

Registro de Expedientes

CAUSA				
Número de Rol de TDPI	: 001489-2021	Fecha de Recepción TDPI	: 16-11-2021	
Tipo de Expediente	: Patente	Tipo Contencioso	: Oposición	
N° de Solicitud	: 201700674	N° de Registro	:	
Individualización				
ALIMENTO PARA PECES QUE COMPRENDE SALES DE SODIO, MAGNESIO Y CALCIO Y UN MODULADOR DEL RECEPTOR DE CATIONES POLIVALENTES (PVCR) EN LA FORMA DE TRIPTÓFANO O FENILALANINA; Y USO PARA EL TRATAMIENTO PROFILÁCTICO Y/O TERAPÉUTICO DEL SÍNDROME HEMORRÁGICO DEL SMOLT (HSS) EN SALMONIDAE				
Documentos adjuntos				
#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	Recurso 201700674.pdf	RECURSO	16-11-2021 13:36	Descarga
2	Resolución 201700674.pdf	RESOLUCIÓN	16-11-2021 13:36	Descarga

PARTES

Tipo	Apelante
RUT Apelante	8534347-5
Nombre Apelante	BIOMAR CHILE S.A
País Nacionalidad	CHILE
RUT Representante	8534347-5
Nombre Representante	LUIS FELIPE CLARO SWINBURN
Nombre Abogado	LUIS FELIPE CLARO SWINBURN
Email Abogado	PATENTES@CLARO.CL
Nombre del Estudio Juridico	CLARO Y CIA. (Y OTROS)
Folio Consignación	742381
Fecha Consignación	29-10-2021
RUT Consignación	79753810-8
Nombre Consignación	CLARO Y CIA.

Tipo	Apelado
RUT Apelado	8394848-5

Nombre Apelado	EUROPHARMA AS
País Nacionalidad	NORUEGA
RUT Representante	8394848-5
Nombre Representante	JUAN PABLO EGAÑA
Nombre Abogado	JUAN PABLO EGAÑA
Email Abogado	JPEJUICIO@SARGENT.CL
Nombre del Estudio Juridico	SARGENT & KRAHN

EXPEDIENTES

Fecha	18-11-2021
Trámite	Actuación
Descripción	Tramite
Observación	
N° de Oficio	

Fecha	19-11-2021
Trámite	Escrito
Descripción	Se hace parte
Observación	EN LO PRINCIPAL: Se hace parte; EN EL PRIMER OTROSÍ: Solicita alegato; EN EL SEGUNDO OTROSÍ: Delega poder.
N° de Oficio	

Documentos adjuntos

#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	P00195 Se hace parte - Delega.pdf	Se hace parte; Solicita alegato; Delega poder.	19-11-2021 11:16	Descarga

Fecha	24-11-2021
Trámite	Escrito
Descripción	Se hace parte
Observación	EN LO PRINCIPAL: Se hace parte; PRIMER OTROSÍ: solicita alegatos; SEGUNDO OTROSÍ: Acredita personería; TERCER OTROSÍ: Asume Patrocinio y Poder.
N° de Oficio	

Documentos adjuntos

#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	Se hace parte Rol TPI 1489-2021 Sol 674-2017.pdf	EN LO PRINCIPAL: Se hace parte; PRIMER OTROSÍ: solicita alegatos; SEGUNDO OTROSÍ: Acredita personería; TERCER OTROSÍ: Asume Patrocinio y Poder.	24-11-2021 16:21	Descarga

Fecha	26-11-2021
Trámite	Resolución
Descripción	Autos en relación
Observación	CÓDIGO C/2021/002831: TENGASE PRESENTE; : ESTESE A LO RESUELTO A CONTINUACION; AL SEGUNDO OTROSI: TENGASE PRESENTE LA DELEGACION..CÓDIGO C/2021/002906: TENGASE PRESENTE; ESTESE A LO RESUELTO A CONTINUACION, AUTOS EN RELACION.
N° de Oficio	

Documentos adjuntos

#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	1489-2021.pdf	CÓDIGO C/2021/002831: TENGASE PRESENTE; : ESTESE A LO RESUELTO A CONTINUACION; AL SEGUNDO OTROSI: TENGASE PRESENTE LA DELEGACION..CÓDIGO C/2021/002906: TENGASE PRESENTE; ESTESE A LO RESUELTO A CONTINUACION, AUTOS EN RELACION.	26-11-2021 10:02	Descarga

Fecha	21-04-2022
Trámite	Escrito
Descripción	Téngase presente
Observación	EN LO PRINCIPAL: Se tenga presente; EN EL OTROSÍ: Acompaña documento.
N° de Oficio	

Documentos adjuntos

#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	P00195 Se tenga presente con informe.pdf	Se tenga presente; Acompaña documento.	21-04-2022 18:02	Descarga

Fecha	25-04-2022
Trámite	Resolución
Descripción	Resolución con plantilla
Observación	CODIGO C/2022/004878: A LO PRINCIPAL: TENGASE PRESENTE EN LA VISTA DE LA CAUSA, AL OTROSI: POR ACOMPAÑADOS, CON CITACION.
N° de Oficio	

Documentos adjuntos

#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	1489-2021.pdf	CODIGO C/2022/004878: A LO PRINCIPAL: TENGASE PRESENTE EN LA VISTA DE LA CAUSA, AL OTROSI: POR ACOMPAÑADOS, CON CITACION.	25-04-2022 08:37	Descarga

Fecha	21-03-2023
Trámite	Escrito
Descripción	Téngase por suspendida la vista de la causa
Observación	EN LO PRINCIPAL: Suspensión vista de la causa; OTROSI: Acompaña documento que indica.
N° de Oficio	

Documentos adjuntos

#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	SUSPENSION DE LA VISTA DE LA CAUSA CBM Sol 674-2017 Rol 1489-2021.pdf	EN LO PRINCIPAL: Suspensión vista de la causa; OTROSI: Acompaña documento que indica.	21-03-2023 09:29	Descarga

Fecha	23-03-2023
Trámite	Resolución
Descripción	Resolución con plantilla
Observación	Código 9992: A lo principal: Como se pide a la suspensión de la vista de la causa; al otrosí: Por acompañado comprobante de consignación.
N° de Oficio	

Documentos adjuntos

#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	1489-2021.pdf		22-03-2023 15:39	Descarga

Fecha	22-03-2023
Trámite	Escrito
Descripción	Delegaciones
Observación	DELEGA PODER
N° de Oficio	

Documentos adjuntos

#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	DELEGA PODER CMB-DGF SOL. 674-2017.pdf	DELEGA PODER	22-03-2023 15:22	Descarga

Fecha	22-03-2023
Trámite	Escrito
Descripción	Anuncio

Observación	EN LO PRINCIPAL: SE ANUNCIA PARA ALEGATO; OTROSÍ: SOLICITUD QUE INDICA.			
N° de Oficio				
Documentos adjuntos				
#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	SE ANUNCIA DGF- SOL.674-2017.pdf	EN LO PRINCIPAL: SE ANUNCIA PARA ALEGATO; OTROSÍ: SOLICITUD QUE INDICA.	22-03-2023 15:22	Descarga

Fecha	22-03-2023			
Trámite	Escrito			
Descripción	Acompaña pliego de reivindicaciones			
Observación	Acompaña pliego de reivindicaciones			
N° de Oficio				
Documentos adjuntos				
#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	Acompaña Documento Solicitud 674-2017 Rol TPI 1489-2021.pdf	Acompaña pliego de reivindicaciones	22-03-2023 16:23	Descarga

Fecha	23-03-2023			
Trámite	Resolución			
Descripción	Resolución con plantilla			
Observación	Código 10030: Téngase presente la delegación de poder en favor de Daniela Guerrero Ferrada. Código 10031: A todo: Estése a lo resuelto en el código 9992 del escrito de fecha 21-03-2023.			
N° de Oficio				
Documentos adjuntos				
#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	1489-2021.pdf	Código 10030: Téngase presente la delegación de poder en favor de Daniela Guerrero Ferrada. Código 10031: A todo: Estése a lo resuelto en el código 9992 del escrito de fecha 21-03-2023.	22-03-2023 16:35	Descarga

Fecha	23-03-2023			
Trámite	Resolución			
Descripción	Resolución con plantilla			
Observación	Código 10033: Por acompañado con citación nuevo pliego de reivindicaciones.			
N° de Oficio				
Documentos adjuntos				

#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	1489-2021.pdf	Código 10033: Por acompañado con citación nuevo pliego de reivindicaciones.	22-03-2023 16:41	Descarga

Fecha	29-03-2023
Trámite	Escrito
Descripción	Téngase presente
Observación	EN LO PRINCIPAL: Se tenga presente; EN EL OTROSÍ: Acompaña documento.
N° de Oficio	

Documentos adjuntos

#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	P00195 Se tenga presente TPI (2).pdf	Se tenga presente; Acompaña documento.	29-03-2023 15:06	Descarga

Fecha	31-03-2023
Trámite	Resolución
Descripción	Resolución con plantilla
Observación	Código 1073: A lo principal: Téngase presente; al otrosí: Por acompañado con citación.
N° de Oficio	

Documentos adjuntos

#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	1489-2021.pdf	Código 1073: A lo principal: Téngase presente; al otrosí: Por acompañado con citación.	30-03-2023 13:24	Descarga

Fecha	03-04-2023
Trámite	Escrito
Descripción	Téngase presente
Observación	EN LO PRINCIPAL: Téngase presente; OTROSÍ: Acompaña documento con citación.
N° de Oficio	

Documentos adjuntos

#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	Tengase Presente Solicitud 674-2017 Rol TPI 1489-2021 compressed.pdf	EN LO PRINCIPAL: Téngase presente; OTROSÍ: Acompaña documento con citación.	03-04-2023 21:08	Descarga

Fecha	04-04-2023
Trámite	Escrito

Descripción	Anuncio			
Observación	EN LO PRINCIPAL: Se anuncia para alegato; OTROSI: Solicitud que indica.			
N° de Oficio				
Documentos adjuntos				
#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	Audiencia Alegatos CBM Sol. 674-2017 Rol 1489-2021.pdf	EN LO PRINCIPAL: Se anuncia para alegato; OTROSI: Solicitud que indica.	04-04-2023 19:51	Descarga

Fecha	05-04-2023			
Trámite	Escrito			
Descripción	Téngase por suspendida la vista de la causa			
Observación	EN LO PRINCIPAL: Solicita suspensión de la vista de la causa; EN EL OTROSÍ: Acompaña documento.			
N° de Oficio				
Documentos adjuntos				
#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	P00195 SuspensionVistaCausa.pdf	Solicita suspensión de la vista de la causa; Acompaña documento.	05-04-2023 09:59	Descarga

Fecha	06-04-2023			
Trámite	Resolución			
Descripción	Resolución con plantilla			
Observación	Código 10258: A lo principal: Téngase presente; al otrosí: Por acompañados con citación. Código 10290: A lo principal y otrosí: Estése a lo resuelto a continuación. Código 10298: A lo principal: Como se pide a la suspensión de la vista de la causa; al otrosí: Por acompañado.			
N° de Oficio				
Documentos adjuntos				
#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	1489-2021-.pdf	Código 10258: A lo principal: Téngase presente; al otrosí: Por acompañados con citación. Código 10290: A lo principal y otrosí: Estése a lo resuelto a continuación. Código 10298: A lo principal: Como se pide a la suspensión de la vista de la causa; a	05-04-2023 14:22	Descarga

Fecha	25-04-2023			
Trámite	Escrito			
Descripción	Delegaciones			
Observación				

N° de Oficio				
Documentos adjuntos				
#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	DELEGA PODER CBM-JFP SOL. 674-2017.pdf	DELEGA PODER	25-04-2023 16:34	Descarga
2	SE ANUNCIA JFP- SOL. 674-2017.pdf	SE ANUNCIA	25-04-2023 16:34	Descarga

Fecha	27-04-2023
Trámite	Resolución
Descripción	Medida para mejor resolver
Observación	Se cita a las partes a un comparendo de estilo para la designación del perito
N° de Oficio	

Documentos adjuntos				
#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	CITA AUDIENCIA DESIGNACION (A) 1489-2021.pdf	Se cita a las partes a un comparendo de estilo para la designación del perito	26-04-2023 09:45	Descarga

Fecha	27-04-2023
Trámite	Actuación
Descripción	Acuerdo
Observación	EN ACUERDO ANTE LOS MINISTROS, SR. MARCO ARELLANO QUIROZ, SRA. CARMEN IGLESIAS MUÑOZ Y SRA. PAMELA FITCH ROSSEL (SALA I) TURNO SRA. IGLESIAS M. RELATORA SRA. ANA MARIA TRONCOSO VEAS
N° de Oficio	

Fecha	26-04-2023
Trámite	Escrito
Descripción	Téngase presente
Observación	Se tenga presente.
N° de Oficio	

Documentos adjuntos				
#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	P00195 TéngasePresenteArgumentosAlegato.pdf	Se tenga presente.	26-04-2023 09:59	Descarga

Fecha	26-04-2023
Trámite	Escrito
Descripción	Anuncio

Observación	EN LO PRINCIPAL: Se anuncia; EN EL OTROSÍ: Solicitud que indica.			
N° de Oficio				
Documentos adjuntos				
#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	P00195 SeAnuncia.pdf	Se anuncia; Solicitud que indica.	26-04-2023 10:02	Descarga

Fecha	27-04-2023
Trámite	Resolución
Descripción	Resolución con plantilla
Observación	Código 10689: Téngase presente la delegación de poder en favor de Juan Peralta Inda. A lo principal: Téngase por anunciado; al otrosí: Como se pide a la solicitud de alegatos por videoconferencia. C/ 10696: Téngase presente. C/ 10697: A lo principal: Téngase por anunciado; al otrosí: Como se pide.
N° de Oficio	

Documentos adjuntos				
#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	1489-2021.pdf	Código 10689: Téngase presente la delegación de poder en favor de Juan Peralta Inda. A lo principal: Téngase por anunciado; al otrosí: Como se pide a la solicitud de alegatos por videoconferencia. C/ 10696: Téngase presente. C/ 10697: A lo principal:	26-04-2023 11:07	Descarga

Fecha	27-04-2023
Trámite	Actuación
Descripción	Certificado
Observación	Alegó por la revocación la Abogado MARIA TRINIDAD ROJAS WÜNKAUS por veinte minutos y por la confirmación el Abogado JUAN PERALTA INDA por quince minutos, ambos mediante video conferencia en la forma establecida en el Auto Acordado de este Tribunal de fecha 24 de marzo de 2020.
N° de Oficio	

Fecha	02-05-2023
Trámite	Escrito
Descripción	Anuncio
Observación	EN LO PRINCIPAL: Se anuncia; EN EL OTROSÍ: Solicitud que indica.
N° de Oficio	

Documentos adjuntos				
#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	P00195 AnunciaComparendoNombramientoPerito.pdf	Se anuncia; Solicitud que indica.	02-05-2023 10:40	Descarga

Fecha	02-05-2023			
Trámite	Escrito			
Descripción	Anuncio			
Observación				
N° de Oficio				
Documentos adjuntos				
#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	SE ANUNCIA JFP- SOL. 674-2017 designacion de perito.pdf	SE ANUNCIA	02-05-2023 16:02	Descarga

Fecha	03-05-2023			
Trámite	Resolución			
Descripción	Resolución con plantilla			
Observación	Códigos 10757 y 10784: A lo principal y otrosí: Como se pide.			
N° de Oficio				
Documentos adjuntos				
#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	1489-2021.pdf	Códigos 10757 y 10784: A lo principal y otrosí: Como se pide.	02-05-2023 16:31	Descarga

Fecha	03-05-2023			
Trámite	Resolución			
Descripción	Medida para mejor resolver			
Observación	M.M.R. Désígnese Perito A Don Pablo Cañón Amengual, Bioquímico			
N° de Oficio				
Documentos adjuntos				
#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	MMR 001476-2021REV.pdf	M.M.R. Désígnese Perito A Don Pablo Cañón Amengual, Bioquímico	03-05-2023 11:17	Descarga

Fecha	03-05-2023			
Trámite	Resolución			
Descripción	Resolución con plantilla			
Observación	Acta audiencia designación de perito			
N° de Oficio				
Documentos adjuntos				
#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	1489-2021 (1).pdf	Acta	03-05-2023 11:36	Descarga

Fecha	04-05-2023			
Trámite	Resolución			
Descripción	Otros			
Observación	Artículo 84 del Código de Procedimiento Civil, déjese sin efecto la medida para mejor resolver notificada el 03-05-2023			
N° de Oficio				
Documentos adjuntos				
#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	RECT OFICIO NOTIFICA MMR.pdf	r	04-05-2023 10:46	Descarga

Fecha	04-05-2023			
Trámite	Resolución			
Descripción	Medida para mejor resolver			
Observación	M.M.R. Désígnese Perito A Don Pablo Cañón Amengual, Bioquímico			
N° de Oficio				
Documentos adjuntos				
#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	MMR1489-2021 F.pdf	R	04-05-2023 10:54	Descarga

Fecha	05-05-2023			
Trámite	Resolución			
Descripción	Resolución con plantilla			
Observación	No habiéndose notificado las resoluciones de fecha 04-05-2023 folios 33 y 34, en la referida fecha por estado diario, procédase a su notificación conjuntamente con la presente resolución.			
N° de Oficio				
Documentos adjuntos				
#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	1489-2021.pdf	No habiéndose notificado las resoluciones de fecha 04-05-2023 folios 33 y 34, en la referida fecha por estado diario, procédase a su notificación conjuntamente con la presente resolución.	05-05-2023 08:39	Descarga

Fecha	09-05-2023		
Trámite	Escrito		
Descripción	Pago peritaje		
Observación	Acredita pago de honorarios periciales y acompaña comprobante de transferencia de fondos.		

