

Tentamen Octrooigemachtigden

Tentamen “Opstellen van een octrooiaanvraag” (deel A)

chemie

3 oktober 2016

13.30 – 17.30 uur

TENTAMENOPGAVE “OPSTELLEN VAN EEN OCTROOIAANVRAGE” (A) CHEMIE 2016

Uw cliënt is een commerciële kweker van tropische aquariumvissen, die ook groothandelaar is van aquariumtoebehoren, zoals pompen, filtermaterialen en verlichting. Uw cliënt verkoopt ook andere aquariumproducten, zoals visvoer, geneesmiddelen voor aquariumvissen en middelen die professionele kwekers van aquariumvissen gebruiken om het water te zuiveren van ziektekiemen en parasieten.

De meeste bekende en populaire tropische zoetwatervissen komen uit Azië, Afrika en Zuid-Amerika. De onderstaande Tabel A geeft een aantal bekende voorbeelden.

10

Tabel A: veel voorkomende tropische aquariumvissen

Familie	Azië	Afrika	Zuid-Amerika
Zalm- en karperachtigen	Zebra-vis	Congozalm	Neontetra Kardinaaltetra
Baarsachtigen	Siamese kempvis	Tanzania-baarzen Malawi-baarzen	Maanvis Discusvis
Levendbarenden	Guppy Goerami		Zwaarddrager
(Pantser-)meervallen	Siamese algeneter		Corydoras

Aquaria zijn relatief kleine en gesloten ecosystemen. Dit maakt ze zeer gevoelig voor besmetting met parasieten, in het bijzonder met verschillende species van *Ichthyophthirius*, een eencellig micro-organisme dat verschillende soorten “stip” kan veroorzaken.

Bij besmetting met “stip” nestelen de parasieten zich in de huid van de vissen. Dit wordt zichtbaar als “stippen” op de vis die, afhankelijk van het soort *Ichthyophthirius* dat de besmetting veroorzaakt, wit (“witte stip”), zwart (“zwarte stip”) of lichtbruin (“peperstip”) gekleurd zijn. De parasieten tasten hierbij de slijmhuide en ook de kieuwen van de vissen aan: zonder behandeling kan een uitbraak van “stip” er toe leiden dat binnen een week 80 tot 90 procent van de vissen in een aquarium sterven.

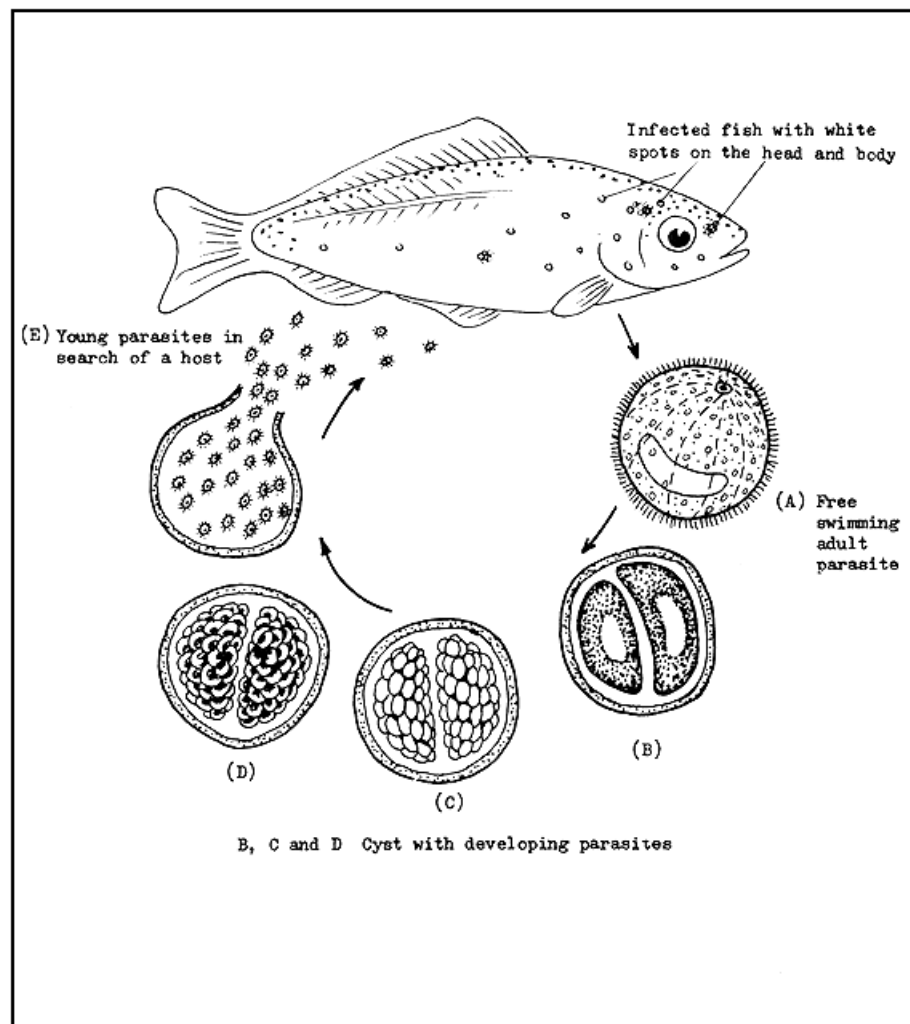
Figuur 1 toont een kardinaaltetra die besmet is met witte stip. De levenscyclus van *Ichthyophthirius* is weergegeven in Figuur 2.

