sahpaz, Joseph, & Bailleul, (2008) y Horváth & Ács, (2014), se desarrolló una formulación específica para tratar las enfermedades de Newcastle y Bronquitis infecciosa. El efecto antibacteriano resultó relevante como coadyuvante en la prevención de la aparición de coinfecciones bacterianas.

Formas de llevar a cabo la invención

Se llevó a cabo una composición como la que se reivindica con los siguientes porcentajes

- 1,8-Cineol 6.70%
- Alcanfor 3.90%
- Geranial (isómero z) 3.30%
- β – Pineno 2.50%
- Timol 2.40%
- Carvacrol 2.25%
- α -Pineno 2.00%
- Óxido de Cariofileno 1.35%
- *p*-Cimeneno 1.25%
- Carvacrol 1.20%
- γ -Terpineno 1.00%
- α -Humuleno 0.82%
- α - Terpineno 0.77%
- Trans- β -Cariofileno 0.55%
- α -Terpineol 0.52%
- Geraniol 0.50%
- γ -Terpineno 0.48%
- *p* - Cimeneno 0.48%

- 6-metil-5-hepten-2-ona 0.16%
- Limoneno 0.15%
- Trans-Bisaboleno 0.13%
- Nerol 0.12%
- Linalol 0.07%
- β -Mirceno 0.05%
- Dietilfenol 0.005%
- Excipientes c.s.p. 100

La actividad bactericida de la composición frente a bacterias Gram (+) se presenta en las siguientes tablas.

MICROORGANISMOS UTILIZADOS				Recuento viable (UFC/mL)		
Microorganismo		Concentración inicial		Suspensión bacteriana	Control de toxicidad del neutralizante	Control dilución-neutralización
		UFC/mL	Log			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15442	1,7E+08	8,2	1,8E+03	7,3E+02	7,1E+02
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 8538	1,5E+08	8,2	1,7E+03	7,1E+02	7,2E+02
<i>Salmonella choleraesuis</i>	ATCC 10708	1,6E+08	8,2	1,9E+03	7,2E+02	7,3E+02
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	1,8E+08	8,3	1,5E+03	7,1E+02	7,2E+02

RESULTADOS DE LA PRUEBA. TIEMPO EVALUADO 5 Minutos

Microorganismos de prueba	Recuento viable		Reducción de la viabilidad		Interpretación
	(UFC / mL)	Log	(UFC / mL)	Log	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5,0E+01	1,7	3,4E+05	5,5	REDUCCIÓN
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,5E+02	2,2	1,0E+05	5,0	REDUCCIÓN
<i>Salmonella choleraesuis</i>	1,5E+02	2,2	1,1E+05	5,0	REDUCCIÓN
<i>Escherichia coli</i>	1,5E+02	2,2	1,2E+05	5,1	REDUCCIÓN

RESULTADOS DE LA PRUEBA. TIEMPO EVALUADO 10 Minutos

Microorganismos de prueba	Recuento viable		Reducción de la viabilidad		Interpretación
	(UFC / mL)	Log	(UFC / mL)	Log	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3,0E+01	1,5	5,7E+05	5,8	REDUCCIÓN
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,5E+02	2,2	1,0E+05	5,0	REDUCCIÓN
<i>Salmonella choleraesuis</i>	1,5E+02	2,2	1,1E+05	5,0	REDUCCIÓN
<i>Escherichia coli</i>	1,5E+02	2,2	1,2E+05	5,1	REDUCCIÓN

RESULTADOS DE LA PRUEBA. TIEMPO EVALUADO 15 Minutos

Microorganismos de prueba	Recuento viable		Reducción de la viabilidad		Interpretación
	(UFC / mL)	Log	(UFC / mL)	Log	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,0E+01	1,3	8,5E+05	5,9	REDUCCIÓN
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,5E+02	2,2	1,0E+05	5,0	REDUCCIÓN
<i>Salmonella choleraesuis</i>	1,5E+02	2,2	1,1E+05	5,0	REDUCCIÓN
<i>Escherichia coli</i>	1,5E+02	2,2	1,2E+05	5,1	REDUCCIÓN

Para interpretar los resultados de la tabla, los estándares internacionales (v.gr la norma técnica colombiana NTC 5150) describen que un producto presenta actividad bactericida si demuestra una reducción de la viabilidad de 10^{-5} (Log 5,0) en el tiempo evaluado. La muestra analizada a una dilución de 5 mL/L de agua, presenta reducción en 10^{-5} (Log 5,0) unidades formadoras de colonia (UFC) de las bacterias después de estar en contacto con la composición desarrollada durante 5, 10 y 15 minutos, por lo cual puede concluirse que la composición desarrollada presenta actividad bactericida.