N° de Oficio				
Documentos adjuntos				
#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	P00195 PagoPeritaje TPI.pdf	Acredita pago de honorarios periciales y acompaña comprobante de transferencia de fondos.	09-05-2023 13:50	Descarga

Fecha	10-05-2023
Trámite	Resolución
Descripción	Resolución con plantilla
Observación	C/2023/010914 Agréguese a sus autos comprobante de transferencia por honorario pericial
N° de Oficio	

Documentos adjuntos				
#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	RESULEVE PAGO.pdf	Agréguese a sus autos comprobante de transferencia por honorario pericial	09-05-2023 14:58	Descarga

Fecha	10-05-2023
Trámite	Resolución
Descripción	Resolución con plantilla
Observación	Juramento
N° de Oficio	

Documentos adjuntos				
#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	Juramento PC.pdf	Juramento	10-05-2023 08:01	Descarga

Fecha	10-05-2023
Trámite	Resolución
Descripción	Resolución con plantilla
Observación	A sus autos juramento
N° de Oficio	

Documentos adjuntos				
#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	RESUELVE JURAMENTO.pdf	A sus autos juramento	10-05-2023 08:05	Descarga

Fecha	16-10-2023
Trámite	Escrito

Descripción	Presentación informe pericial			
Observación	Informe Pericial			
N° de Oficio				
Documentos adjuntos				
#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	Rol TDPI 1489-21 (Sol.INAPI 20170064)F.pdf	IP	16-10-2023 08:41	Descarga

Fecha	16-10-2023			
Trámite	Resolución			
Descripción	Resolución con plantilla			
Observación	C/2023/013543 A sus autos el informe pericial. póngase en conocimiento de la(s) parte(s).			
N° de Oficio				

Documentos adjuntos				
#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	NOTIFICA INFORME.pdf	A sus autos el informe pericial. póngase en conocimiento de la(s) parte(s).	16-10-2023 08:45	Descarga

Fecha	20-10-2023			
Trámite	Escrito			
Descripción	Contesta informe pericial			
Observación				
N° de Oficio				

Documentos adjuntos				
#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	Observa pericial Sol 201700674.pdf	OBSERVA INFORME PERICIAL	20-10-2023 15:59	Descarga

Fecha	24-10-2023			
Trámite	Resolución			
Descripción	Resolución con plantilla			
Observación	C/2023/013668 Téngase presente observaciones. Se fija audiencia pericial pública, a través de video conferencia.			
N° de Oficio				

Documentos adjuntos				
#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	FIJA AUDIENCIA.pdf	Téngase presente observaciones. Se fija audiencia pericial pública, a través de video conferencia.	23-10-2023 12:13	Descarga

Fecha	25-10-2023
Trámite	Resolución
Descripción	Resolución con plantilla
Observación	No habiéndose notificado la resolución de fecha 24-10-2023, en la referida fecha por estado diario, procédase a su notificación conjuntamente con la presente resolución
N° de Oficio	

Documentos adjuntos

#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	DESFASE4.pdf	No habiéndose notificado la resolución de fecha 24-10-2023, en la referida fecha por estado diario, procédase a su notificación conjuntamente con la presente resolución	25-10-2023 10:14	Descarga

Fecha	31-10-2023
Trámite	Resolución
Descripción	Otros
Observación	Con la cuenta pública y lo informado por el perito Sr. Pablo Cañón Amengual se tiene por evacuado el informe pericial en los términos ordenado en autos. Rija el estado de acuerdo. Oficiese para efectos del pago de los honorarios.
N° de Oficio	

Documentos adjuntos

#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	1489-2021.pdf	RESOLUCION	30-10-2023 10:26	Descarga

Fecha	31-10-2023
Trámite	Actuación
Descripción	Acuerdo
Observación	En acuerdo ante Ministro el ministro Sr. Marco Arellano Quiroz y las Ministras Sra. Carmen Iglesias Muñoz y Sra. Pamela Fitch Rossel. Turno Sra. Iglesias.
N° de Oficio	

Fecha	30-10-2023
Trámite	Escrito
Descripción	Anuncio
Observación	
N° de Oficio	

Documentos adjuntos

#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	SE ANUNCIA PERICIAL JFP EUROPHARMA.pdf	SE ANUNCIA PERICIAL	30-10-2023 15:00	Descarga

Fecha	30-10-2023
Trámite	Escrito
Descripción	Anuncio
Observación	Se anuncia para asistir a audiencia pública.
N° de Oficio	

Documentos adjuntos

#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	P00195 AnunciaAudienciaPericial.pdf	Se anuncia para asistir a audiencia pública.	30-10-2023 17:35	Descarga

Fecha	31-10-2023
Trámite	Resolución
Descripción	Resolución con plantilla
Observación	Códigos 13808 y 13814: Como se pide.
N° de Oficio	

Documentos adjuntos

#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	1489-2021.pdf	Códigos 13808 y 13814: Como se pide.	31-10-2023 07:19	Descarga

Fecha	31-10-2023
Trámite	Actuación
Descripción	Certificado
Observación	Se deja constancia que a la hora señalada en autos se realizó la audiencia pericial con la participación del perito Sr. Pablo Cañón Amengual.
N° de Oficio	

Fecha	31-10-2023
Trámite	Actuación
Descripción	Certificado
Observación	Se deja constancia de la participación de la abogada María Trinidad Rojas Wunkhaus en la audiencia pericial pública.
N° de Oficio	

Fecha	31-10-2023
Trámite	Actuación

Descripción	Certificado
Observación	Se deja constancia de la participación del abogado Juan Peralta Inda en la audiencia pericial pública.
N° de Oficio	

Fecha	07-12-2023
Trámite	Resolución
Descripción	Sentencia
Observación	SENTENCIA REVOCADA PARCIAL
N° de Oficio	

Documentos adjuntos

#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	PI 001489-2021 (revoca parcial).pdf	RESOLUCION	07-12-2023 12:14	Descarga

Fecha	11-12-2023
Trámite	Escrito
Descripción	Rectificación
Observación	RECURSO DE ACLARACIÓN, RECTIFICACIÓN O ENMIENDA.
N° de Oficio	

Documentos adjuntos

#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	P00195 RecursoAclaración TPI.pdf	RECURSO DE ACLARACIÓN, RECTIFICACIÓN O ENMIENDA.	11-12-2023 13:53	Descarga

Fecha	12-12-2023
Trámite	Resolución
Descripción	Resolución con plantilla
Observación	Código 14560: Dese cuenta en sala del recurso de aclaración rectificación o enmienda.
N° de Oficio	

Documentos adjuntos

#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	1489-2021-.pdf	Código 14560: Dese cuenta en sala del recurso de aclaración rectificación o enmienda.	11-12-2023 16:21	Descarga

Fecha	26-12-2023
Trámite	Escrito
Descripción	Casación

Observación	EN LO PRINCIPAL: Deduce recurso de casación en el fondo; PRIMERO OTROSI: Casación de oficio; SEGUNDO OTROSI: Asume patrocinio y poder; TERCER OTROSI: Acompaña documentos con citación			
N° de Oficio				
Documentos adjuntos				
#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	Recurso Casacion Europharma Solicitud 674-2017 .pdf	EN LO PRINCIPAL: Deduce recurso de casación en el fondo; PRIMERO OTROSI: Casación de oficio; SEGUNDO OTROSI: Asume patrocinio y poder; TERCER OTROSI: Acompaña documentos con citación	26-12-2023 15:50	Descarga

Fecha	28-12-2023			
Trámite	Resolución			
Descripción	Resolución con plantilla			
Observación	Código 14806: Dese cuenta en sala del recurso de casación en el fondo.			
N° de Oficio				
Documentos adjuntos				
#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	1489-2021--.pdf	Código 14806: Dese cuenta en sala del recurso de casación en el fondo.	27-12-2023 13:45	Descarga

Fecha	28-12-2023			
Trámite	Resolución			
Descripción	Otros			
Observación	Resolviendo el recurso de 11-12-2023, ha lugar a la rectificación.			
N° de Oficio				
Documentos adjuntos				
#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	1489-2021.pdf	RESOLUCION	28-12-2023 11:40	Descarga

Fecha	29-12-2023			
Trámite	Escrito			
Descripción				
Observación	RECURSO DE ACLARACIÓN, RECTIFICACIÓN O ENMIENDA.			
N° de Oficio				

Fecha	29-12-2023			
Trámite	Escrito			

Descripción	Rectificación			
Observación	RECURSO DE ACLARACIÓN, RECTIFICACIÓN O ENMIENDA			
N° de Oficio				
Documentos adjuntos				
#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	P00195 RecursoAclaración TPI(2).pdf	RECURSO DE ACLARACIÓN, RECTIFICACIÓN O ENMIENDA	29-12-2023 12:23	Descarga

Fecha	02-01-2024			
Trámite	Resolución			
Descripción	Resolución con plantilla			
Observación	Código 14859: Dese cuenta en sala del recurso de aclaración, rectificación o enmienda.			
N° de Oficio				

Documentos adjuntos				
#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	1489-2021...pdf	Código 14859: Dese cuenta en sala del recurso de aclaración, rectificación o enmienda.	02-01-2024 07:50	Descarga

Fecha	03-01-2024			
Trámite	Resolución			
Descripción	Otros			
Observación	Ha lugar a la rectificación solicitada.-			
N° de Oficio				

Documentos adjuntos				
#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	1489-2021.pdf	RESOLUCION	03-01-2024 07:45	Descarga

Fecha	04-01-2024			
Trámite	Resolución			
Descripción	Por interpuesto recurso de casación			
Observación	Por interpuesto recurso de casación en el fondo.			
N° de Oficio				

Documentos adjuntos				
#	Nombre Documento	Descripción	Fecha Carga	Descarga
1	1489-2021.....pdf	Por interpuesto recurso de casación en el fondo.	03-01-2024 16:36	Descarga

Rol TdPI : 1489-2021
Solicitud : 201700674
Patente de Invención

EN LO PRINCIPAL: Se hace parte; **EN EL PRIMER OTROSÍ:** Solicita alegato; **EN EL SEGUNDO OTROSÍ:** Delega poder.

H. TRIBUNAL DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

Luis Felipe Claro Swinburn, en representación de la oponente y apelante Biomar Chile S.A., en el expediente de la solicitud de patente de invención N° 201700674, rol N° 1489-2021, al H. Tribunal de Propiedad Industrial respetuosamente digo:

Que, en la representación que invisto, vengo en hacerme parte en el recurso de apelación interpuesto contra la resolución de primera instancia en estos autos.

POR TANTO,

al H. Tribunal de Propiedad Industrial respetuosamente pido:

Tenerme por hecho parte en el recurso de apelación antedicho, representando a Biomar Chile S.A.

PRIMER OTROSÍ: Con el objeto de poder exponer de mejor manera los antecedentes del presente caso, vengo en solicitar a este H. Tribunal se me permita presentar alegato oral en representación de la apelante, durante la vista de la causa.

SEGUNDO OTROSÍ: Vengo en delegar el poder con que actúo en estos autos en la abogada habilitada doña María Trinidad Rojas Wünkhaus, de mi mismo domicilio, quien firma en señal de

aceptación y con quien podremos actuar conjunta o separadamente.

P00195 Se hace parte - Delega 4858-6183-8084 v.1.docx



EN LO PRINCIPAL: SE HACE PARTE;

PRIMER OTROSÍ: SOLICITA ALEGATOS;

SEGUNDO OTROSÍ: ACREDITA PERSONERÍA Y ACOMPAÑA DOCUMENTOS.

TERCER OTROSÍ: ASUME PATROCINIO Y PODER.

H. Tribunal de Propiedad Industrial

CRISTIÁN BARROS MICHELL, abogado habilitado para el ejercicio de la profesión, cédula de identidad 13.658.156-2, domiciliado en Avenida Andrés Bello 2711, piso 19, Las Condes, Santiago, en representación de **EUROPHARMA AS**, en los antecedentes sobre la solicitud de patente de invención N° 674-2017, a Ud. respetuosamente digo:

Que vengo en hacerme parte en el recurso de apelación interpuesto por BIOMAR CHILE S.A.

POR TANTO,

RUEGO a este Honorable Tribunal de Propiedad Industrial se sirva tener a mi representada como parte en este recurso.

PRIMER OTROSÍ: A este Honorable Tribunal pido en virtud del art. 199 inc. 1° del Código de Procedimiento Civil se sirva decretar alegatos para la presente causa.

POR TANTO,

RUEGO a este Honorable Tribunal de Propiedad Industrial se sirva decretar alegatos para la presenta causa.

SEGUNDO OTROSÍ: Solicito a UD. tener presente que mi personería para actuar por **EUROPHARMA AS** consta en el poder que se encuentra enrolado en el INAPI con el folio N° **87957** y en la copia de la delegación de poder de Sargent & Krahn enrolada en INAPI bajo el N° **38562** complementado mediante la copia de delegación y revocación de poderes enrolada en INAPI bajo el folio N° **77764**, copias de las cuales también se acompañan en esta presentación.

POR TANTO,

RUEGO a este Honorable Tribunal de Propiedad Industrial, tener por acreditada mi personería, y por acompañados los documentos individualizados en este otrosí.

TERCER OTROSI: Ruego a Ud. tener presente que, en mi calidad de abogado habilitado para el ejercicio de la profesión, vengo en asumir patrocinio y poder en estos autos, donde actuaré personalmente, sin perjuicio de eventuales delegaciones futuras.

POR TANTO,

RUEGO a este Honorable Tribunal de Propiedad Industrial, tenerlo presente.



87957

RECIBO DE CUSTODIA DE PODER O PERSONERIA

N° de Poder: 87957

Santiago, 11 de mayo de 2017

El Instituto Nacional de Propiedad Industrial - INAPI - acredita haber recibido con esta fecha el documento que el solicitante ha registrado como Poder con la siguiente información:

Solicitante o Titular

RUT : No disponible
Nombre : EJROPHARMA AS
País : NORUEGA
E-mail : sargent@sgent.cl

Representante

RUT : 79.713.300-0
Nombre : SARGENT & KRAHN
E-mail : sargent@sgent.cl

El número asignado deberá ser indicado por el interesado en el casillero "N° de Poder" en el Formulario de cada solicitud impresa o electrónica. Es responsabilidad del solicitante o del titular informar a INAPI todo cambio en la persona de su representante.

Este recibo no certifica la validez del poder ni su pertinencia a el/los caso(s) en que posteriormente se desee invocar. En consecuencia, INAPI revisará caso a caso el cumplimiento de los requisitos formales y de fondo según el tipo de actuación de que se trate.



INSTITUTO NACIONAL DE PROPIEDAD INDUSTRIAL Santiago, 11 de mayo de 2017 (10:17:19)

A-38391

MANDATO ESPECIAL / SPECIAL POWER OF ATTORNEY

PARA / TO

SARGENT & KRAHN

El (los) suscrito(s) _____

(The undersigned)

en representación de EUROPHARMA AS

(on behalf of)

("the Company")

domiciliado(s) en P.O Box 344, N-8376 Leknes, Noruega

(with its domicile at)

confieren mandato especial a la firma SARGENT & KRAHN, quien ejercerá este mandato a través de sus apoderados, para que represente a la Compañía en CHILE en todos los asuntos relacionados con marcas comerciales, patentes, modelos de utilidad, diseños y dibujos industriales, esquemas de trazado o topografías de los circuitos integrados, indicaciones geográficas y denominaciones de origen, secretos empresariales y de la información no divulgada, variedades vegetales, derechos de autor y nombres de dominio (en adelante referidos colectivamente como "Derechos de Propiedad Industrial e Intelectual"), facultando a SARGENT & KRAHN especialmente para:

- A.- 1) solicitar y tramitar ante las autoridades correspondientes la obtención, renovación, modificación y transferencia de Derechos de Propiedad Industrial e Intelectual;
- 2) deducir oposiciones y demandas de nulidad o cancelación;
- 3) Presentar solicitudes de anotación de todo tipo, incluyendo pero no limitadas a transferencias, cambios de nombre, cambios de domicilio, gravámenes, prohibiciones, cancelaciones o limitaciones voluntarias, licencias;
- 4) presentar toda clase de peticiones, declaraciones, protestas, reclamos y toda clase de recursos;
- 5) presentar evidencias de uso y explotaciones;
- 6) pagar impuestos, derechos fiscales, honorarios y anualidades;
- 7) recibir documentos, títulos y certificados;

grant(s) special power of attorney to the firm SARGENT & KRAHN to execute this power of attorney through its attorneys, to represent the Company in CHILE in all matters concerning trademarks, patents, utility models, industrial designs and drawings, layout-designs or topographies of integrated circuits, geographical indications and denominations of origin, protection of trade secrets and undisclosed information, plant varieties, copyrights and domain names (hereinafter collectively referred to as "Industrial and Intellectual Property Rights"), empowering SARGENT & KRAHN, in particular to:

- A.- 1) file and prosecute applications before the competent authorities to obtain, renew, modify and transfer Industrial and Intellectual Property Rights;
- 2) lodge oppositions and cancellation or invalidation proceedings;
- 3) file applications to record all kind of annotations including but not limited to assignments, change of name, change of domicile, liens, encumbrances, prohibitions, voluntary cancellations or restrictions and licenses;
- 4) file all kind of petitions, declarations, protests, complaints and all kind of recourses;
- 5) file evidences of use and exploitations;
- 6) pay taxes, government fees, fees and annuities.
- 7) receive documents, titles and certificates;
- 8) limit, modify and withdraw, totally or partially.

8) limitar, modificar y desistir, total o parcialmente, solicitudes en trámite;

9) actuar ante autoridades y/o tribunales administrativos, judiciales, ordinarios, especiales y arbitrales, con facultad para entablar toda clase de acciones y recursos civiles y criminales, desistir de las acciones deducidas, contestar y aceptar demandas, renunciar los recursos y los términos legales, transigir, comprometer, otorgar a los árbitros facultades de arbitadores;

10) designar abogado patrocinante, otorgar mandato judicial y revocar dichas designaciones y mandatos;

11) Delegar total o parcialmente este poder o ejercerlo por medio de delegados designados anteriormente o que se designen en lo futuro;

12) conferir al delegado facultades para subdelegar y revocar las delegaciones; y

B.- 1) comprar, aceptar y adquirir Derechos de Propiedad Industrial e Intelectual en representación de la Compañía;

2) vender, ceder y transferir, total o parcialmente, Derechos de Propiedad Industrial e Intelectual de la Compañía;

3) constituir gravámenes y prohibiciones sobre Derechos de Propiedad Industrial e Intelectual de la Compañía;

4) otorgar licencias y celebrar toda clase de contratos relacionados con Derechos de Propiedad Industrial e Intelectual de la Compañía;

5) pagar, cobrar y percibir los precios de cesiones y las regalías provenientes de licencias relacionadas con Derechos de Propiedad Industrial e Intelectual de la Compañía.