25

Figuur 1: Kardinaaltetra met witte stip



5 Figuur 2: levenscyclus van *Ichthyophthirius*



Stip is een ziekte die wereldwijd voorkomt en die vissen uit alle werelddelen kan aantasten. Witte stip komt overal ter wereld voor, behalve in de eilanden van Zuid-Oost Azië (zoals de Filippijnen, Borneo, Indonesië en Papoea-Nieuw Guinea) en in Australië en Nieuw-Zeeland. Zwarte stip komt van nature in Zuid-Amerika voor, en peperstip komt van nature in alle delen van Azië voor. Overigens kan iedere soort stip vissen uit alle werelddelen aantasten: zo kan peperstip ook vissen uit Zuid-Amerika en Afrika besmetten, en omgekeerd zijn vissen uit Azië en Afrika zeer gevoelig voor zwarte stip.

“Stip” is de meest voorkomende ziekte in aquaria en vrijwel iedere aquariumhouder zal een of meerdere malen met een uitbraak van stip geconfronteerd worden. Stip is ook zeer besmettelijk: met name de cysten die de ingekapselde parasieten beschermen (in Figuur 2 aangeduid als “*Cyst with developing parasites*”) kunnen zich gemakkelijk verspreiden via het water of doordat zij zich hechten aan nieuwe planten die in een aquarium worden ingebracht. Als gevolg hiervan worden in vrijwel alle hobby-aquaria cysten van een of meerdere soorten *Ichthyophthirius* aangetroffen. Deze cysten zijn ook zeer lang levensvatbaar: ze kunnen gedurende jaren in een aquarium aanwezig zijn en dan plotseling tot een “actieve” uitbraak van stip leiden, bijvoorbeeld door een verandering van de temperatuur of van de waterkwaliteit (bijvoorbeeld wanneer het water wordt ververs, wat in een hobby-aquarium wekelijks moet gebeuren).

Stip is ook een groot probleem voor professionele kwekers van aquariumvissen, niet alleen door de hoge sterfte, maar ook omdat de weinige vissen die een “actieve” uitbraak van stip overleven niet langer geschikt zijn voor de handel. Dit probleem wordt verergerd doordat de meeste commerciële kwekers centrale filterinstallaties hebben die alle kweekbakken (aquariumhouders noemen hun aquarium doorgaans een “bak”) van vers gezuiverd water voorzien, waardoor een uitbraak van stip zich meestal snel zal verspreiden over alle kweekbakken. Bovendien bevatten deze kweekbakken meestal pasgeboren en jonge vissen, die extra gevoelig zijn voor besmetting met stip. In de praktijk betekent dit dat een professionele kweker bij een uitbraak van stip vaak al zijn leveranties aan zijn afnemers (dierenwinkels en gespecialiseerde aquariumzaken) gedurende meerdere dagen of zelfs weken moet stopzetten.

Een van de meest gebruikte geneesmiddelen tegen “stip” is malachietgroen. Malachietgroen werkt zeer goed tegen alle soorten stip, maar heeft een nadeel: het werkt alleen tegen de “vrij-zwemmende” parasieten (in Figuur 2 aangeduid als “*Free swimming adult parasites*” en “*Young parasites in search of a host*”). Wanneer een vis al besmet is geraakt zitten de parasieten goed ingekapseld in de slijmhuide en de kieuwen van de vissen en

dit beschermt de parasieten tegen het malachietgroen. Als gevolg hiervan werkt malachietgroen alleen om verdere besmetting van (nog) niet-besmette vissen te voorkomen: vissen die al besmet zijn kunnen niet worden genezen. Om aan dit probleem tegemoet te komen wordt malachietgroen in de praktijk vaak gebruikt in combinatie met anthocyaan, een paarsrode kleurstof die uit rode biet kan worden gewonnen. Anthocyaan heeft weliswaar geen invloed op de parasieten zelf, maar heeft wel de eigenschap dat het, wanneer het gebruikt wordt in hoeveelheden van ruimschoots meer dan 2 gram/liter water, de slijmhuide van de vissen meer doorlatend maakt voor het malachietgroen, zodat het malachietgroen beter werkt tegen de parasieten die ingekapseld zitten in de slijmhuide.

10 Echter, hoewel het gebruik van een dergelijke grote hoeveelheid anthocyaan in combinatie met malachietgroen tot op zekere hoogte uitkomst kan bieden voor mensen die aquaria thuis als hobby houden, is dit geen oplossing voor professionele kwekers: hoeveelheden anthocyaan van meer dan 0,5 gram/liter zijn namelijk (te) schadelijk voor de gezondheid van pasgeboren en jonge vissen (en malachietgroen geeft geen genezende werking wanneer minder dan 2.0 g/l anthocyaan wordt gebruikt). Het is hierdoor voor professionele kwekers niet goed mogelijk om de combinatie van malachietgroen en anthocyaan preventief toe te passen om een uitbraak van stip te voorkomen (dat wil zeggen als onderdeel van de middelen die professionele kwekers regelmatig aan het water toevoegen om het water te zuiveren van ziektekiemen en parasieten). Ten slotte werkt de combinatie van malachietgroen en (meer dan 2.0 g/l) anthocyaan niet tegen de parasieten wanneer zij ingekapseld zitten in een cyste (in Figuur 2 aangeduid als “*Cyst with developing parasites*”).