La misma composición fue enviada a la Universidad de Antioquia para determinar su potencial antiviral contra el Virus SARSCoV-2. Se analizó la actividad antiviral del compuesto enviado y se utilizó el virus SARS-COV-2 aislado en el Grupo Inmunovirología de la UdeA en la línea celular VERO E6. Las células VERO E6 se mantuvieron en medio de cultivo DMEM, suplementado con SFB (Suero fetal bovino) al 5%, en una atmósfera de CO₂ al 5% y a una temperatura de 37°C. El título del virus SARS-COV-2 aislado en el laboratorio se determinó mediante la técnica de plaqueo y TCID₅₀ (del inglés, Tissue Culture Infectious Doses 50) en células VERO E6, siguiendo un protocolo descrito previamente en la literatura. El título obtenido fue de 4.2×10^6 UFP (unidades formadoras de placa) /mL. La citotoxicidad (CTX) se determinó mediante el ensayo de MTT, el cual se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido ampliamente usado para medir la supervivencia, la proliferación celular y actividad antiviral; de esta manera, la cantidad de formazán es directamente proporcional a la viabilidad celular (2).

Inicialmente, las células se sembraron a una densidad de 1×10^5 células/pozo en una placa de 96 pozos en 200 μ L de DMEM con 10% de FBS y se cultivaron durante 24 horas a 37 °C con 5% de CO₂. Luego, las células se trataron con diferentes concentraciones del compuesto por triplicado. Cuarenta y ocho horas después del tratamiento, se retiró el sobrenadante y se adicionó la solución de MTT (0.5 mg/mL). Después de 2h de incubación se adicionaron 130 μ L/pozo de DMSO. Las placas se dejaron en agitación durante 15 minutos y finalmente se

leyeron en un espectrofotómetro a 550 nm. Se incluyeron además controles sin tratamiento, en los

cuales la viabilidad celular se asumió como del 100%. Cada condición experimental se evaluó por triplicado en 2 experimentos independientes (n=6). Para los ensayos antivirales se evaluaron las concentraciones del compuesto que mostraron menos del 20% de citotoxicidad.

Las células VERO E6 fueron sembradas en platos de 96 pozos, a una densidad de 1×10^5 células/pozo en 100 μ L/pozo de DMEM, 2% de SFB, 5% de CO₂ y 37 °C, 24h antes de ser usadas en este experimento. El día del ensayo, diluciones no citotóxicas del compuesto fueron adicionadas a las células VERO E6, en réplicas de 3 pozos, por 1 hora. Luego de este tiempo, el compuesto fue retirado y las células fueron infectadas con el virus SARS-CoV-2 a una MOI de 0.1 por 1h. Después de este tiempo, el remanente de virus que no logró ingresar a las células fue retirado y reemplazado por medio de cultivo fresco y nuevas diluciones del compuesto. Las células fueron cultivadas por 48h, al cabo de este tiempo, un ensayo de MTT, descrito arriba, fue realizado para determinar la actividad antiviral. Para este experimento se realizaron los siguientes controles:

controles negativos (células+DMEM) y controles positivos (células+DMEM+virus).

Para calcular la actividad antiviral se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ AAV} = 100 \times [(A-B) / (C-B)]$$

Donde A corresponde a la DO de las células infectadas y tratadas con el compuesto, B a la DO de células infectadas sin tratamiento con los compuestos (control positivo de infección) y C a la DO de células no infectadas (control negativo de infección). Adicionalmente, la dilución más alta, no citotóxica y en la que se observó actividad antiviral, fue usada para determinar el título del virus en un ensayo de plaqueo.

El ensayo de viabilidad celular realizado con el compuesto mostró que las diluciones iguales o superiores a 10^{-2} , fueron las menos citotóxicas con valores de viabilidad celular media superior al 80%, para el compuesto. Mientras que la dilución 10^{-1} mostró niveles de viabilidad celular media inferiores al 78%. Por lo

tanto, las diluciones no citotóxicas que se pueden evaluar para determinar la AAV del compuesto son las diluciones iguales o superiores a 10^{-2} .

De acuerdo con la Universidad de Antioquia el compuesto inhibió en un 98% la producción de partículas virales infecciosas del SARS-CoV-2.