Los mandatarios, delegados y subdelegados ("Los Apoderados") deberán obrar de acuerdo con las instrucciones por escrito que les otorgue la Compañía. Dichas instrucciones mirarán sólo a las relaciones de ésta con aquéllos, pues los Apoderados se entenderán autorizados para obrar libremente ante terceros.

pending applications;

9) act before administrative, judicial, ordinary, special and arbitrator authorities and/or courts (law courts and courts of arbitration), with power to institute all kind of proceedings, civil and criminal actions and recourses, withdraw the referred actions and recourses, respond actions, accept actions, waive recourses and legal terms, settle, to accept and/or appoint arbitrators, convey upon arbitrators the authority to act *ex aequo et bono*;

10) appoint legal attorneys, grant judicial powers and revoke such appointments and powers;

11) delegate all or part of this power of attorney or act through substitutes previously appointed or being appointed in the future;

12) empower substitutes to subdelegate and to revoke the substitutions; and

B.- 1) purchase, accept and acquire Industrial and Intellectual Property Rights on behalf of the Company;

2) sell, assign and transfer, totally or in part, Industrial and Intellectual Property Rights of the Company;

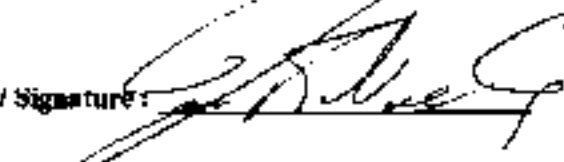
3) accept liens, encumbrances and prohibitions on Industrial and Intellectual Property Rights of the Company;

4) grant licenses and execute all kind of contracts in connection with Industrial and Intellectual Property Rights of the Company;

5) pay, collect and receive the assignment prices and the royalties on licenses in connection with Industrial and Intellectual Property Rights of the Company.

The attorneys, their substitutes and subdelegates ("the Attorneys") must act in accordance with written instructions given to them by the Company. These instructions shall concern only the relations between the Company and the Attorneys, since the Attorneys shall be considered as authorized to proceed freely before third parties

Fecha / Date: 28.04.2017

Firma / Signature: 
JIM-ROGER NODDY

NOTA 1: La Compañía puede borrar en todo o parte las facultades del párrafo B.-, no así las del párrafo A.- que son indispensables.

NOTE 1: The Company may delete all or some of the powers of paragraph B.-, but not the powers included in paragraph A.- which are essential.

EDUARDO AVELLO CONCHA
NOTARIO PÚBLICO
Orrego Luco 0153 Fono 26200400
Providencia
aconchas@notaria-avello.cl



REPERTORIO: 2.706-2.014

DESIGNACIÓN DE APODERADOS

Y

REVOCACIÓN DE PODERES

SARGENT & KRAHN y otros



En Santiago de Chile, a treinta de enero de dos mil catorce, ante mí, EDUARDO AVELLO CONCHA, Abogado, Notario Público Titular de la Vigésimo Séptima Notaría de Santiago, con oficio en calle Orrego Luco cero ciento cincuenta y tres, Providencia, comparecen: JOSÉ LUIS LETELIER AZZARI, chileno, casado, abogado, cédula nacional de identidad número seis millones ochocientos noventa mil sesenta guión tres y ALFREDO DOMINGO MONTANER LEWIN, chileno, soltero, abogado, cédula nacional de identidad número seis millones novecientos ochenta y nueve mil seiscientos noventa y ocho guión siete, ambos por sí y en su calidad de socios y en representación de SARGENT & KRAHN; GERARDO VARELA ALFONSO, chileno, casado, abogado, cédula nacional de identidad número seis millones trescientos cincuenta y seis mil novecientos setenta y dos guión cero; SERGIO DIEZ ARRIAGADA, chileno, casado, abogado, cédula nacional de identidad número seis millones seiscientos cincuenta y cinco mil trescientos setenta y ocho guión siete; SEBASTIAN OBACH GONZALEZ, chileno, casado, abogado, cédula nacional de identidad número cuatro millones novecientos



cincuenta mil novecientos cincuenta y dos guión nueve y **CARLOS PEREZ-COTAPOS SUBERCASEAUX**, chileno, casado, abogado, cédula nacional de identidad número siete millones diecisiete mil doscientos ochenta y ocho guión siete, todos domiciliados para estos efectos en Avenida Andrés Bello número dos mil setecientos once, piso diecinueve, de la Comuna de Las Condes, Región Metropolitana; mayores de edad, quienes acreditan su identidad con las cédulas ya citadas y exponen: **PRIMERO:** La firma **SARGENT & KRAHN PROCURADORES INTERNACIONALES DE PATENTES Y MARCAS LIMITADA**, cuyo nombre de fantasta es "SARGENT & KRAHN", es la mandataria de sus clientes para representarlos en asuntos relacionados con marcas comerciales, patentes, modelos de utilidad, diseños y dibujos industriales, esquemas de trazado o topografías de los circuitos integrados, indicaciones geográficas y denominaciones de origen, secretos empresariales y de la información no divulgada, variedades vegetales, derechos de autor, nombres de dominio y otras materias relacionadas directa o indirectamente con propiedad intelectual (en adelante referidos colectivamente como "Derechos de Propiedad Industrial e Intelectual"), mandato que se debe ejercer a través de los apoderados de **SARGENT & KRAHN**. **SEGUNDO:** Por este acto **JOSÉ LUIS LETELIER AZZARI** y **ALFREDO DOMINGO MONTANER LEWIN**, ambos en representación de **SARGENT & KRAHN**, vienen en designar apoderados a los señores **JOSÉ LUIS LETELIER AZZARI**, **ALFREDO DOMINGO MONTANER LEWIN**, **CARLOS PUELMA ALLENDE**, **MARIA LUISA VALDES STEEVES**, **JUAN PABLO EGAÑA BERTOGLIA**, **RODRIGO**

EDUARDO AVELLO CONCHA
NOTARIO PÚBLICO
Orengo Luco 0153 Fono 26200400
Providencia
aorconas@notaria-avello.cl

SEBASTIAN LAVADOS MACKENZIE, MATIAS SOMARRIVA LABRA, EDUARDO ALEJANDRO LOBOS VAJOVIC, PABLO CARIOLA CUBILLOS, MARIA JOSEFINA MORA ARIAS y CRISTIAN KENNETH BARROS MICHELL, quienes podrán actuar conjunta o indistintamente, para los efectos de representar a los mandantes y clientes actuales o futuros de SARGENT & KRAHN y a ésta última, ante el Instituto Nacional de Propiedad Industrial INAPI, el Tribunal de Propiedad Industrial, Tribunales ordinarios, inclusive Cortes de Apelaciones y Corte Suprema, Tribunales especiales, Tribunales arbitrales, Servicio Agrícola y Ganadero, Instituto de Salud Pública, Departamento de Ciencias de la Computación de la Universidad de Chile y ante cualquier otra autoridad, tribunal u organismo público o privado, que fuere necesario, sea en tramitaciones administrativas o en cuestiones contenciosas relacionadas con Derechos de Propiedad Industrial e Intelectual, salvo aquellas materias a que se refiere la cláusula tercera del presente instrumento. En el ejercicio de la designación a que se refiere esta cláusula, estos apoderados estarán facultados, sin que la enumeración siguiente sea taxativa, para: Uno) solicitar y tramitar ante las autoridades correspondientes la obtención, renovación, modificación y transferencia de Derechos de Propiedad Industrial e Intelectual; Dos) deducir oposiciones y demandas de nulidad o cancelación; Tres) presentar solicitudes de anotación de todo tipo, incluyendo pero no limitadas a transferencias, cambios de nombre, cambios de domicilio, gravámenes, prohibiciones, cancelaciones o limitaciones voluntarias, licencias; Cuatro) presentar toda clase de peticiones,




declaraciones, protestas, reclamos y toda clase de recursos; Cinco) presentar evidencias de uso y explotaciones; Seis) pagar impuestos, derechos fiscales, honorarios y anualidades; Siete) recibir documentos, títulos y certificados; Ocho) limitar, modificar y desistir, total o parcialmente, solicitudes en trámite; Nueve) actuar ante autoridades y/o tribunales administrativos, judiciales, ordinarios, especiales y arbitrales, con facultad para entablar toda clase de acciones y recursos civiles y criminales, desistir de las acciones deducidas, contestar y aceptar demandas, renunciar los recursos y los términos legales, transigir, comprometer, otorgar a los árbitros facultades de arbitrajes; Diez) designar abogado patrocinante, otorgar mandato judicial y revocar dichas designaciones y mandatos; Once) Delegar total o parcialmente este poder o ejercerlo por medio de delegados designados anteriormente o que se designen en lo futuro; Doce) revocar las delegaciones. TERCERO: Por este acto JOSÉ LUIS LETELIER AZZARI y ALFREDO DOMINGO MONTANER LEWIN ambos en representación de SARGENT & KRAHN, vienen en designar apoderados a los señores JOSÉ LUIS LETELIER AZZARI, ALFREDO DOMINGO MONTANER LEWIN, CARLOS PUELMA ALLENDE, MARIA LUISA VALDES STEEVES, JUAN PABLO EGAÑA BERTOGLIA y RODRIGO SEBASTIAN LAVADOS MACKENZIE quienes podrán actuar conjunta o indistintamente, para los efectos de representar a los mandantes y clientes actuales y futuros de SARGENT & KRAHN, en los siguientes actos y contratos: Uno) comprar, aceptar y adquirir Derechos de Propiedad Industrial e Intelectual; Dos) vender, ceder y transferir, total o parcialmente, Derechos de Propiedad Industrial e

Intelectual; Tres) constituir gravámenes y prohibiciones sobre Derechos de Propiedad Industrial e Intelectual; Cuatro) otorgar licencias y celebrar toda clase de contratos relacionados con Derechos de Propiedad Industrial e Intelectual; Cinco) pagar, cobrar y percibir los precios de cesiones y las regalías provenientes de licencias relacionadas con Derechos de Propiedad Industrial e Intelectual. CUARTO: JOSÉ LUIS LETELIER AZZARI y ALFREDO DOMINGO MONTANER LEWIN, ambos en representación de SARGENT & KRAHN, declaran que las designaciones de apoderados a que se refieren las cláusulas segunda y tercera del presente instrumento no revocan designaciones anteriores, a excepción de aquellas mencionadas en la cláusula siguiente. QUINTO: Uno. Por este acto, JOSÉ LUIS LETELIER AZZARI y ALFREDO DOMINGO MONTANER LEWIN, ambos por sí y en representación de SARGENT & KRAHN y los señores SEBASTIAN OBACH GONZALEZ y GERARDO VARELA ALFONSO, actuando éstos últimos por sí, vienen en revocar los mandatos y poderes conferidos por escritura pública de uno de junio de mil novecientos noventa y nueve ante el Notario Público de Santiago don Raul Undurraga Laso a Sebastián Oddó Gómez, Oscar Ferrari García, Luis Felipe Bahamondez Prieto, Andrés Fernandez Alemany, Ignacio Arteaga Echeverría, Alvaro Ramirez Molina, María Gracia Cariola Cubillos, Alvaro Cuevas Manríquez, Isabel Sainz Lobo, José Miguel Gana Eguiguren, Nicolai Bakovic Hudig, Matías Zegers Ruiz-Tagle, Diego Valenzuela Dellafori, Sebastián Vivanco Silva, Tomás Lange Guillén, Jorge Martínez Cornejo y Andrés Correo



Rosado. Dos. Por este acto, JOSÉ LUIS LETELIER AZZARI y ALFREDO DOMINGO MONTANER LEWIN, ambos por sí y en representación de SARGENT & KRAHN y los señores SEBASTIAN OBACH GONZALEZ, GERARDO VARELA ALFONSO, SERGIO DIEZ ARRIAGADA y CARLOS PEREZ-COTAPOS SUBERCASEAUX actuando éstos últimos por sí, vienen en revocar los mandatos y poderes conferidos por escritura pública de catorce de enero de dos mil ante el Notario Público de Santiago don Iván Torrealba Acevedo a Sebastián Oddó Gómez, Ignacio Arteaga Echeverría, Isabel Sainz Lobo, José Miguel Gana Eguiguren, Matías Zegers Ruiz-Tagle, Diego Valenzuela Dellafiori, Jorge Martínez Cornejo, Carmen Paz Álvarez Enriquez y Patricio de la Barra Gil. SEXTO: Se faculta al portador de copia autorizada de la presente escritura para requerir las inscripciones y anotaciones que procedan. La personería de José Luis Letelier Azzari y Alfredo Domingo Montaner Lewin para representar a Sargent & Krahn consta de la escritura pública de dos de noviembre de dos mil seis otorgada ante el Notario Público de Santiago Eduardo Avello Concha Escritura redactada conforme a minuta del Abogado Alfredo Montaner Lewin. En comprobante y previa lectura, firman los comparecientes. Se da copia. DOY FE.


JOSÉ LUIS LETELIER AZZARI


ALFREDO DOMINGO MONTANER LEWIN

Ambos por sí y p.p.SARGENT & KRAHN

EDUARDO AVELLO CONCHA
NOTARIO PÚBLICO
Orrego Lazo 0153 Fono 26200400
Providencia
aconcha@notaria-avello.cl



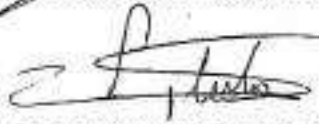
GERARDO VARELA ALFONSO



SERGIO DIEZ ARRIAGADA



SEBASTIAN OBACH GONZALEZ



CARLOS PEREZ-COTAPOS SUBERCASEAUX



Repertorio: 2706-2014
O.T. 614028



ESTA COPIA ES TESTIMONIO FIEL DEL ORIGINAL

Santiago, 5 FEB 2014



A-38192

TESTIMONIO DE LA ESCRITURA DE

(R.M.S.)

REPERTORIO: 3
O.I

REVOCACIÓN DE PODERES

Y

DESIGNACIÓN DE APODERADOS

SARGENT & KRAHN PROCURADORES

INTERNACIONALES DE PATENTES Y MARCAS LIMITAD

A

MARIA LUCA MALDONADO ESTEVES Y OTROS

EDUARDO AVELLO CONCHA
NOTARIO PUBLICO

ORREGO LUCO NORTE 0153 FONDO: 226200400 - FAX: 226200437
PROVIDENCIA - SANTIAGO - CHILE



REPERTORIO: 31.463-2.016
O.T. 1.015.203

REVOCACIÓN DE PODERES

Y

DESIGNACIÓN DE APODERADOS

SARGENT & KRAHN PROCURADORES



INTERNACIONALES DE PATENTES Y MARCAS LIMITADA

A

MARIA LUISA VALDES STEEVES Y OTROS


En Santiago de Chile, a dieciocho de octubre de dos mil dieciséis, ante mí, EDUARDO AVELLO CONCHA, Abogado, Notario Público Titular de la Vigésimo Séptima Notaría de Santiago, con oficio en calle Orrego Luco cero ciento cincuenta y tres, Providencia, comparecen: JOSÉ LUIS LETELIER AZZARI, chileno, casado, abogado, cédula nacional de identidad número seis millones ochocientos noventa mil sesenta guión tres y ALFREDO DOMINGO MONTANER LEWIN, chileno, soltero, abogado, cédula nacional de identidad número seis millones novecientos ochenta y nueve mil seiscientos noventa y ocho guión siete, en su calidad de socios y en representación de SARGENT & KRAHN PROCURADORES INTERNACIONALES DE PATENTES Y MARCAS LIMITADA Rol Único Tributario setenta y nueve millones setecientos trece mil trescientos guion cero, todos domiciliados para estos efectos en Avenida Andrés Bello número dos mil setecientos once, piso diecinueve, de la Comuna de Las Condes, Región Metropolitana; mayores de edad,



quienes acreditan su identidad con las cédulas ya citadas y exponen: PRIMERO: La firma SARGENT & KRAHN PROCURADORES INTERNACIONALES DE PATENTES Y MARCAS LIMITADA, cuyo nombre de fantasía es "SARGENT & KRAHN", es la mandataria de sus clientes para representarlos en asuntos relacionados con marcas comerciales, patentes, modelos de utilidad, diseños y dibujos industriales, esquemas de trazado o topografías de los circuitos integrados, indicaciones geográficas y denominaciones de origen, secretos empresariales y de la información no divulgada, variedades vegetales, derechos de autor, nombres de dominio y otras materias relacionadas directa o indirectamente con propiedad intelectual (en adelante referidos colectivamente como "Derechos de Propiedad Industrial e Intelectual"), mandato que se debe ejercer a través de los apoderados de SARGENT & KRAHN. Mediante escritura pública de treinta de enero de dos mil catorce ante este mismo Notario, Repertorio dos mil setecientos seis dos mil catorce, SARGENT & KRAHN designó a diversos apoderados según consta en las cláusulas SEGUNDO y TERCERO de la referida escritura, para las materias que en cada caso se indican. SEGUNDO: Por este acto JOSÉ LUIS LETELIER AZZARI y ALFREDO DOMINGO MONTANER LEWIN, ambos en representación de SARGENT & KRAHN, vienen en revocar las designaciones de los siguientes apoderados que se indican en las cláusulas SEGUNDO y TERCERO de la escritura referida en la cláusula anterior del presente instrumento: a) respecto de los apoderados de la cláusula SEGUNDO, se revocan las designaciones de los señores MARÍA LUISA VALDES STEEVES, MATIAS SOMARRIVA LABRA,

MARIA JOSEFINA MORA ARIAS y b) respecto de los apoderados de la cláusula TERCERO, se revoca la designación de MARIA LUISA VALDES STEEVES. En consecuencia, a contar de esta fecha se revocan los poderes y mandatos otorgados a las personas que se indican en la presente cláusula. **TERCERO:** Por este acto **JOSÉ LUIS LETELIER AZZARI** y **ALFREDO DOMINGO MONTANER LEWIN**, ambos en representación de **SARGENT & KRAHN** vienen en designar apoderado al señor Felipe Fernández González, con las facultades de la cláusula **SEGUNDO** de la escritura pública a que se refiere la cláusula primera del presente instrumento, quien deberá actuar en la misma forma que los restantes apoderados allí designados. **CUARTO:** Se faculta al portador de copia autorizada de la presente escritura para requerir las inscripciones y anotaciones que procedan. La personería de **José Luis Letelier Azzari** y **Alfredo Domingo Montaner Lewin** para representar a **Sargent & Krahn** consta de la escritura pública de dos de noviembre de dos mil seis otorgada ante el Notario Público de Santiago Eduardo Avello Concha Escritura redactada conforme a minuta del Abogado Alfredo Montaner Lewin. En comprobante y previa lectura, firman los comparecientes. Se da copia. DOY FE.-



JOSÉ LUIS LETELIER AZZARI


ALFREDO DOMINGO MONTANER LEWIN

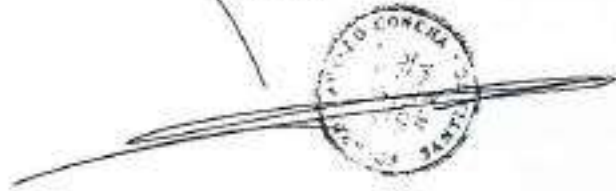



Ambos por sí y p.p. SARGENT & KRAHN

15-0640856AMLCV.11




ESTA COPIA ES TESTIMONIO FIEL DEL ORIGINAL
Santiago, 19 OCT. 2016



Santiago, veintiséis de noviembre del año dos mil veintiuno.