Er is dus behoefte aan een nieuwe behandeling van verschillende soorten stip, die ook reeds besmette vissen kan genezen.

25 *Ichthyophthirius* kan ook de slijmhuide aantasten van slakken die in het water leven, met dezelfde gevolgen als bij vissen. Het is echter bekend dat *Ashra templus*, een naaktslak die in Indonesië voorkomt, een zeer goed natuurlijk afweermecanisme tegen peperstip heeft: bij besmetting met peperstip maakt de slak een eiwit aan dat in de slijmhuide wordt afgegeven en dat de parasiet doodt, zelfs wanneer deze in de slijmhuide ingekapseld zit (dit natuurlijk voorkomende eiwit wordt hierin verder aangeduid als het “*Peperstip-eiwit*”).

30 In een poging om een geneesmiddel tegen stip bij vissen te maken heeft men dit eiwit uit de slijmhuide van de slakken geïsoleerd en vervolgens getest op vissen uit verschillende werelddelen die met verschillende soorten stip waren besmet. Het eiwit bleek hierbij veilig te zijn voor vissen en ook zeer goed te werken bij alle soorten aquariumvissen van over de hele

wereld, maar ook heel specifiek te zijn voor peperstip: het eiwit had geen enkele invloed op witte stip of zwarte stip.

Uw cliënt heeft nu gevonden dat wanneer *Ashra templus* wordt blootgesteld aan parasieten van witte stip (die van nature niet voorkomen in de biotoop van *Ashra templus*), deze slak dan een eiwit aanmaakt dat sterk lijkt op het eiwit dat de slak van nature aanmaakt tegen peperstip, maar dat specifiek is voor witte stip (dit eiwit wordt hierin verder aangeduid als het “Witte Stip-eiwit”). Uw cliënt heeft ook gevonden dat wanneer *Ashra templus* wordt blootgesteld aan parasieten van zwarte stip (die opnieuw van nature niet voorkomen in de biotoop van *Ashra templus*), dat deze slak dan ook een soortgelijk eiwit aanmaakt dat specifiek is voor zwarte stip (dit eiwit wordt hierin verder aangeduid als het “Zwarte Stip-eiwit”).

Uw cliënt heeft bovendien gevonden dat verschillende combinaties van het Witte Stip-eiwit, het Zwarte Stip-eiwit en het Peperstip-eiwit werkzaam zijn tegen verschillende soorten stip (hiervoor wordt verwezen naar de onderstaande tabellen). In de praktijk is het belangrijk om een dergelijk combinatiepreparaat te kunnen gebruiken, omdat is gebleken dat, in een zogenaamd “gezelschapsaquarium” waarin vissen uit verschillende werelddelen te samen worden gehouden, een uitbraak van een soort stip vaak gevolgd wordt door een uitbraak van een ander soort stip. Zo kan bijvoorbeeld een uitbraak van zwarte stip (die vaak begint bij Zuid-Amerikaanse vissen zoals neontetra’s) zich uitbreiden naar Afrikaanse of Aziatische vissen, maar ook leiden tot een uitbraak van witte stip bij alle vissen, en/of tot een uitbraak van peperstip die dan begint bij Aziatische vissen en zich vervolgens uitbreidt tot Afrikaanse en Zuid-Amerikaanse vissen.

Uw cliënt heeft de werkzaamheid van het Witte Stip-eiwit, het Zwarte Stip-eiwit en het bekende Peperstip-eiwit, en van verschillende combinaties hiervan, als volgt onderzocht.

In een eerste reeks experimenten werd onderzocht of de afzonderlijke eiwitten werkzaam waren tegen vrij-zwemmende parasieten.

Hiertoe werden kweekpopulaties van jonge vissen uit verschillende werelddelen over verschillende bakken verdeeld (een bak per behandelingsgroep), en deze bakken werden vervolgens besmet met vrij-zwemmende parasieten van verschillende soorten stip (in Figuur 2 aangeduid als “*Young parasites in search of a host*”). De temperatuur van de bakken werd hierbij van de gebruikelijke kweektemperatuur van 24°C verlaagd naar 21°C, hetgeen een uitbraak van stip in de hand werkt. De resultaten voor de afzonderlijke eiwitten (steeds als poeder aan het water toegevoegd) staan vermeld in Tabel B, en de resultaten voor de combinaties (ook als poeder aan het water toegevoegd) in Tabel C. Wanneer de vermelde

doses gedurende drie achtereenvolgende dagen eenmaal-daags werden toegevoegd, werden de vissen gedurende tenminste twee weken beschermd tegen een uitbraak van de ziekte. Na drie weken raakten de vissen echter opnieuw besmet, naar wordt aangenomen omdat de gebruikte combinaties van eiwitten weliswaar de vrij-zwemmende parasieten kunnen doden, maar niet de cysten, die na meer dan twee weken uitkomen en de vissen dan opnieuw kunnen besmetten.