PROVEYENDO ESCRITO DE FECHA 19-11-2021 CON EL CÓDIGO C/2021/002831: A LO PRINCIPAL: TENGASE PRESENTE; AL PRIMER OTROSI: ESTESE A LO RESUELTO A CONTINUACION; AL SEGUNDO OTROSI: TENGASE PRESENTE LA DELEGACION EN FAVOR DE DOÑA MARÍA TRINIDAD ROJAS WÜNKHAUS
PROVEYENDO ESCRITO DE FECHA 24-11-2021 CON EL CÓDIGO C/2021/002906: A LO PRINCIPAL, SEGUNDO Y TERCER OTROSI: TENGASE PRESENTE; AL PRIMER OTROSI: ESTESE A LO RESUELTO A CONTINUACION

AUTOS EN RELACION.

Rol: 1489-2021

proveído por el presidente del Tribunal de propiedad industrial Sr. Juan Cristobal Guzman Lagos.

NOTIFICADA POR EL ESTADO DIARIO CON ESTA FECHA

mef

Rol TdPI : 1489-2021
Solicitud : 201700674
Patente de Invención

EN LO PRINCIPAL: Se tenga presente; **EN EL OTROSÍ:** Acompaña documento.

H. TRIBUNAL DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

María Trinidad Rojas Wünkhaus, en representación de la oponente y apelante Biomar Chile S.A., en el expediente de la solicitud de patente de invención N° 201700674, rol N° 1489-2021, al H. Tribunal de Propiedad Industrial respetuosamente digo:

Recientemente, se nos ha hecho llegar un informe emitido por el instituto de investigación noruego Nofima, titulado "*Optimised growth study, Feeding trial with Atlantic salmon (Salmo salar)*", el cual fue emitido con fecha 8 de diciembre de 2021. Según se puede apreciar, el informe fue emitido más de un mes después de la presentación de la apelación de autos, por lo que no pudo ser presentado con anterioridad en el expediente.

Nofima es un instituto de investigación orientado a los negocios que trabajan en investigación y desarrollo para la acuicultura, la pesca y la industria alimentaria en Noruega.

El informe antedicho se refiere a un ensayo realizado para establecer, entre otras cosas, si existe algún efecto del triptófano libre o de la sal de Ca añadida en el alimento sobre la inducción de la esmoltificación en salmónidos.

El informe analiza un alimento de control (ctrl), un alimento con cloruro de sodio añadido (60 g/kg) (mNa), un alimento con sal de cloruro de sodio añadido (60 g/kg) y triptófano (3 g/kg) (NaTr), y un alimento con sal de cloruro de sodio (60 g/kg) y cloruro de calcio (5 g/kg) añadidos. Por lo tanto, el triptófano y el contenido de iones y sales se encuentran dentro de los rangos declarados, en la medida en que los componentes se agreguen en los alimentos específicos. Las composiciones de los alimentos se proporcionan en la tabla 6, mientras que el contenido relevante de iones y triptófano medido en los alimentos se proporciona en las tablas 8 y 9. Los ensayos se llevaron a cabo en agua dulce (FW) con transferencia posterior a agua de mar (SW) mientras se continuó con el monitoreo. Se utilizó un período de luz de 24 horas, es decir, no se aplicó ninguna manipulación de luz para inducir la esmoltificación.

Table 6 Feed composition (%).

** Additives are amino acids, antioxidants and technical additives*

Raw Material	Ctrl	mNa	NaTr	NaCa
Fish meal LT	32.5	32.5	32.5	32.5
Krill meal	7.5	7.5	7.5	7.5
Soya SPC	5.3	2.0	2.5	4.0
Sunflower Extracted, low fiber	8.0			
Wheat Gluten	8.0	11.7	14.6	13.9
Maize Gluten	5.5	7.6	3.0	3.2
Wheat Milling quality	11.2	11.2	11.2	11.2
Fish Oil	11.8	11.7	11.8	11.8
Rapeseed Oil	5.1	5.0	5.1	5.1
Mono-calcium Phosphate (MCP)	3.7	3.4	3.9	3.3
Lucantin Pink, BASF	0.01	0.01	0.01	0.01
Vitamins, minerals and additives*	2.3	2.1	2.1	2.0
<i>Feed Salt</i>		6.0	6.0	5.5
<i>Calcium chloride</i>				0.5
<i>L-tryptophan</i>			0.3	
Water change	-0.9	-0.5	-0.3	-0.4
Total	100.0	100.0	100.0	100.0

El informe analiza el índice de smolt y el análisis de expresión de Na-K ATPasa para dar una indicación de la inducción de esmoltificación. Los resultados utilizando el índice de smolt se proporcionan en la sección 4.3.1, página 16 y, en particular, en la tabla 10 que se reproduce a continuación:

Table 10 Smolt index of salmon at start, during the standard FW period (FW1, FW3, FW4) and delayed FW period (FW6, FW8, FW10). The fish was given scores between 1-4 based on parr marks, silver colour and colour of the tailfin. Data (n=3 tanks per dietary treatment) are mean shown with SEM. Significant differences are tested with Kruskal-Wallis One-way ANOVA followed by Wilcox post-hoc test. Different letters indicate significant differences.

	Ctrl	mNa	NaTr	NaCa
FW1	3.6 ± 0.0	3.6 ± 0.2	3.7 ± 0.1	3.6 ± 0.2
FW3	3.7 ± 0.1	3.7 ± 0.0	3.7 ± 0.1	3.6 ± 0.0
FW4	3.6 ± 0.1	3.8 ± 0.0	3.7 ± 0.1	3.6 ± 0.1
FW6	3.9 ± 0.0	3.9 ± 0.0	3.8 ± 0.0	3.9 ± 0.0
FW8	4.0 ± 0.0	3.9 ± 0.0	3.9 ± 0.0	3.9 ± 0.0
FW10	4.0 ± 0.0	3.9 ± 0.0	4.0 ± 0.0	3.9 ± 0.0

Tal como se indica en la tabla y en el párrafo precedente, no hay un efecto significativo en el índice de smolt de ninguno de los tres alimentos de prueba en comparación con el alimento de control, excepto para el período FW4. Sin embargo, incluso en FW4, el alimento triptófano tiene un índice de smolt más bajo que el alimento que solo contiene cloruro de sodio (mNa).

Cuando la esmoltificación se mide mediante la expresión génica de Na-K ATPasa, los resultados son similares: aunque los tres alimentos de prueba parecen tener algún efecto en la fase de agua dulce, nuevamente no hay una diferencia significativa entre el alimento de NaCl (MNa) y el alimento de triptófano NaTr (ver figuras 15-16, página 21, del informe). En la página 23 del informe, debajo de la tabla 19, se concluye que los efectos del triptófano dietético fueron menores:

To summarize, differences between control and test feeds were manifested mainly in FW, especially during first six weeks. While control group showed high and low levels of respectively FW and SW isoforms, this difference was blurred in fish fed with salt containing diets and the expression patterns were closer to marine. Addition of calcium markedly increased variance of 1a expression in four of 12 analysed time-points and this was associated with lower average levels. Effect of dietary tryptophan was minor.

[Traducción porción destacada: "(...) las diferencias entre los alimentos de control y de prueba se manifestaron principalmente en FW (...) esta diferencia se difuminaba en los peces alimentados con dietas que contenían sal y los patrones de expresión eran más cercanos a los marinos. (...) El efecto del triptófano dietético fue mínimo".]

En conclusión, no se puede establecer ningún efecto del triptófano de forma aislada y los informes posteriores que investigan esto confirman que el triptófano libre en la dieta tiene poco o ningún efecto.

Asimismo, el informe de Nofima confirma que la sal de Ca añadida tampoco produce efectos en el alimento sobre la inducción de la esmoltificación en salmónidos.

Tal como se explica en los párrafos precedentes, no hay diferencias significativas entre los alimentos de prueba que contienen cloruro de sodio añadido, triptófano añadido o cloruro de calcio añadido. De hecho, según lo medido por el índice de smolt, el alimento de NaCl (MNa) se desempeñó mejor (ver el resumen del informe):

Smolt index score did not vary among the different feed groups, except for sampling FW4 [sampling 3, prior to the first seawater transfer] when the fish fed a pure salt additive had a significantly higher smolt index than the fish fed a combination of sodium and calcium. No clear reduction of condition factor could be observed in any of the groups during the FW phase. Some minor, but significant, differences could be observed between salt fed fish at specific time points.

[Traducción porción destacada: "La puntuación del índice de smolt no varió entre los diferentes grupos de alimentos, excepto para la muestra FW4 (muestra 3, antes de la primera transferencia de agua de mar) cuando los peces alimentados con un aditivo de sal pura tenían un índice de smolt

significativamente más alto que los peces alimentados con una combinación de sodio y calcio".]

Según lo medido por los niveles de expresión génica, todos los alimentos de prueba se desempeñaron mejor que el alimento de control (ctrl), pero el alimento que contenía calcio añadido (NaCa) solo tuvo un efecto menor en comparación con el alimento de prueba de NaCl (MNa) y solo en las muestras de agua dulce FW3 y FW4, mientras que introdujo una gran variación en los resultados en las muestras de agua dulce FW6, FW8 y FW10 (ver figura 15 del informe, que se acompaña en el otrosí).

En las muestras de agua salada (SW), estas diferencias con respecto al alimento de control desaparecieron por completo a medida que aumentaba la variación individual. Esto es evidente a partir de las figuras 15-16 y el resumen, que establece:

The test feeds affected the expression levels of key smoltification gene markers NKA α 1a (suppression) and 1b (induction) in FW during the standard protocol. This difference was eliminated in the delayed FW group as individual variation increased.

[Traducción porción destacada: "Los alimentos de prueba afectaron los niveles de expresión de los marcadores genéticos de esmoltificación clave NKA α 1a (supresión) y 1b (inducción) en FW durante el protocolo estándar. Esta diferencia se eliminó en el grupo FW retrasado a medida que aumentaba la variación individual".]

En conclusión, no hay ningún efecto del calcio añadido en el alimento. A la luz de esto, por supuesto, tampoco hay un efecto plausible en el extremo inferior de los rangos de calcio. El informe utiliza 5 g/kg de cloruro de calcio añadido (tabla 6), lo que da como resultado un contenido de Ca^{2+} de 16,3 g/kg (tabla 8). Naturalmente, si esto no proporciona un efecto sorprendente en comparación con un alimento suplementado con NaCl correspondiente, tampoco lo será un alimento con solo

0,1 g/kg de sal de calcio añadida, que corresponde al límite inferior reivindicado en la solicitud de autos.

En vista de todo lo señalado, es posible concluir que la adición de triptófano libre o de sal de Ca en el alimento para peces no produce ningún efecto sorprendente o novedoso.

POR TANTO,

al H. Tribunal de Propiedad Industrial respetuosamente pido:

Se sirva tenerlo presente.

OTROSÍ: Sírvase tener por acompañado el informe titulado "*Optimised growth study, Feeding trial with Atlantic salmon (Salmo salar)*", emitido por el instituto de investigación noruego Nofima, con fecha 8 de diciembre de 2021.

María
Trinidad
Rojas
Wunkhaus

Firmado
digitalmente por
María Trinidad
Rojas Wunkhaus
Fecha: 2022.04.21
17:54:38 -04'00'

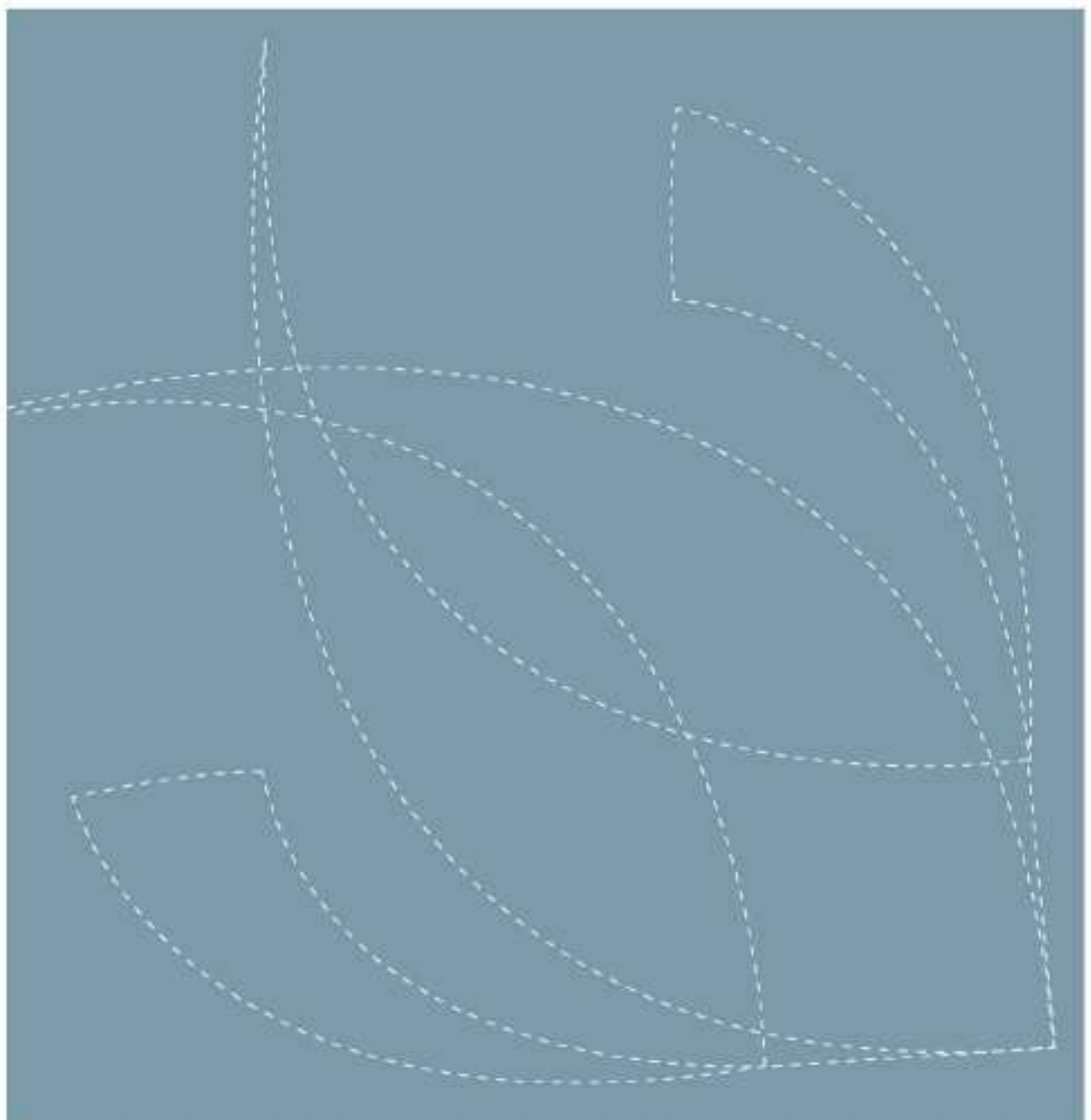


Confidential Report K-80/2021 • Issued December 2021

Optimised growth study

Feeding trial with Atlantic salmon (*Salmo salar*)

Mette S W Breiland, Tone-Kari K Østbye, Marianne Iversen and Aleksei Krasnov





Nofima is a business oriented research institute working in research and development for aquaculture, fisheries and food industry in Norway.

Nofima has about 390 employees.

The main office is located in Tromsø, and the research divisions are located in Bergen, Stavanger, Sunndalsøra, Tromsø and Ås.