In Tabel B (en de verdere Tabellen C t/m G) geeft de vermelde concentratie de hoeveelheid aan die aan het aquarium moet worden toegevoegd om werkzaam te zijn (deze hoeveelheid is uitgedrukt als gram per liter water in het aquarium). Deze dosis moet drie dagen na elkaar eenmaal-daags worden toegevoegd (daarna niet meer). Lagere hoeveelheden dan vermeld waren niet werkzaam. Het eiwit werd steeds als poeder toegevoegd.

Tabel B: Beschermen tegen vrij-zwemmende parasieten – afzonderlijke eiwitten.

Getest eiwit	Voorkomen van witte stip:	Voorkomen van zwarte stip:	Voorkomen van peperstip:
<u>Malachietgroen (referentie):</u> gaf bescherming tegen vrij-zwemmende parasieten van alle drie de soorten stip.			
<u>Beschermen van jonge neontetras (Zuid-Amerika)</u>			
Witte Stip-eiwit	0,05-0,1 g/l	Niet werkzaam	Niet werkzaam
Zwarte Stip-eiwit	Niet werkzaam	0,05-0,1 g/l	Niet werkzaam
Peperstip-eiwit (*)	Niet werkzaam	Niet werkzaam	0,05-0,1 g/l
<u>Beschermen van jonge guppies (Azië)</u>			
Witte Stip-eiwit	0,05-0,1 g/l	Niet werkzaam	Niet werkzaam
Zwarte Stip-eiwit	Niet werkzaam	0,05-0,1 g/l	Niet werkzaam
Peperstip-eiwit (*)	Niet werkzaam	Niet werkzaam	0,05-0,1 g/l
<u>Beschermen van jonge Tanzania-baarzen (Afrika)</u>			
Witte Stip-eiwit	0,05-0,1 g/l	Niet werkzaam	Niet werkzaam
Zwarte Stip-eiwit	Niet werkzaam	0,05-0,1 g/l	Niet werkzaam
Peperstip-eiwit (*)	Niet werkzaam	Niet werkzaam	0,05-0,1 g/l
(*) komt van nature voor in Indonesië			

Tabel C: Beschermen tegen vrij-zwemmende parasieten – combinaties van eiwitten.

	Witte Stip-eiwit:	Zwarte Stip-eiwit:	Peperstip-eiwit:	Bescherming tegen witte stip ?	Bescherming tegen zwarte stip ?	Bescherming tegen peperstip ?
<i>Beschermen van jonge neontetras (Zuid-Amerika)</i>						
Combinatie	Geen	0,05-0,1 g/l	0,05-0,1 g/l	Nee	Ja	Ja
	0,05-0,1 g/l	Geen	0,05-0,1 g/l	Ja	Nee	Ja
	0,05-0,1 g/l	0,05-0,1 g/l	Geen	Ja	Ja	Ja
	0,05-0,1 g/l	0,05-0,1 g/l	0,05-0,1 g/l	Ja	Ja	Ja
<i>Beschermen van jonge guppies (Azië)</i>						
Combinatie	Geen	0,05-0,1 g/l	0,05-0,1 g/l	Nee	Ja	Ja
	0,05-0,1 g/l	Geen	0,05-0,1 g/l	Ja	Nee	Ja
	0,05-0,1 g/l	0,05-0,1 g/l	Geen	Ja	Ja	Ja
	0,05-0,1 g/l	0,05-0,1 g/l	0,05-0,1 g/l	Ja	Ja	Ja
<i>Beschermen van jonge Tanzania-baarzen (Afrika)</i>						
Combinatie	Geen	0,05-0,1 g/l	0,05-0,1 g/l	Nee	Ja	Ja
	0,05-0,1 g/l	Geen	0,05-0,1 g/l	Ja	Nee	Ja
	0,05-0,1 g/l	0,05-0,1 g/l	Geen	Ja	Ja	Ja
	0,05-0,1 g/l	0,05-0,1 g/l	0,05-0,1 g/l	Ja	Ja	Ja

Nadat de beschermende werking tegen vrij-zwemmende parasieten was aangetoond en bevestigd (zie de Tabellen B en C) werd ook onderzocht of de eiwitten de vissen kunnen genezen van een uitbraak van stip.

Hierbij werd, wanneer er een uitbraak was van stip in een kweekbak, de besmette vissenpopulatie over afzonderlijke bakken verdeeld (opnieuw een bak per behandelingsgroep), en ieder van deze bakken werd met een ander eiwit behandeld (of met de gebruikte referenties). Dit werd gedaan voor een uitbraak van witte stip, van zwarte stip en van peperstip. Vervolgens werd na drie dagen gekeken of de vissen nog leefden en symptomen van stip vertoonden. De resultaten zijn weergegeven in Tabel D. Zoals verwacht gaf de referentie malachietgroen op zichzelf geen genezende werking; alleen wanneer het gebruikt werd in combinatie met een aanzienlijke hoeveelheid anthocyaan (aanzienlijk meer dan 2 gram/ per liter) was het malachietgroen in staat om door de slijmhuideen te dringen en de ingekapselde parasieten te doden.

15 **Tabel D: Genezen van een uitbraak van stip – afzonderlijke eiwitten.**

Getest eiwit	Werkzaam tegen uitbraak van witte stip?	Werkzaam tegen uitbraak van zwarte stip?	Werkzaam tegen uitbraak van peperstip?
Referentie I: Malachietgroen	Nee	Nee	Nee
Referentie II: Malachietgroen en anthocyaan (2,0 g/l)	Nee	Nee	Nee
Referentie III: Malachietgroen en anthocyaan (2,5 g/l)	Ja	Ja	Ja
Witte Stip-eiwit	0,05-0,1 g/l	Niet werkzaam	Niet werkzaam
Zwarte Stip-eiwit	Niet werkzaam	0,05-0,1 g/l	Niet werkzaam
Peperstip-eiwit (*)	Niet werkzaam	Niet werkzaam	0,05-0,1 g/l
(*) komt van nature voor in Indonesië			

Omdat de afzonderlijke eiwitten niet werkzaam bleken tegen alle drie de soorten stip werden ook combinaties van de eiwitten getest. De resultaten hiervan zijn vermeld in Tabel E.

Tabel E: Genezen van een uitbraak van stip – combinaties van eiwitten.

	Witte Stip-eiwit:	Zwarte Stip-eiwit:	Peperstip-eiwit:	Werkzaam tegen uitbraak van witte stip ?	Werkzaam tegen uitbraak van zwarte stip ?	Werkzaam tegen uitbraak van peperstip ?
Combinatie	Geen	0,05-0,1 g/l	0,05-0,1 g/l	Nee	Ja	Ja
	0,05-0,1 g/l	Geen	0,05-0,1 g/l	Ja	Nee	Ja
	0,05-0,1 g/l	0,05-0,1 g/l	Geen	Ja	Ja	Ja
	0,05-0,1 g/l	0,05-0,1 g/l	0,05-0,1 g/l	Ja	Ja	Ja
De resultaten voor de gebruikte referenties (Referentie I, Referentie II en Referentie III) staan vermeld in Tabel D.						

Ten slotte werd onderzocht of de eiwitten in staat zijn om *Ichthyophthirius* te doden wanneer de parasieten ingekapseld zijn als cysten (in Figuur 2 aangeduid als “*Cyst with developing parasites*”). Dit gebruik zou het water zuiveren van deze zeer hardnekkige en besmettelijke cysten en zo de vissen tegen deze cysten beschermen (en niet alleen tegen de
5 vrij-zwemmende jonge parasieten, zoals bij Tabellen B en C).

Hiertoe werden de aangegeven hoeveelheden van de eiwitten (afzonderlijk en als combinaties, en steeds als poeder) gedurende drie achtereenvolgende dagen eenmaal-daags toegevoegd aan watermonsters waarin cysten van stip (zoals vermeld in Tabel F) konden worden aangetoond. Daarna werd, om te zien of de cysten nog levensvatbaar waren, een klein
10 aantal vissen blootgesteld aan deze watermonsters, onder omstandigheden die normaal gesproken tot een uitbraak van stip leiden (d.w.z. verlagen van de temperatuur van het water van 24°C naar 21°C). De resultaten zijn weergegeven in Tabel F (eiwitten op zich) en Tabel G (eiwit in combinatie met anthocyaan). Lagere hoeveelheden waren opnieuw niet werkzaam.

Tabel F: Doden van cysten (zonder gebruik van anthocyaan).

	Witte Stip-eiwit:	Zwarte Stip-eiwit:	Peperstip-eiwit:	Cysten van witte stip nog levensvatbaar ?	Cysten van zwarte stip nog levensvatbaar ?	Cysten van peperstip nog levensvatbaar ?
Referentie I: Malachietgroen (referentie)				Ja	Ja	Ja
Afzonderlijke Eiwitten	0,05-0,1 g/l	Geen	Geen	Ja	Ja	Ja
	Geen	0,05-0,1 g/l	Geen	Ja	Ja	Ja
	Geen	Geen	0,05-0,1 g/l	Ja	Ja	Ja
Combinatie	Geen	0,05-0,1 g/l	0,05-0,1 g/l	Ja	Ja	Ja
	0,05-0,1 g/l	Geen	0,05-0,1 g/l	Ja	Ja	Ja
	0,05-0,1 g/l	0,05-0,1 g/l	Geen	Ja	Ja	Ja
	0,05-0,1 g/l	0,05-0,1 g/l	0,05-0,1 g/l	Ja	Ja	Ja

Tabel G: Doden van cysten (met gebruik van anthocyaan in de aangegeven hoeveelheden).

	Witte Stip- eiwit:	Zwarte Stip- eiwit:	Peperstip- eiwit:	Cysten van witte stip nog levensvatbaar ?	Cysten van zwarte stip nog levensvatbaar ?	Cysten van peperstip nog levensvatbaar ?
Referentie III: Malachietgroen en anthocyaan (2,5 g/l)				Ja	Ja	Ja
Afzonderlijke Eiwitten met 0.1 tot 0.5 g/l anthocyaan	0,05-0,1 g/l	Geen	Geen	Nee	Ja	Ja
	Geen	0,05-0,1 g/l	Geen	Ja	Nee	Ja
	Geen	Geen	0,05-0,1 g/l	Ja	Ja	Nee
Combinatie met 0.1 tot 0.5 g/l anthocyaan	Geen	0,05-0,1 g/l	0,05-0,1 g/l	Ja	Nee	Nee
	0,05-0,1 g/l	Geen	0,05-0,1 g/l	Nee	Ja	Nee
	0,05-0,1 g/l	0,05-0,1 g/l	Geen	Nee	Nee	Nee
	0,05-0,1 g/l	0,05-0,1 g/l	0,05-0,1 g/l	Nee	Nee	Nee