Main office in Tromsø:

Muninbakken 9–13
P.O.box 6122 Langnes
NO-9291 Tromsø

Ås:

Osloveien 1
P.O.box 210
NO-1433 ÅS

Stavanger:

Måltidets hus, Richard Johnsensgate 4
P.O.box 8034
NO-4068 Stavanger

Bergen:

Kjerreidviken 16
P.O.box 1425 Oasen
NO-5844 Bergen

Sunndalsøra:

Sjølsengvegen 22
NO-6600 Sunndalsøra

Alta:

Kunnskapsparken, Markedsgata 3
NO-9510 Alta

Company contact information:

Tel: +47 77 62 90 00

E-mail: post@nofima.no

Internet: www.nofima.no

Business reg.no.:

NO 989 278 835 VAT

Report

<p>Title: Optimised growth study Feeding trial with Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i>)</p>	<p>Report no.: K-80/2021</p>
<p>Author(s)/Project Manager: Mette S W Breiland, Tone-Kari K Østbye, Marianne Iversen and Aleksei Krasnov</p>	<p>Accessibility: Confidential</p>
<p>Department: Fiskehelse og Ernæring og fôrteknologi</p>	<p>Date: 08.12.2021</p>
<p>Client: BioMar AS</p>	<p>Number of pages and appendixes: 30+12</p>
	<p>Project No.: 13133</p>
	<p>Client's ref.:</p>
<p>Summary/recommendation:</p> <p>This trial has investigated the effect of three different feeds containing salt additives or/and the amino acid tryptophan on the smoltification and seawater (SW) preadaptation of juvenile salmon. Juvenile salmon was put through a smolt protocol in freshwater (FW) involving continuous light and feeds intended to stimulate smoltification and SW preadaptation. A standard group was transferred to SW after 5 weeks (excluding the acclimation period) in FW, and a delayed group was transferred to SW after 11 weeks. While fish remained on FW, they were put through seawater test (SWT) to evaluate SW preparedness. After transfer to SW, the fish were maintained for 6 weeks. Growth, smolt status, SW-tolerance, and gene expression of smolt- and immune-related genes were measured.</p> <p>In both the standard and the delayed group, the fish fed the control feed grew significantly better (measured as specific growth rate (SGR) and thermal growth coefficient (TGC)) and had a higher weight than the fish fed the test feed, at the end of the FW phase. In SW, the test fed fish grew better, but at termination of the trial the control fed fish still held a significantly higher final weight.</p> <p>Smolt index score did not vary among the different feed groups, except for sampling FW4 (sampling 3, prior to the first seawater transfer) when the fish fed a pure salt additive had a significantly higher smolt index than the fish fed a combination of sodium and calcium. No clear reduction of condition factor could be observed in any of the groups during the FW phase. Some minor, but significant, differences could be observed between salt fed fish at specific time points.</p> <p>Plasma levels of chloride and magnesium measured after SWT showed small, and occasionally significant differences between groups. In the delayed group, the control fed fish showed lower levels of plasma chloride than the test fed fish, and the mNa fed group showed higher magnesium levels.</p> <p>During the SW stage, very little difference in plasma chloride and magnesium was observed.</p> <p>The test feeds affected the expression levels of key smoltification gene markers <i>NKA α 1a</i> (suppression) and <i>1b</i> (induction) in FW during the standard protocol. This difference was eliminated in the delayed FW group as individual variation increased.</p> <p>Expression of <i>dio2a</i> and <i>dio2b</i> did not depend on feeds. Feed with higher level of Ca induced fluctuations and increased variance. The expression of immune-related genes suggested good condition of salmon in all study groups.</p> <p>At standard production protocol, the test feeds seemed to affect osmoregulation: expression profiles of <i>NKA</i> paralogs before seawater transfer were intermediate between FW and SW. Consequences of this effect for fish are unknown. Combination of dietary salt and delayed FW markedly decreased growth.</p>	
<p>Publication of results:</p> <p><i>The Client may publish the final report of the project when the results are rendered in a way that is not misleading. It must always be specified that the report is produced by Nofima AS, and participating scientists are to be named in accordance with good practice. Before publication, the material shall be submitted to the contractor for approval. Publication on the Internet is not permitted without the special permission of the contractor.</i></p>	

Table of Contents

1	Introduction	1
1.1	Objective.....	1
2	Hypothesis.....	2
3	Material and methods	3
3.1	Experimental design	3
3.1.1	Fish.....	3
3.1.2	Light regime.....	3
3.1.3	Temperature.....	4
3.1.4	Water quality.....	4
3.1.5	Feeding regime	4
3.1.6	Transfer to seawater	5
3.1.7	Weight registration of fish and distribution in tanks	5
3.1.8	Tank condition and registered parameters	7
3.1.9	Timeline for the trial and sampling points	7
3.2	Seawater challenge tests.....	8
3.3	Feed information.....	9
3.4	Serum analyses.....	10
3.5	Gene expression analyses	10
3.6	Statistics.....	11
4	Results.....	12
4.1	Mortality.....	12
4.2	Weight and Growth	12
4.3	Smolt parameters	16
4.3.1	Smolt index.....	16
4.3.2	Condition factor.....	16
4.3.3	Chloride and magnesium in seawater challenge test	17
4.3.4	Chloride and magnesium in the seawater period	19
4.4	Gene expression analysis.....	20
5	Discussion.....	28
6	References.....	30

1 Introduction

BioMar AS contacted Nofima during late spring 2020 to discuss possibilities for running a feeding trial with Atlantic salmon (*Salmo salar*). The timeline for the trial and the possibility of running this trial at the Aquaculture Research station in Kårvik, Tromsø, were discussed together with the Aquaculture Research Station. The facility was available for this long-term trial at the desired time, and more detailed planning of a project could proceed. In March 2021 a raw data report was delivered to BioMar. This new report is an extended version of the previous report and includes interpretations and discussion of the results.

1.1 Objective

The objective of this study was to test four different freshwater feed codes, three test feeds (A, B and D), containing different salt additives and/or tryptophan, and one control feed (C). For the duration of the project, the fish were kept under 24 h continuous light. Fish from all feed groups were regularly sampled in order to assess development of smolt characteristics.

One group of fish was kept longer in the freshwater phase, a delayed group. This planned delay in saltwater transfer was done to investigate the influence of the length of the smoltification window.

2 Hypothesis

In this study the following hypotheses are tested:

- Addition of NaCl (Feed “mNa”) to the feed affect growth and smoltification parameters in salmon juveniles kept under continuous light.
- Addition of NaCl and extra Tryptophan (Feed “NaTr”) to the feed has effect on growth and smoltification parameters.
- Addition of NaCl (Feed “mNa”) and NaCl and extra Tryptophan (Feed “NaTr”) affects growth and smoltification parameters differently.
- Addition of NaCl and Ca²⁺ (Feed “NaCa”) to the feed has effect on growth and smoltification parameters.
- Addition of NaCl (Feed “mNa”), NaCl and extra Tryptophan (Feed “NaTr”) and NaCl and Ca²⁺ (Feed “NaCa”) affects growth and smoltification parameters differently.

3 Material and methods

3.1 Experimental design

The trial started with all fish in freshwater stage, defined as the standard freshwater group (standard FW) in the report. When the first group of fish were put on seawater, this group is defined as the standard seawater group (standard SW). The fish left in freshwater is defined as the delayed freshwater group (delayed FW), and when this delayed freshwater group is put to seawater, this group is defined as the delayed seawater group (delayed SW) in the report. Table 1 provides details about the length of the different periods in FW and SW, and all sampling points during the whole trial period. The table also show the timepoints for when the seawater tolerance tests were performed during sampling (marked * in the table at the relevant sampling). There was one seawater test at the start of the sampling (sampling 0), three tests in the standard freshwater stage group (sampling 1, 2 and 3) and three tests in the delayed freshwater stage group (sampling 4, 7 and 9). The trial was done in triplicate. The fish were weighed and distributed in the different tanks (E105-1 to 105-12) at the start of the trial 30.09.20. From 30.09.20 until 14.10.20 (week 40-42) the fish were fed an acclimation feed, whereas the test feeds were introduced at 15.10.20 (week 42).

Table 1 This table illustrates the different freshwater and seawater phases for the fish in the trial, with sampling points (sampling 0 to 12) and week numbers for each sampling. Sampling for seawater tolerance tests (sampling number) is marked with * in the table at the relevant sampling.

2020													2021							
week 40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53 (28.12.20)	1	2	3	4	5	6	
							Standard SW						Termination							
	Standard FW							5	6	8										
							Delayed FW							Delayed SW						
Sampling	0*		1*	2*	3*			4*	7*	9*				10	11	12	Termination			

3.1.1 Fish

The fish trial was performed at the Aquaculture Research station in Kårvik, Tromsø, in the period from August 2020 until February 2021. The salmon strain used is from Aqua Gen Atlantic QTL-innOva PRIME. The fish was produced in surplus, to ensure a sufficient number of fish throughout the trial period. Origin and production data (light, hatching, temperature etc.) of the fish is presented in Appendix 1.

3.1.2 Light regime

During the whole project period the fish production strategy was 24h light regime. In the rooms E105/106 there were 6 light tubes in total, including 2 tanks per tube. In the smaller rooms (E102 and E103) there were 3 light tubes in total, also with 2 tanks per tube. There will be differences between tanks due to tank placement and shades from the feeders. Average values for lux measurements (3 measuring points) in E105/106 (tank E105-1, 3, 7, 9 and 12) were 425, 490, 448, 430 and 261 respectively. Average values for lux measurements (3 measuring points) in E102 (tank 1, 3 and 6) were 415, 565 and 499, respectively. The fish had been kept on 24h light regime from first feeding to the onset of the trial (Appendix 1).

3.1.3 Temperature

Temperature before the trial was 12 °C (Appendix 1). From the start of the trial and with all the fish still in the freshwater stage, the temperature in each tank was set to 12 °C (Table 2). The temperature and flow in the tanks were monitored daily during the trial period. The temperature was pre-set to a fixed point in the water string system at the station and measured in one tank at each measuring point. Before the first group was transferred to seawater the temperature was reduced and set to 10 °C. This reduction was done over a two-day period (15.12 – 17.12.2020) to ensure a gradual reduction. From this timepoint, the temperature was 10 °C throughout the rest of the trial, both in the freshwater- and seawater stage.

Table 2 Temperature (average values for all tanks) in the different freshwater (FW)- and seawater (SW) periods with associated day degrees.

Group of fish	Temp. average (°C)	Date (Start)	Date (Final)	Days	Day degrees
FW standard	11.7	30.09.20	19.11.20	50	585.0
SW standard	9.9	19.11.20	28.12.20	39	386.1
FW delayed	10.2	19.11.20	28.12.20	39	397.8
SW delayed	10.0	28.12.20	10.02.21	44	440.0

3.1.4 Water quality

The raw water quality at the Aquaculture Research station in Tromsø was monitored over one year from October 2002 to October 2003. In this period 27 water samples were collected and sent to NIVA (Norsk Institutt for Vannforskning) and analysed for different parameters. The results from this showed a general good water quality with good pH, good buffer capacity and antacid capacity. Colloidal and labile aluminium was mostly low with a small potential of harming the fish. In periods with a lot of wind, aluminium concentrations can increase transiently due to higher amount of sea salts in the freshwater. The iron concentration was very low, and the ratio of iron to TOC indicated minimal danger for the fish due to inorganic iron. Data can be found in Appendix 2.

3.1.5 Feeding regime

During the whole trial period, the fish were fed in excess to ensure that the fish had enough feed. In agreement with BioMar, it was decided to use the feeding regime that the Aquaculture Research station normally use. This means a daily break in the feeding from 08:15 to 14:00, and then feeding the first 15 minute of each hour during daily feeding period (14:15 to 08:00). At every sampling point when the fish weight was registered, the amount of feed provided was recalculated based upon the new weight data and the number of fish taken out of each tank for sampling. The best growing fish (mean values) determined the new feed amount for all tanks.

BioMar delivered a standard commercial feed (CPK 15) for the acclimation period of 2 weeks in freshwater. We received three bags of this feed for the period ahead of the trial.

After acclimation, the fish were fed the four different test feeds, including the control feed. The distribution of test feeds in the different tanks is described in Appendix 3. All the fish were fed test feeds from week 42 (15/10-20) until week 47 (19/11-20), when one group (70 fish/tank) were removed and transferred to seawater. The rest of the fish in freshwater remained on test feeds until week 53

(28/12-20). All fish in the trial received the same feed during the SW period, and this feed (CPK40) arrived at the station 7/10-2020. BioMar sent a freshwater feed, 3mm, for the two seawater periods. The size of the fish in group one, when transferred to seawater, was about 80 grams at which 3mm is optimal feed size. BioMar did not have seawater feed with pellets of 3mm (only >4mm), it was therefore decided to use this freshwater feed (CPK 40) for both fish groups in seawater.

3.1.6 Transfer to seawater

The fish were transferred to seawater at two different timepoints during the trial. Before SW transfer the fish were starved for 24 hours. The first group was transferred in week 47, and the last group in week 53. In week 47 (2020), 70 fish from each tank were transferred (tank E105-1 to E105-12) to new tanks with SW. About 25 fish (without counting) were carefully transferred each time to disturb the fish as little as possible. The fish were transported between rooms in 30L transport tanks and to two separate rooms, E102 and E103. To avoid unnecessary traffic of people around the tanks during the transfer, and to reduce the stress for the fish, we started to fill the tanks that were furthest into the rooms.

The delayed group were put on seawater in week 53, 2020. The fish remained in the original tanks while the water was adjusted and changed to seawater. This change of water quality was done with the fish in its respective tanks, and by closing the freshwater tap and then opening the seawater tap. The flow was about 20-25/L per minute in the tanks.

After transfer to seawater, both groups were hand-fed three days in addition to the automatic feeding. This was done to ensure that the feeding was as optimal as possible for the fish at this life stage. Bulk weight was registered before seawater transfer, but without detailed counting to avoid stress as much as possible.

The seawater source is quite stable but was not specifically measured in the period. A measurement in November 2021 showed 33.7 ppm.

3.1.7 Weight registration of fish and distribution in tanks

From the rearing tanks, 280 fish were weight registered (30/9-20) before transfer to their respective freshwater tanks. Individual weight registrations (50 fish/tank) and bulk weight of the rest (4 x 50, 1 x 20, and 1 x 10, number of groups x number of fish) were done (Table 3). This fish was then distributed into 12 tanks in a double room (number E105,106) at the land facility (280 fish/tank), with tank number from E105-1 to E105-12. The first two weeks the fish were fed with the same acclimatization feed (CPK15).

Table 3 Mean weight registrations per tank (E105-1 to E105-12) at the day of transfer to respective tanks (week 40), before start of trial.

	E105-1	E105-2	E105-3	E105-4	E105-5	E105-6	E105-7	E105-8	E105-9	E105-10	E-105-11	E105-12
Weight (g)	34,0	34,0	34,0	34,2	33,8	33,8	33,7	34,2	34,1	33,8	33,8	33,9

All weight and growth data are based on bulk weight and counting of fish in the tanks or individual weights as described below:

- **Start of FW standard period (30.09.20):**
 - Bulk weights (six batches of fish were weighed: 4x 50 fish + 20 fish + 10 fish) in addition to individual weights of 50 fish
 - In total 280 fish per tank
- **End of FW standard period and start of FW delayed period (19.11.20):**
 - Bulk weights (three batches of fish per tank were weighed)
 - In total 148 fish per tank.
- **Start of SW standard period (19.11.20):**
 - Bulk weights (three batches of fish were weighed: 25 fish + 25 fish + 20 fish)
 - In total 70 fish per tank
- **End of SW standard period (28.12.20)**
 - Individual weights of 40 fish per tank
- **End of FW delayed period and Start of SW delayed (28.12.20):**
 - Bulk weights
 - In total 88 fish per tank
- **End of SW delayed (10.02.21):**
 - Individual weights of 55-60 fish per tank

In Appendix 4, the tank distribution in room E102 and E103 are given, to be able to identify where the fish in seawater group 1 came from in the freshwater stage. In Appendix 3, the test feed distribution in tank E105-1 to E105-12 is shown.

The growth rate was calculated both as specific growth rate (SGR) and thermal growth co-efficient (TGC), according to the formulas:

$$\text{SGR (\% d}^{-1}\text{)} = (\ln W_2 - \ln W_1) (t_2 - t_1)^{-1} * 100$$

$$\text{TGC} = (W_2^{1/3} - W_1^{1/3}) ((t_2 - t_1) * T)^{-1} * 1000$$

W1 and W2 are average weights (g) at start (t1) and end (t2), and T is average temperature in the period.

SGR is expected to decrease by increasing fish weight and decreasing temperatures. TGC takes into account the size of the fish and the water temperature variation, enabling comparison of individuals of different weight and held at different temperatures.

3.1.8 Tank condition and registered parameters

During the first freshwater period (30/9-2020 to 15/11-2020), the temperature in the tanks (E105-1 to E105-12) were set to 12 °C. The temperature was recorded daily by personnel at the station and ranged from 11.3 °C to 11.9 °C. In the same period the oxygen level in the tanks varied from 74.9 % to 100 %.

During the second freshwater period (19/11-20 to 28/12-20), encompasses only the fish left in tanks E105-1 to E105-12, hereafter referred to as the delayed fish. During this period, the temperature ranged from 10.1 °C to 10.3 °C, and the oxygen level varied from 85 % to 102 %.

The first group of fish were transferred to SW 19/11-2020, hereafter referred to as standard group, and kept until termination 28/12-2020. The temperature ranged from 9.7 °C to 10.3 °C and the oxygen level varied between 83 % to 94 % during this time.

The second seawater period, for the last group put to sea (delayed fish), lasted from 28/12-2020 to 10/2-2021. The temperature in the tanks during this period ranged from 9.9 °C to 10.1 °C and the oxygen level varied between 81 % to 95 %.

3.1.9 Timeline for the trial and sampling points

The trial was started in week 40 (2020), with the transfer of fish to new tanks and an acclimation period of two weeks. In week 42, the feeding of the fish with the four different test feeds started. Table 1 shows a simplified overview of the total length of the different periods in freshwater and seawater during the trial.