Om de eiwitten te verkrijgen wordt een populatie van de naaktslak *Ashra templus* blootgesteld aan cysten of vrij-zwemmende jonge parasieten van de betreffende soort stip (witte stip, zwarte stip of peperstip). Na twee tot drie dagen wordt handmatig de slijmhuide van de slakken verwijderd. De slakken worden dan teruggeplaatst in de bakken waarin zij worden gehouden en na een verdere twee tot drie dagen kan opnieuw slijmhuide met de eiwitten worden verzameld.

De gewenste eiwitten kunnen eenvoudig uit de verzamelde slijmhuide worden verzameld door de slijmhuide met methanol te behandelen. Het gewenste eiwit slaat hierbij als een wit poeder neer, dat kan worden verzameld door filtreren en dat na drogen klaar is voor gebruik.

Om combinatiepreparaten te verkrijgen kunnen de eiwitten vervolgens in de gewenste verhoudingen worden gemengd (d.w.z. in wezen gelijke hoeveelheden van ieder in het preparaat aanwezig eiwit) en in hierboven vermelde hoeveelheden worden gebruikt. De combinatiepreparaten zullen in de regel poedervormige mengsels van de gewenste eiwitten zijn, die ook als poeder aan het water kunnen worden toegevoegd (het is in de praktijk in wezen niet mogelijk om de preparaten als oplossingen te gebruiken of te verkopen: de oplosbaarheid van de eiwitten is maximaal 1 gram/liter, en een relatief klein aquarium van 80x40x40cm bevat al 128 liter water. Dit betekent dat voor het behandelen van een klein aquarium al tussen $(0,05 \times 128 =) 6,4$ gram en $(0,1 \times 128 =) 12,8$ gram van de eiwitten nodig is, en bij een oplosbaarheid van maximaal 1 g/l zou dat betekenen dat 6 tot 12 liter van een oplossing zou moeten worden toegevoegd. Dit is in de praktijk niet haalbaar. Wanneer het preparaat naast de eiwitten ook anthocyaan bevat, bevat het ongeveer 2 tot 5 maal de hoeveelheid anthocyaan per gram van ieder eiwit (bijvoorbeeld 0.05 of 0.1 gram van ieder aanwezig eiwit en 0.1 tot 0.5 gram anthocyaan).

Als een alternatief voor het gebruik van combinatiepreparaten kunnen de eiwitten ook afzonderlijk aan het water worden toegevoegd, gedurende drie achtereenvolgende dagen eenmaal-daags in de hoeveelheden die in de bovenstaande tabellen zijn aangegeven, eventueel in combinatie met geschikte hoeveelheden anthocyaan (zoals hierin aangegeven)..

Uit een kweek van ongeveer 20 slakken kan per twee tot drie dagen ongeveer 2 tot 3 gram eiwit worden verkregen. Dit lijkt niet veel (en bovendien is het kweken van de slakken en het vervolgens handmatig verzamelen en isoleren van de eiwitten bewerkelijk en kostbaar), maar uw cliënt verzekert u dat dit alles economisch zeer rendabel is, met name omdat professionele kwekers door het profylactisch gebruik van de eiwitten volgens de uitvinding de grote verliezen (aan vissen en aan omzet) kunnen voorkomen die zij met regelmaat meemaken

als gevolg van een uitbraak van stip in hun kwekerijen. Uw cliënt verwacht namelijk dat professionele kwekers de eiwitten standaard zullen gaan gebruiken als onderdeel van de middelen die zij regelmatig aan het water toevoegen om het water te zuiveren van ziektekiemen en parasieten.

D1: EP 1 234 567

Priority date: October 18, 1993

Filing date: October 17, 1994

Date of publication: April 23, 1995

Treatment for pepperspot.

“Brownspot” or “pepperspot” is a disease of tropical fish, like those kept in tropical fishtanks.

Current treatment of pepperspot involves the use of malachite green, a chemical agent that kills the free-swimming parasite that causes the disease.

The present invention provides a new treatment for pepperspot.

The treatment involves the use of a proteinaceous substance that can be isolated from the mucous skin of *Ashra templus*, a freshwater slug that is indigenous to Indonesia. It has been found that this substance can cure fish suffering from pepperspot and prevent further spread of the disease to other fish not yet affected.

The substance of the invention can be obtained by keeping the slugs in a tank that has been inoculated with pepperspot. After two to three days, the slugs are removed from the tank and the mucous is collected by gently rubbing the mucous skin off the slug. The collected mucous is then treated with methanol, which dissolves most components of the mucous but precipitates the substance of the invention, which can then be collected by filtration and dried. The slugs can then be put back in the water, and the collection of the substance can be repeated after two to three days.

In this way, from a total of about 10 slugs, a few grams of substance can be collected every two to three days. If necessary, in order to ensure that the slugs keep producing the protein, the tank holding the slugs can be inoculated once a week with a live culture of the *Ichthyophthirius* parasite that causes pepperspot.