Samples were taken from the different groups of fish throughout the trial. One sampling was performed (sampling0) during the acclimation period. In the freshwater period with all the fish (standard), there were 3 sampling points (sampling1-3). In the first seawater group (standard), there were 3 sampling points (sampling5, 6 and 8). In the second freshwater group (delayed), there were 3 sampling points (sampling4, T7 and T9), and for the last seawater group (delayed), there were 3 sampling points (sampling10-12). More details about sampling and what was done at each sampling point is in Appendix 5.

Table 4 Sampling time points. *Acclimation feed was used between 30.09.20 – 14.10.20 and start of test feed was 15.10.20.

	Sample	Test week	Time code	Week no	Date
FW Standard*	TO	-1		41	08.10.2020
	T1	2	FW1	43	22.10.2020
	T2	4	FW3	45	05.11.2020
	T3	5	FW4	46	12.11.2020
FW 2 Delayed	T4	7	FW6	48	25.11.2020
	T7	9	FW8	50	10.12.2020
	T9	11	FW10	52	22.12.2020
SW Standard	T5	7	SW6	48	26.11.2020
	T6	9	SW8	50	09.12.2020
	T8	11	SW10	52	21.12.2020
SW Delayed	T10	13	SW11	1	06.01.2021
	T11	15	SW13	3	21.01.2021
	T12	17	SW15	5	03.02.2021

3.2 Seawater challenge tests

At each sampling point in the freshwater stage, 10 fish per tank were put into seawater in new tanks for 24 hours. The challenge tests were done by the staff at the Aquaculture Research station in Tromsø. The temperature was the same in the freshwater and seawater tanks. After 24 hours mortality, if any, was registered. Weight and length were registered for all fish, followed by blood sampling. The blood tubes were centrifuged 10 minutes in 3800 RPM at 4 °C, and serum was stored in Eppendorf tubes at -20°C until they were sent to Nofima Sunndalsøra for analysis of chloride and magnesium content. At the same sampling points Nofima personnel took blood samples from the fish in freshwater for comparison. These samples were also sent to Sunndalsøra for analysis.

To evaluate smolt status a smolt index grading the presence of parr marks, silvering and darkening of the tailfin edge was used (Table 5).

Table 5 Smolt status was evaluated by assigning a score between 1 and 4 to the fish based on the degree of loss of parr marks, silvering, and darkening of the tail fin edge. The smolt index is calculated as an average of the three scores.

	Parr -----	-----	----->	Smolt
Grade	1	2	3	4
Parr marks	Clearly	-----	----->	Invisible
Silver colour	Yellow	-----	----->	Silver
Tail fin edge	Blank	-----	----->	Black

3.3 Feed information

Composition of the four feeds is presented in Table 6.

Table 6 Feed composition (%).

* Additives are amino acids, antioxidants and technical additives

Raw Material	Ctrl	mNa	NaTr	NaCa
Fish meal LT	32.5	32.5	32.5	32.5
Krill meal	7.5	7.5	7.5	7.5
Soya SPC	5.3	2.0	2.5	4.0
Sunflower Extracted, low fiber	8.0			
Wheat Gluten	8.0	11.7	14.6	13.9
Maize Gluten	5.5	7.6	3.0	3.2
Wheat Milling quality	11.2	11.2	11.2	11.2
Fish Oil	11.8	11.7	11.8	11.8
Rapeseed Oil	5.1	5.0	5.1	5.1
Mono-calcium Phosphate (MCP)	3.7	3.4	3.9	3.3
Lucantin Pink, BASF	0.01	0.01	0.01	0.01
Vitamins, minerals and additives*	2.3	2.1	2.1	2.0
Feed Salt		6.0	6.0	5.5
Calcium chloride				0.5
L-tryptophan			0.3	
Water change	-0.9	-0.5	-0.3	-0.4
Total	100.0	100.0	100.0	100.0

Chemical composition of the feeds was analysed by Eurofins according to NorFor, May 2, 2007, Starch / Electrometry for starch, EC 152/2009 / Gravimetry for moisture and crude fat by acid hydrolysis, EC 152/2009 / Kjeldahl (titrimetry) for crude protein, and EC 152/2009 / Titrimetry for salt and chloride (Table 7).

Table 7 Chemical composition (%) of the feeds.

	Control	mNa	NaTr	NaCa
Starch	7.5	8.5	8.0	8.6
Moisture	5.7	5.7	5.4	4.2
Crude protein (N*6.25)	46.1	45.2	45.5	46.3
Crude Fat by Acid Hydrolysis	23.1	22.6	22.8	22.5
Salt	2.0	7.9	7.8	8.0
Chloride	1.23	4.78	4.76	4.86

Feed composition of minerals was analysed by Eurofins according to EU 152/2009 mod. / ICP-OES) (Table 8, Appendix 7).

Table 8 Minerals in the feeds Control, mNa, NaTr and NaCa.

	Control	mNa	NaTr	NaCa
Sodium (%)	0.61	3.04	2.92	2.75
Magnesium (%)	0.25	0.19	0.20	0.20
Calcium (%)	1.58	1.47	1.58	1.63

Free amino acids in the feeds were analysed by Eurofins according to ISO 13903:2005 / IC-UV, except for EN-ISO 130904:2016 / LC-FLD for tryptophan (Table 6, Appendix 8). The amino acid profile of the feeds was analysed by Eurofins according to ISO 13903:2005 / IC-UV, except ISO 13903:2005 / IC-UV for serine+cysteine and methionine, and EU 152/2009 / LC-FLD for tryptophan) (Table 9, Appendix 8).

Table 9 Free and total tryptophan (g/100g) in the feeds Control, mNa, NaTr and NaCa.

	Control	mNa	NaTr	NaCa
Tryptophan, free	0.011	0.025	0.269	0.011
Tryptophan, total	0.483	0.458	0.728	0.475

The fatty acid composition of the feeds was analysed by Eurofins according to ISO 12966-2:2011 & ISO 12966-4:2015 mod. / GC-FID (Appendix 6).

3.4 Serum analyses

Chloride and magnesium were analysed at Nofima in Sunndalsøra. Serum blood samples were stored at -20 °C at the Aquaculture Research station and at Nofima and transported on dry ice to Sunndalsøra. Both analyses were done in an ABX Pentra 400 instrument (ABX Pentra Magnesium RTU and ABX Pentra Chloride-E). The results from both these analyses are presented as mmol/l.

Magnesium was quantitatively *in vitro* diagnosed based on a photometric test using Xylidyl Blue. Magnesium ions forms a purple complex together with Xylidyl Blue in an alkaline solution, and the intensity of the purple colour is proportional with the Magnesium concentration in the sample.

Chloride was quantitatively determined *in vitro* using potentiometry with an ion-selective electrode together with associated reference solution, calibrators, and controls.

3.5 Gene expression analyses

RNA was isolated from gill tissue using Biomek 4000 robot and Agencourt RNAdvance Tissue kit (Beckman Coulter). The quality of selected RNA samples was assessed with Agilent Bioanalyzer 2100, RNA 6000 nano kit. A new version of a multigene expression assay (MGE) was developed specially for this project on Fluidigm Biomark HD platform as a modification of the assay that was designed for the assessment of immune competence of Atlantic salmon smolts and growers – ImCom (Krasnov et al., 2020; Krasnov et al., 2021; Bakke et al., 2021). The first two versions of ImCom included respectively 92 and 46 immune and stress genes selected by the gene expression profiles in a large number of Nofima's trials that used transcriptome analyses. This MGE included four genes associated with smoltification (two and two isoforms of Na-K atpase 1a and thyroid hormone deiodinase – dio2a and

dio2b), two reference genes (actin b and ef1a1b) and 18 immune and stress genes selected by their diagnostic value in our previous studies. Given a large number of samples in this project, we applied a 24 genes x 192 samples Biomark format. The expression data ($\Delta\Delta Ct$) was normalized for each gene so that the average over all samples were equal to zero. The data analysis presented in the report focused on comparison between the control and test feeds and between the three test feeds. ANOVA was followed with post-hoc Duncan's test. Complete data including significant differences between the time points are in the supplementary file.

Gene expression is the process by which the information in the DNA is converted into a functional product, such as a protein. In a gene expression analysis, the relative levels of transcripts from the genes are measured. The delta-delta Ct method, also known as the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, is a formula used in order to calculate the relative fold gene expression of samples. The measured transcript levels are normalised to one or several reference genes, and thereafter to a control condition ($\Delta\Delta Ct$). A negative value indicate that expression of the target gene is lower than in the control sample, while a positive value indicate that expression levels are higher than in the control sample. By raising 2 to the negative value of $\Delta\Delta Ct$ you find the relative fold-change of gene expression. Values presented in tables 15 through 25 (except for Figure 19) represent relative increase or decrease in gene expression in relation to the total average of all samples (0) presented as $\Delta\Delta Ct$. Positive values thus indicate a relatively higher expression level, while negative values indicate a relatively lower expression level.

3.6 Statistics

Statistical analyses were conducted using the software package UNISTAT (London, England). The growth data (SGR, TGC, final weight), condition factor, magnesium and chloride levels were subjected to multiple comparisons using One-Way analysis of variance (ANOVA). Statistical units were tanks per dietary group (n=3). Significant effects were indicated at a 5 % level. The differences were ranked using Tukey-HSD post hoc test. Significant differences in smolt index were tested with Kruskal-Wallis One-way ANOVA followed by Wilcox post-hoc test. Statistical units were tanks per dietary group (n=3). Gene expression analyses were analysed by Duncan's test ($p < 0.05$) using individual fish as statistical unit with n=30.

4 Results

4.1 Mortality

In total, 10 fish died or were considered moribund during this trial. These fish were removed from their respective tanks as soon as they were discovered. Table 10 shows information about these fish.

Table 10 The total number of fish removed from tanks in freshwater and seawater periods. The fish were either dead or moribund in the tank when removed.

Month	Production protocol	Water	Diet	Dead/Moribund fish
October	Standard	FW	NaTr	1
November	Standard	FW	NaCa	1
	Delayed	FW	NaCa	2
December	Delayed	SW	mNa	1
	Delayed	FW	NaTr	1
	Delayed	FW	mNa	4

4.2 Weight and Growth

The SGR and TGC in the first standard FW period (week 40-47) were between 1.8-2.1 and 1.9-2.3, respectively (Figure 1). The control group showed higher SGR and TGC than the three other dietary groups, while there were no significant differences between the test fed groups mNa, NaTr and NaCa. The first two weeks in this standard FW period (week 40 and 41) all the fish were given the same acclimation feed. This to remember when looking into the figure (figure 1). The final weights after the first FW period were between 83-94 g (Figure 2), with the control group showing significantly higher weight than the other groups.

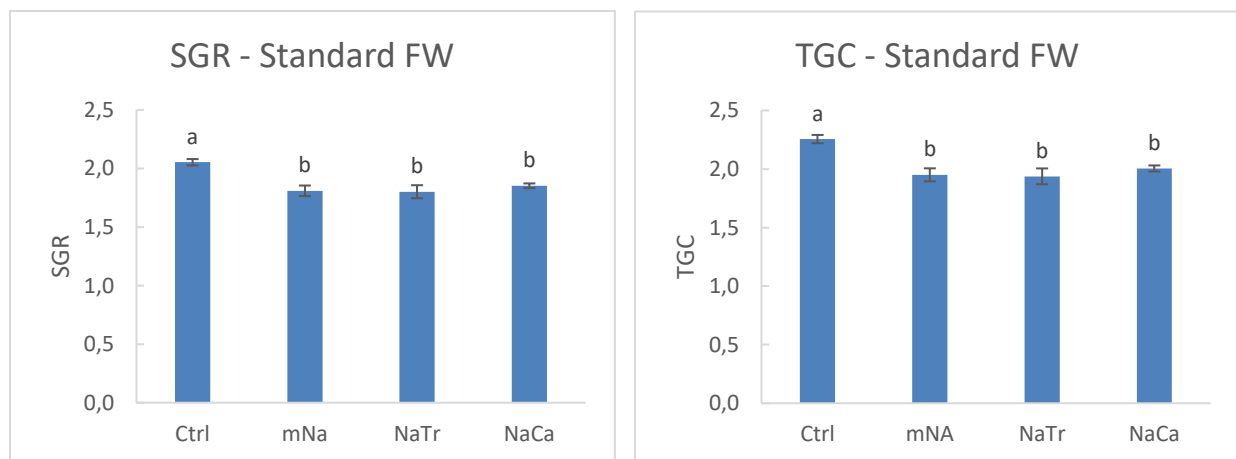


Figure 1 SGR and TGC in the first standard FW period (week 40-47). The period includes an acclimation period from 30.09.20-14.10.20. Data (n=3 tanks per dietary groups) are means shown with standard error mean (SEM). Significant differences are tested with One-way ANOVA followed by Tukey-HSD. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

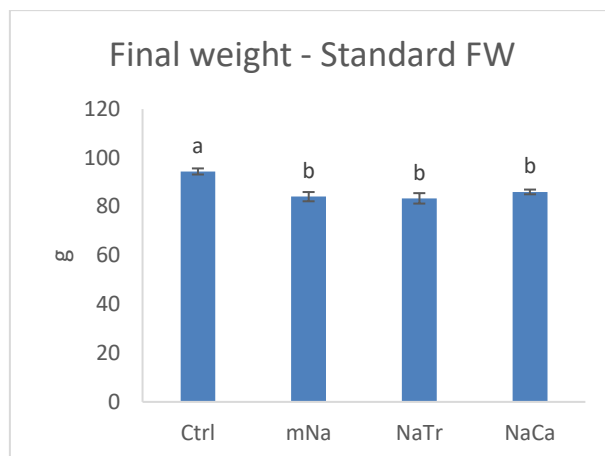


Figure 2 Final weight (g) in the first standard FW period (week 40-47). Data (n=3 tanks per dietary groups) are means shown with SEM. Significant differences are tested with One-way ANOVA followed by Tukey-HSD. Different letters indicate significant differences ($p<0.05$).

In the delayed FW period (week 47-53), the SGR varied from 0.7-1.5, whereas TGC was between 1.1-2.5 (Figure 3). SGR and TGC were significantly higher for the control group compared to the other groups. The final weights after second delayed FW period were 111-172 g, and the control group showed 1.4-1.5 times higher weight than the other groups (Figure 3).

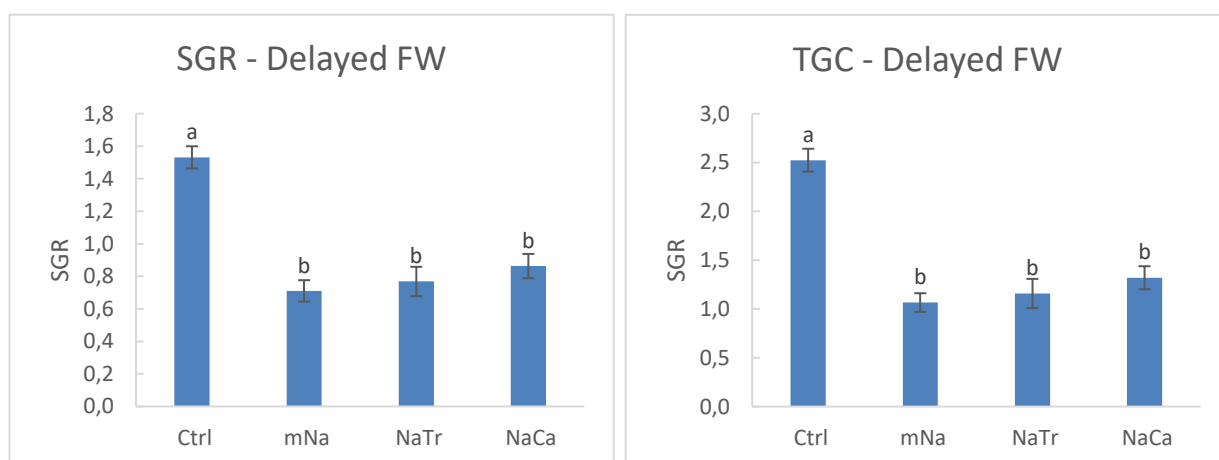


Figure 3 SGR and TGC during the second delayed FW period (week 47-53). Data (n=3 tanks per dietary groups) are means shown with SEM. Significant differences are tested with One-way ANOVA followed by Tukey-HSD. Different letters indicate significant differences ($p<0.05$).