For use in the prevention or treatment of pepperspot, the substance of the invention can be added to a fishtank in an amount of 0.05 to 0.25 gram/liter (such as about 0.1 g/l) of water in the tank once daily during a period of about three to five days. This stops the further spread of the disease and allows the infected fish to make a full recovery. Optionally, the substance of the invention can be used in combination with anthocyan, a natural dye which is known to increase the permeability of the skin of the fish and which is often used in combination with known treatments for spot, such as malachite green.

When anthocyan was used in combination with the substance of the invention, it was also found that when the substance of the invention was used in combination with even a small amount of anthocyan (i.e. around 0.25 gram/liter, which is ten times less than the amount that is commonly used in combination with malachite green and which advantageously is also an amount that is well tolerated by young or growing fish), after the fishes had recovered, there was no new outbreak of peppercorn during a period of at least three weeks. This is surprising, because when the known treatment with malachite green is used, within two or three weeks after treatment there is often a renewed outbreak of spot among the surviving fishes which is caused by remaining cysts of the *Ichthyophthirius* parasite (as malachite green does not kill the parasites when they are encased in the cysts, even when it is used in combination with anthocyan. For this reason, treatment with malachite green should be repeated weekly for a period of at least a month). Thus, without being limited to any particular hypothesis or explanation, we assume that all these observations, when taken together, indicate that the substance of the invention is not only capable of killing the free-swimming parasites, but also the parasites when they are embedded in the skin of the fish and, on top of that, when used in combination with a small amount of anthocyan, when the parasites are encapsulated in the cysts.

The substance provided by the invention is not active against other forms of "spot", such as whitespot or blackspot. If a combined treatment for these different types of spot is required, the substance provided by the invention may be used in combination with other treatments for "spot" in fishes, such as malachite green. This combined use will again allow fish already affected by peppercorn (but not fish affected by whitespot or blackspot) to make a full recovery, and by killing any free-swimming parasites, will also prevent the spread of any peppercorn, whitespot and/or blackspot infestation to the remaining healthy fish in the fishtank.

CLAIMS

1. Proteinaceous substance for prevention and treatment of pepperspot in fish, obtainable from the mucous skin of *Ashra templus*.
2. Method for obtaining the proteinaceous substance of claim 1, comprising the steps of:
 - a) cultivating *Ashra templus* in the presence of the *Ichthyophthirius* parasite that causes pepperspot;
 - b) collecting the mucous skin from the slugs;
 - c) treating the collected mucous skin with methanol, such that the proteinaceous substance of claim 1 precipitates; and optionally
 - d) isolating the precipitated substance of claim 1.

D2: Journal of Investigational Fish Biology (2014), issue 1, page 72.

Published on January 9, 2014.

BRIEF RESEARCH COMMUNICATION: *Ashra templus* is found to produce a protein against blackspot when exposed to the *Ichthyophthirius* strain causing blackspot.

It is well known that the freshwater slug *Ashra templus*, that is indigenous to Indonesia, has a unique natural defense mechanism against the unicellular parasite *Ichthyophthirius*: when the parasite nestles in its skin, *Ashra templus* produces a protein that kills the embedded parasite.

In its natural environment, *Ashra templus* only encounters the species of *Ichthyophthirius* that is the causative agent of so-called “brownspot” or “pepperspot”.

We have tried to determine whether the protein produced by *Ashra templus* is also capable of killing other species of *Ichthyophthirius*, in particular those causing “whitespot” and “blackspot”, diseases of fish and freshwater slugs that are native to other parts of the world, like Africa and South-America. This turned out not to be the case: the protein naturally produced by *Ashra templus* was found to be highly specific for the species of *Ichthyophthirius* that occurs in the slug’s natural environment (i.e. pepperspot).

However, whilst performing our research, we made a fortuitous error: in order to produce the protein against pepperspot that we needed for our research, *Ashra templus* needs to be exposed to the pepperspot parasite in order to trigger production of the protein. However, one day, instead of exposing *Ashra templus* to the *Ichthyophthirius* strain that causes pepperspot, one of our technicians mistakenly exposed *Ashra templus* to the strain of *Ichthyophthirius* that causes blackspot (which at the time we were using to determine whether the pepperspot protein also works against other strains of *Ichthyophthirius*).

To our great surprise, in response to the challenge with the blackspot parasite, *Ashra templus* produced a protein that was very similar to the native pepperspot protein, but that was highly specific for blackspot: this new protein was highly effective against blackspot (at an amount of 0.1 to 0.2 g/l water) but had no effect on either whitespot or pepperspot.

Our results seem to show that the natural defense mechanism of *Ashra templus* appears to be highly adaptive, in a way that almost seems to resemble a kind of immune response. We are currently exploring the genetic basis for this remarkable ability of *Ashra templus* to produce a protein that is highly specific for the strain of parasite that it is exposed to.

D3: US 2015-3456789

Priority date: June 16, 2014

Filing Date: June 15, 2015

Date of publication: December 17, 2015

Preparation against whitespot-disease in fish

The present invention relates to a protein, composition and method for preventing and treating whitespot-disease in fish.

Whitespot, which is caused by the unicellular parasite *Ichthyophthirius*, is the most common disease in tropical fish that are kept in tropical fishtanks.

Existing treatments for whitespot like malachite green only kill the parasite during the stages of its life cycle where it is “free-swimming”. As a result, while malachite green is very effective in protecting fishes from the free-swimming parasite and so limit the effects of an *Ichthyophthirius* outbreak, it cannot be used to cure fish that have already been affected by the parasite.

It has now been found that, by exposing the freshwater slug *Ashra templus* to the *Ichthyophthirius* strain that causes whitespot, a protein can be obtained that is capable of killing the parasite, even when it is embedded in the skin or gills of the fish.

Thus, in a first aspect, the invention relates to a protein that is capable of killing the parasite causing whitespot and that can be obtained by exposing *Ashra templus* to the species of *Ichthyophthirius* that causes whitespot disease.

Preferably, this protein is in isolated form. For example, it can be isolated from the mucous skin of slugs that have been exposed to the strain of *Ichthyophthirius* that causes whitespot.

Alternatively, DNA or RNA encoding the protein can be isolated from the slugs and the nucleotide sequence thereof can be suitably expressed in a suitable expression host like *E.coli*. The protein can then be purified and isolated, for example using the method described in the example below. For this purpose, the nucleotide sequence of the protein is given in SEQ ID NO:1 [Note to candidates: in preparing your answer to this paper, you should assume that a sequence listing is attached to this document and discloses the full nucleotide and amino acid sequence].

Thus, methods for preparing the protein of the invention, either by isolating the protein from the mucous skin of *Ashra templus* that has been exposed to the species of *Ichthyophthirius* that causes whitespot (essentially in the same way as described in EP 1 234

567 for isolating the protein against pepperspot that is naturally produced by *Ashra templus*) or by expressing a nucleotide sequence encoding the protein of the invention in a suitable expression host, form further aspects of this invention.

In another aspect, the invention relates to a composition comprising the protein of the invention. In a preferred aspect, this is a preparation that is suitable for the prevention and treatment of whitespot disease in tropical fish. In particular, this preparation may be in a form that is suitable for adding to a fish tank that contains fish that are affected by, or need to be protected from, whitespot disease. Reference is made to the further description herein.

The protein provided by the present invention is highly specific to the species of *Ichthyophthirius* that causes whitespot: it does not appear to be effective against the species of *Ichthyophthirius* that causes pepperspot, which is the disease that naturally occurs in the environment where *Ashra templus* lives (Indonesia). However, to obtain a preparation that is effective against whitespot and pepperspot, the protein of the present invention can be combined with the protein that is naturally produced by *Ashra templus* (which is known to be very effective against, and highly specific for, the species of *Ichthyophthirius* that causes pepperspot). Reference is again made to EP 1 234 567.

Also, recently, it has been described that *Ashra templus* produces a protein that is highly specific for blackspot when it is exposed to the species of *Ichthyophthirius* that causes blackspot (see *Journal of Investigational Fish Biology* (2014), issue 1, page 72), and the protein of the present invention against whitespot may also be combined with this protein against blackspot.

Thus, in a further aspect, the invention relates to a composition that comprises the protein of the present invention as well as at least one other protein that is effective against spot. In particular, this preparation may be in a form that is suitable for adding to a fish tank that contains fish that are affected by, or need to be protected from, an outbreak of spot (reference is again made to the further description herein).

For making these combination preparations, the proteins may be combined and used in suitable amounts known per se.

In yet another aspect, the invention relates to a method of preventing and treating whitespot disease in a tropical fish, said method comprising the step of adding to the water in which said fish is kept an amount of the protein of the invention (or of a composition comprising the same) that is active in preventing or treating whitespot disease in said fish. In particular, in this method, the protein of the invention (or composition comprising the same)

can be added to the tank in which the fish is kept in an amount of between 0.05 and 0.25 g/l (such as about 0,075 g/l), once daily for three to five days in a row.

When the protein of the invention is so applied in this method, even fish that are already affected by the disease can make a full recovery. Also, after such recovery, the method of the invention also offers protection against a renewed outbreak of whitespot for a period of up to two weeks (which is a further advantage of the present invention, as known treatments for whitespot like malachite green have to be repeated every week, whereas the treatment according to the present invention only needs to be repeated every two weeks). This is probably because the protein of the invention not only kills the free-swimming parasites, but also parasites that are embedded in the skin of the fish.

C L A I M S

1. Protein that is capable of killing the parasite causing whitespot and that can be obtained by exposing *Ashra templus* to the species of *Ichthyophthirius* that causes whitespot.
2. Composition that comprises the protein of claim 1.
3. Composition of claim 2, further comprising the protein that is capable of killing the parasite causing pepperspot which is naturally produced by *Ashra templus*.
4. Method for preparing the protein of claim 1, said method comprising the step of isolating the protein of claim 1 from the mucous skin of *Ashra templus* that has been exposed to the species of *Ichthyophthirius* that causes whitespot disease.
5. Method for preparing the protein of claim 1, said method comprising the step of expressing a nucleotide sequence encoding the protein of claim 1 in a suitable expression host.
6. Method for preventing and/or treating whitespot disease in a tropical fish, said method comprising the step of adding to the water in which said fish is kept an amount of the protein of claim 1 or the composition of claim 2 or 3 that is active in preventing and/or treating whitespot disease in said fish.