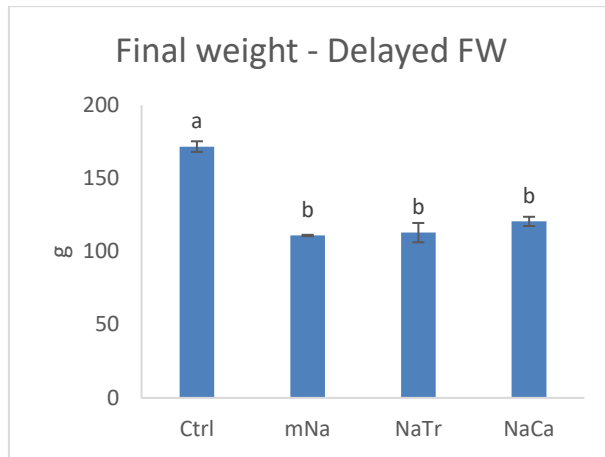


Figure 4 Final weight (g) in the delayed FW period (week 47-53). Data (n=3 tanks per dietary groups) are means shown with SEM. Significant differences are tested with One-way ANOVA followed by Tukey-HSD. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

In the SW period (week 47-53) for the standard group, there were no significant differences in SGR, TGC or final weights between the different feed groups (Figure 5). The final weights in this phase were between 159-171 g (Figure 6)

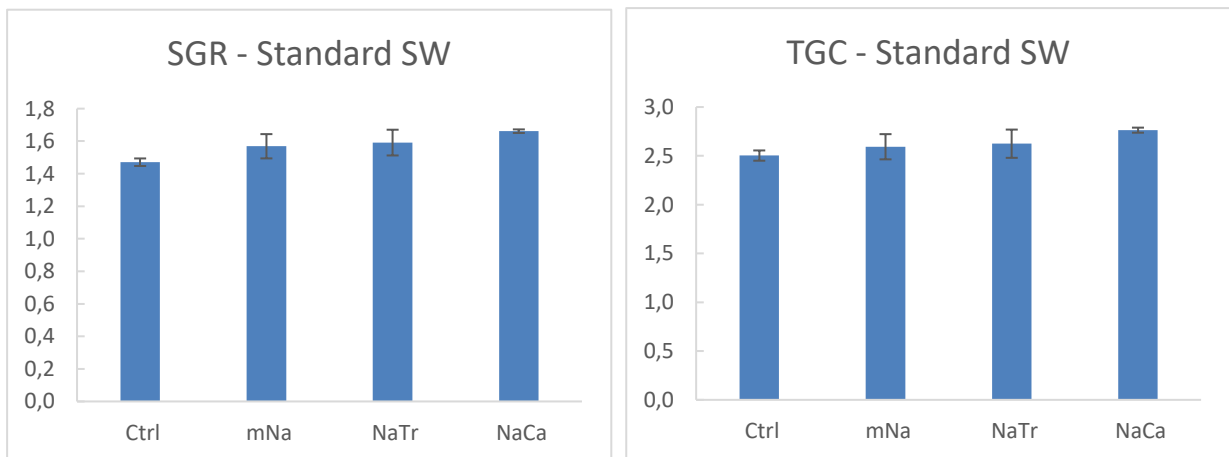


Figure 5 SGR and TGC in the SW period (week 47-53) for the standard group. Data (n=3 tanks per dietary groups) are means shown with SEM. Significant differences are tested with One-way ANOVA followed by Tukey-HSD. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

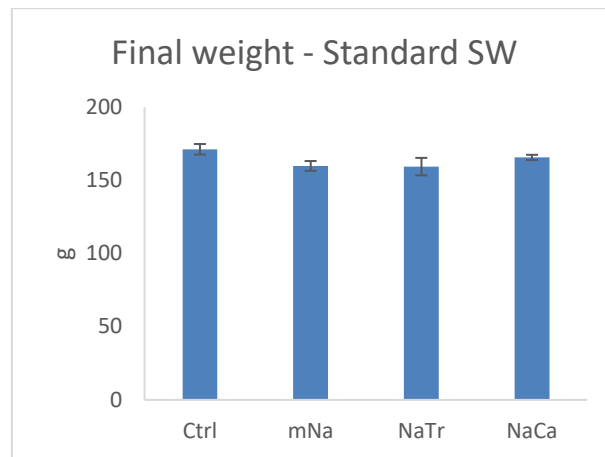


Figure 6 Final weight (g) in the SW period (week 47-53) for the standard group. Data (n=3 tanks per dietary groups) are means shown with SEM. Significant differences are tested with One-way ANOVA followed by Tukey-HSD. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

In the SW period (week 53 (2020)-week 6 (2021)) for the delayed group, SGR and TGC were 1.2-1.7 and 2.5-3.2, respectively, and both mNa, NaTr and NaCa showed significantly higher values than the control group (Figure 7). The final weights in the SW for the delayed group were between 237-297 g, with the control group showing approximately 1.2 times higher weight than the other groups (Figure 8).

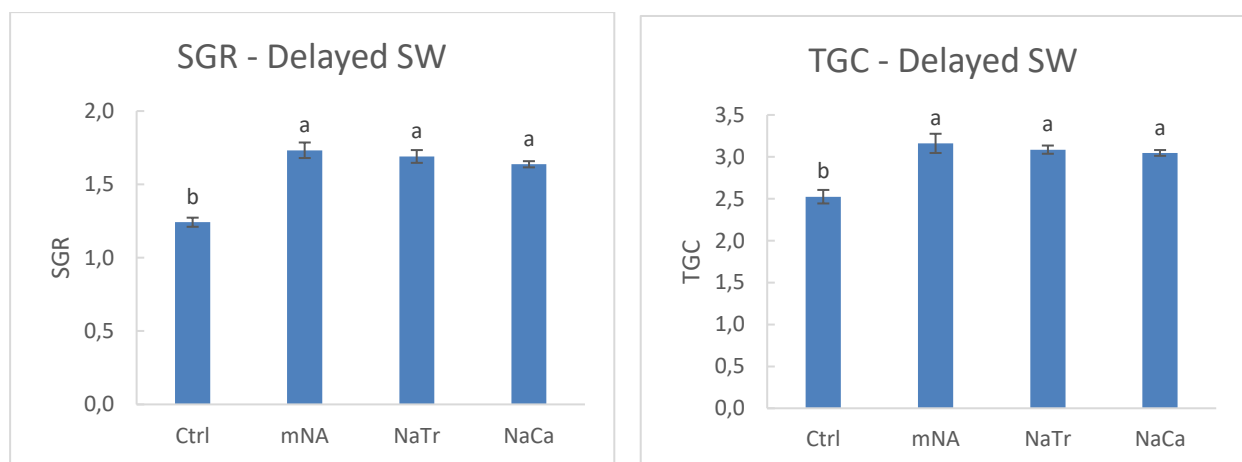


Figure 7 SGR and TGC in the SW period (week 53-6) for the delayed group. Data (n=3 tanks per dietary groups) are means shown with SEM. Significant differences are tested with One-way ANOVA followed by Tukey-HSD. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

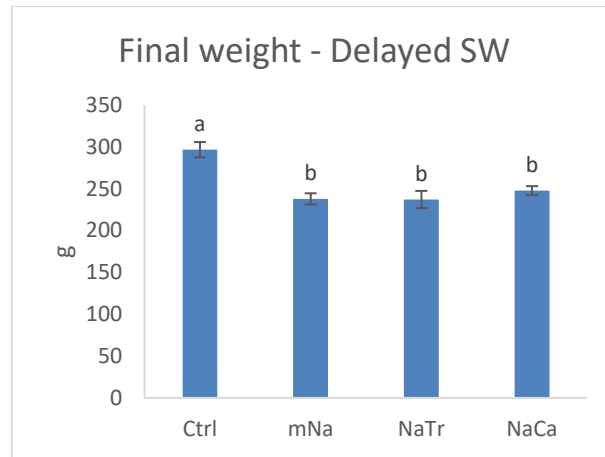


Figure 8 Final weight (g) in the SW period (week 53-6) for the delayed group. Data (n=3 tanks per dietary groups) are means shown with SEM. Significant differences are tested with One-way ANOVA followed by Tukey-HSD. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

4.3 Smolt parameters

4.3.1 Smolt index

At the start of the trial, the smolt index (ranging from 1-4) was 2.6. During the standard FW period, the smolt index ranged from 3.6-3.8 (Table 10), and between 3.8-4.0 for the delayed FW period. There were no significant differences in smolt index, except at FW4.

Table 10 Smolt index of salmon at start, during the standard FW period (FW1, FW3, FW4) and delayed FW period (FW6, FW8, FW10). The fish was given scores between 1-4 based on parr marks, silver colour and colour of the tailfin. Data (n=3 tanks per dietary treatment) are mean shown with SEM. Significant differences are tested with Kruskal-Wallis One-way ANOVA followed by Wilcox post-hoc test. Different letters indicate significant differences.

	Ctrl			mNa			NaTr			NaCa		
FW1	3.6	±	0.0	3.6	±	0.2	3.7	±	0.1	3.6	±	0.2
FW3	3.7	±	0.1	3.7	±	0.0	3.7	±	0.1	3.6	±	0.0
FW4	3.6	±	0.1	3.8	±	0.0	3.7	±	0.1	3.6	±	0.1
FW6	3.9	±	0.0	3.9	±	0.0	3.8	±	0.0	3.9	±	0.0
FW8	4.0	±	0.0	3.9	±	0.0	3.9	±	0.0	3.9	±	0.0
FW10	4.0	±	0.0	3.9	±	0.0	4.0	±	0.0	3.9	±	0.0

4.3.2 Condition factor

The condition factor was 1.23 at start, and between 1.24-1.34 in the standard FW period (FW1, FW3, FW4) (Figure 9). At FW3, the mNa group had significantly higher condition factor than the NaTr group (1.33 vs 1.28). In the delayed FW period, the condition factor was between 1.25-1.34, and at FW8, the control had significantly higher condition factor than the mNa group.

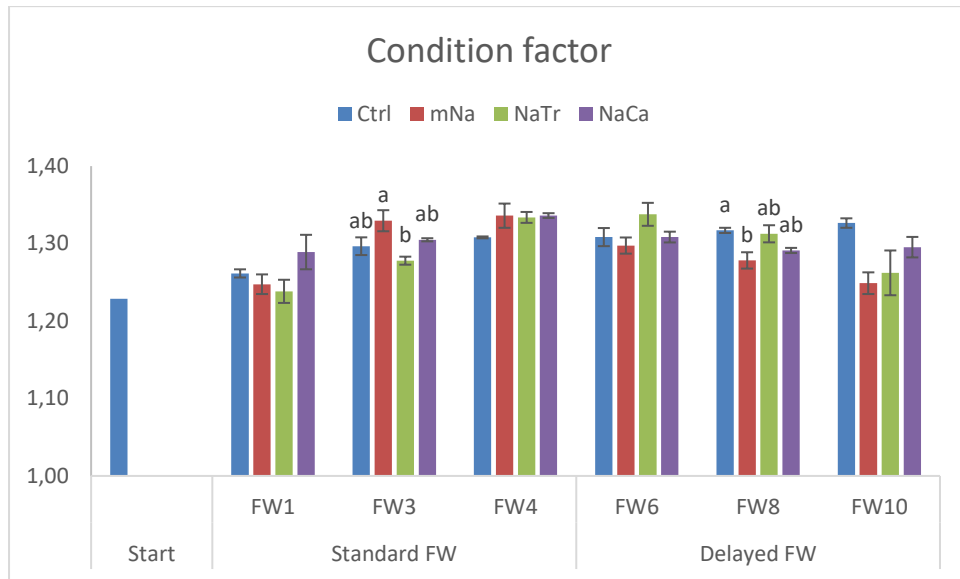


Figure 9 Condition factor of salmon at start, during the standard FW period (FW1, FW3, FW4) and delayed FW period (FW6, FW8, FW10). Data (n=3 tanks per dietary groups) are mean shown with SEM. Significant differences are tested with One-way ANOVA followed by Tukey-HSD. Different letters indicate significant differences.

4.3.3 Chloride and magnesium in seawater challenge test

After the seawater test, the serum chloride levels were significantly different between the dietary groups at FW6 and FW10 (Figure 10). At both time-points, the mNa group had significantly higher chloride level than the Control.

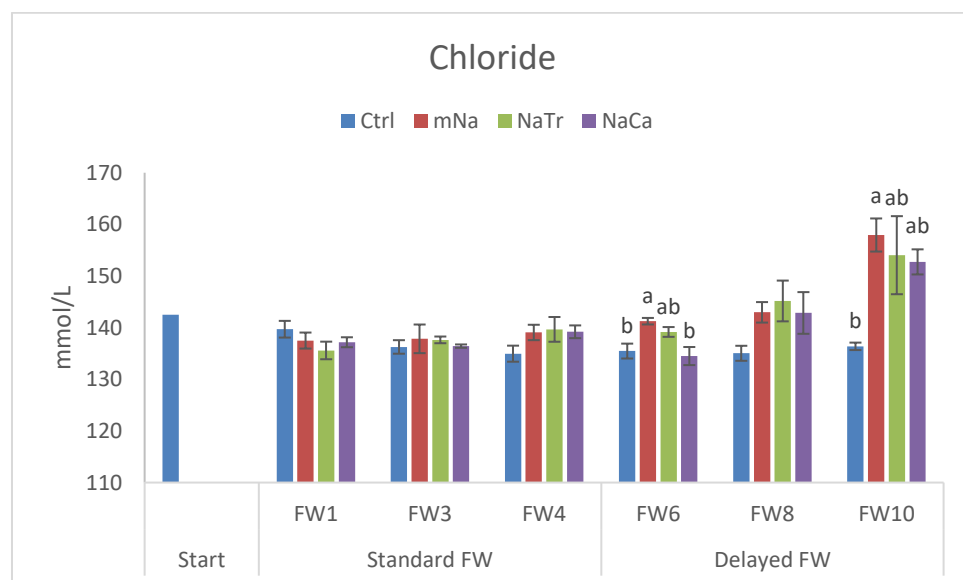


Figure 10 Chloride level (mmol/L) measured after seawater test (24h, about 34 ppm) at start, during the standard FW period (FW1, FW3, FW4) and delayed FW period (FW6, FW8, FW10). Data (n=3 tanks per dietary group) are mean shown with SEM. Significant differences are tested with One-way ANOVA followed by Tukey-HSD. Different letters indicate significant differences.

After the seawater test, there were no dietary effect on serum magnesium levels in the Standard FW group (Figure 11). In the delayed FW group, however, the mNa had significantly higher serum magnesium level than the Control at FW10, but not in FW6 and FW8.

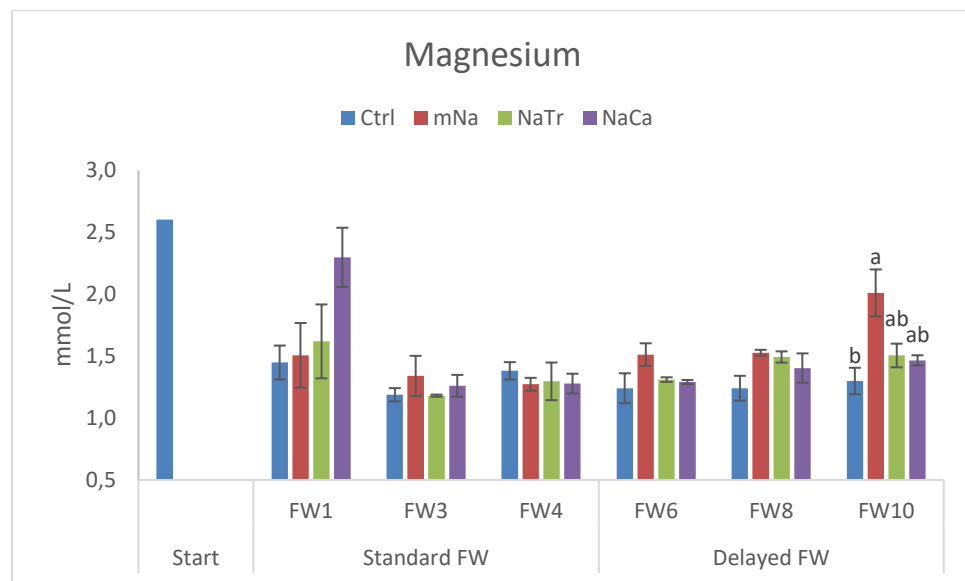


Figure 11 Magnesium level (mmol/L) measured after seawater test (24h, about 34 ppm) at start, during the standard FW period (FW1, FW3, FW4) and delayed FW period (FW6, FW8, FW10). Data (n=3 tanks per dietary group) are mean shown with SEM. Significant differences are tested with One-way ANOVA followed by Tukey-HSD. Different letters indicate significant differences.

Calculation of the difference in plasma chloride levels between freshwater sampled fish and fish that had gone through a SWT did not show significant differences between the dietary groups at any time-point investigated (figure 12).

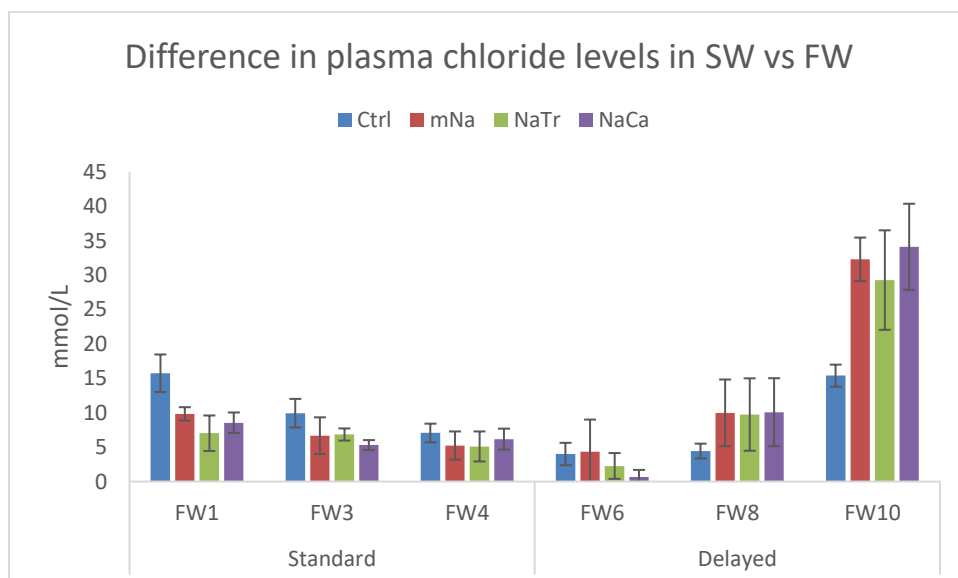


Figure 12 Difference in mean plasma chloride levels in freshwater and after seawater test. Data (n=3) are means with SEM. There were no significant differences tested with One-way ANOVA followed by Tukey-HSD using tank as unit.

4.3.4 Chloride and magnesium in the seawater period

Plasma chloride content at the first time point after transfer to seawater (SW6) in the standard SW group was between 135-138 mmol/L and dropped to 127-129 mmol/L at SW8 (Figure 13). In the delayed SW group, the plasma chloride levels were between 126-132 mmol/L. There were no significant differences between the dietary groups at any time-point. Plasma magnesium level in the Standard SW period ranged from 0.6–0.9 mmol/L, and in the Delayed SW period from 0.8-1.2 mmol/L (Figure 14). At SW10, mNa showed significantly higher magnesium level than NaTr, whereas NaCa showed significantly higher level than mNa and Control at SW15.

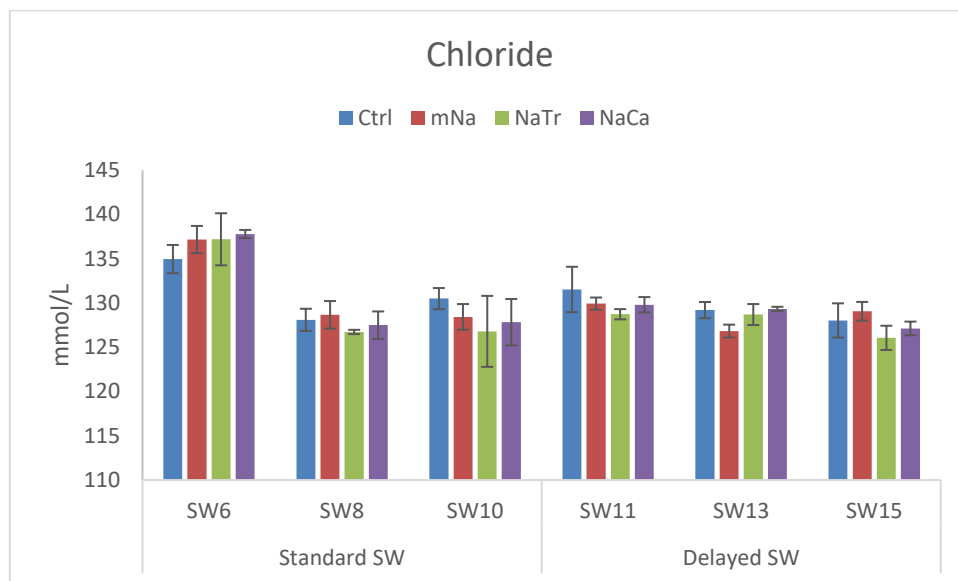


Figure 13 Chloride level (mmol/L) in the standard SW (SW6, SW8, SW10) and the delayed SW (SW11, SW13, SW15) groups. Data (n=3 tanks per dietary group) are mean shown with SEM. Significant differences are tested with One-way ANOVA followed by Tukey-HSD. Different letters indicate significant differences.

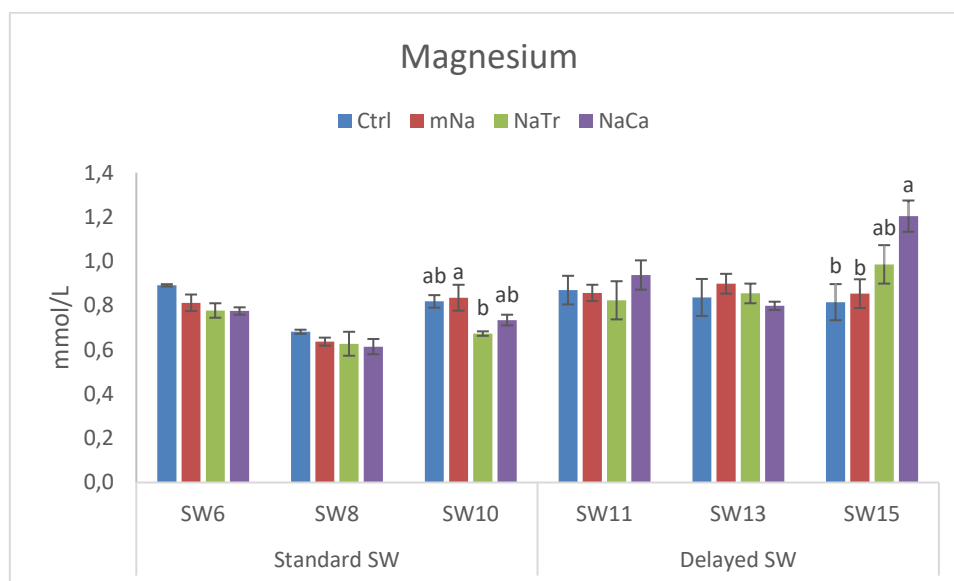


Figure 14 Magnesium level (mmol/L) in the standard SW (SW6, SW8, SW10) and the delayed SW (SW11, SW13, SW15) groups. Data ($n=3$ tanks per dietary group) are mean shown with SEM. Significant differences are tested with One-way ANOVA followed by Tukey-HSD. Different letters indicate significant differences.

4.4 Gene expression analysis

The gene expression analysis below presents relative RNA levels as related to the total average RNA levels of the surveyed genes. Positive values indicate a higher relative expression level, while negative values indicate a relatively lower expression level. Gene expression cannot directly be associated with protein levels as post-transcriptional processes are expected to influence the longevity of RNA molecules and the rate of RNA translation to protein. The rate of protein degradation also influences protein levels. See for example Christensen et al. (2018) for a discussion concerning $NKA\alpha$ RNA and protein levels.

Na-K ATPases $\alpha 1a$ and $\alpha 1b$

The fish were kept at constant light without winter signal, and this expectedly caused deviations from the “classical” scenario associated with smoltification (Figure 15). No significant decrease of the freshwater isoform $NKa1a$ was observed within dietary groups of standard FW during FW1-FW4. In the standard group, the expression level was significantly higher in Control with no difference between the test diets. At the last time-point for the delayed FW group (FW10), it remained stable in two of three test groups and slightly decreased in the control. Significantly lower expression of $NKa1a$ at FW8 and FW10 was detected in NaCa. A sharp drop took place shortly after seawater transfer, especially in Control and NaCa (standard group) (Figure 16). It was followed with stabilization at a lower level. All groups were equal except NaCa, which showed higher expression at SW10 and SW11, which was close to the levels in FW. The Control showed consistently low expression of the seawater isoform $NKa1b$ in FW with the exception for FW8 when $NKa1a$ also exhibited unexplained disturbances. No difference between the test diets was found at FW1-FW6, but their further maintenance in FW caused decrease, especially for the NaTr group. At FW8 and FW10, the expression levels were equal in control and test

groups. Transfer to SW induced rapid up-regulation *NKa1b* in the standard group (SW6), the effect was less pronounced in the delayed group (SW11) (Figure 17, 18). After that, its expression gradually decreased and stabilized at the level, which was still higher than in FW. Overall, the expression changes of the FW isoform were much greater: differences between the highest and lowest mean values in *NKa1a* and *NKa1b* were respectively 1520- and 2.9-fold.

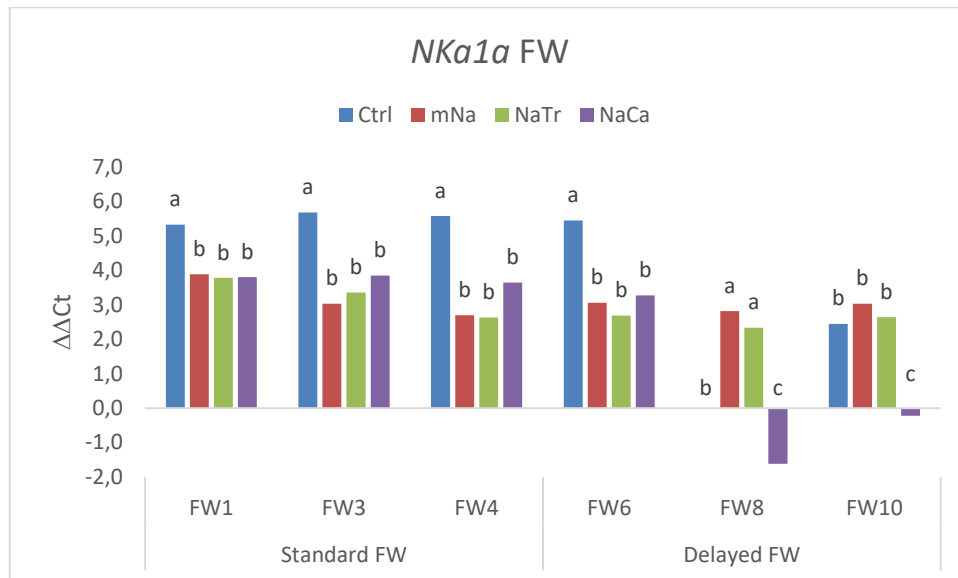


Figure 15 Gene expression of *NKa1a* in during the standard FW period (FW1, FW3, FW4) and delayed FW period (FW6, FW8, FW10). Data are normalized $\Delta\Delta Ct$. Different letters indicate significant differences (ANOVA, Duncan's test, $p < 0.05$).

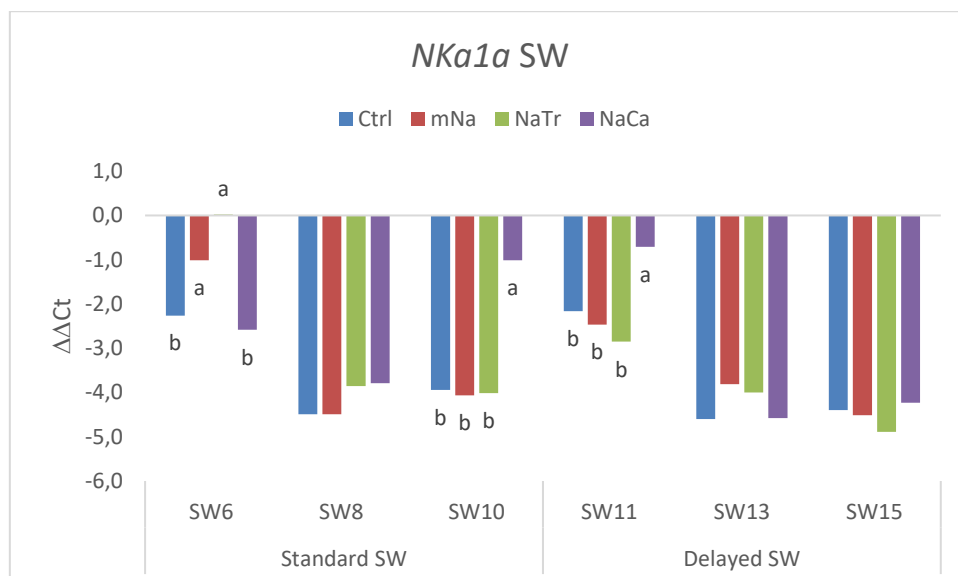


Figure 16 Gene expression of *NKa1a* in during the standard SW period (SW6, SW8, SW10) and delayed SW period (SW11, SW13, SW15). Data are normalized $\Delta\Delta Ct$.

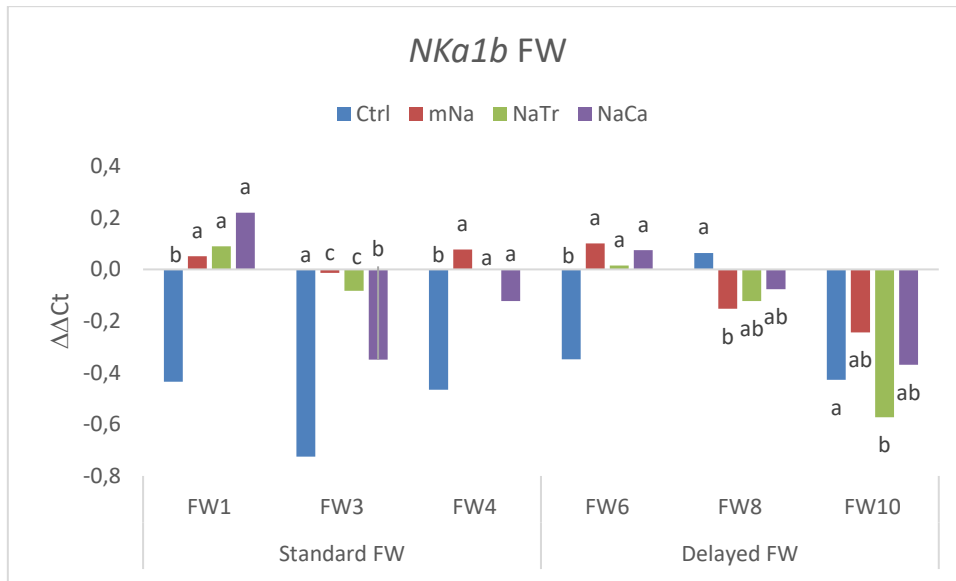


Figure 17 Gene expression of *Nka1b* in during the standard FW period (FW1, FW3, FW4) and delayed FW period (FW6, FW8, FW10). Data are normalized $\Delta\Delta Ct$.

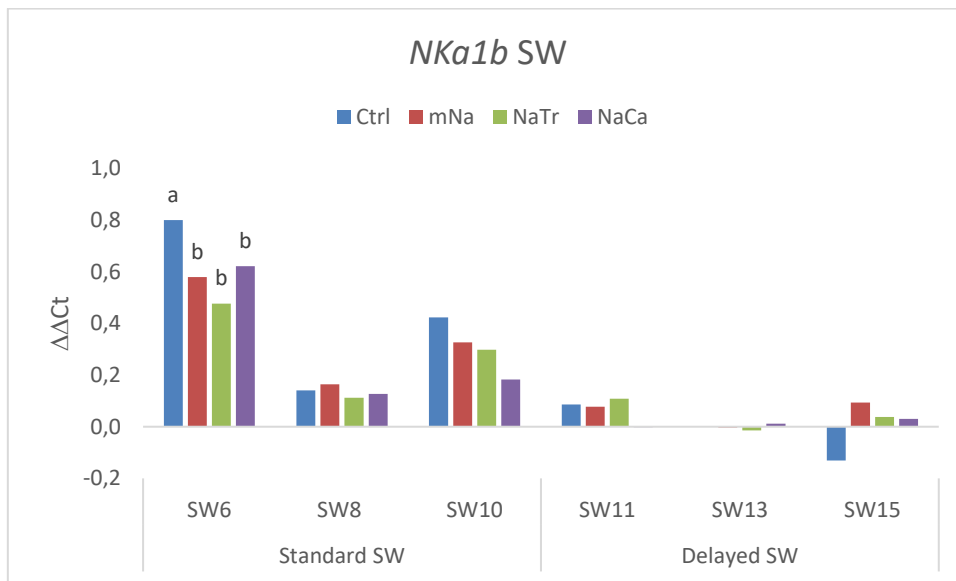


Figure 18 Gene expression of *Nka1b* in during the standard SW period (SW6, SW8, SW10) and delayed SW period (SW11, SW13, SW15). Data are normalized $\Delta\Delta Ct$.

A steady increase in the variance of *NKa1a* expression was observed in FW, and it was markedly lower in control during first six weeks (Figure 19). NaCa showed very high variation at two last FW time-points and in SW at weeks 10 and 11, when the mean expression was significantly lower than in other groups. A tendency to higher variation was also shown by NaTr, but differences from other groups were smaller.

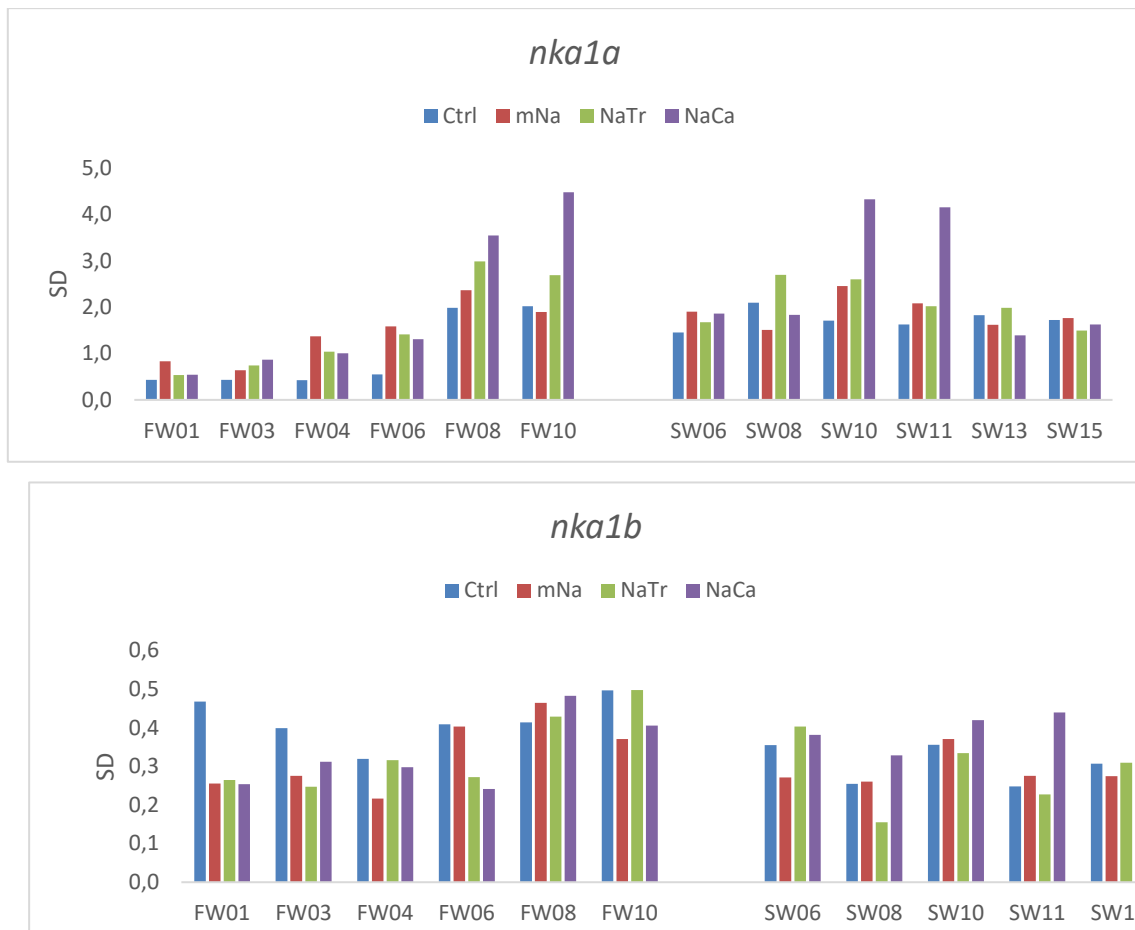


Figure 19 Variance of gene expression (SD).

To summarize, differences between control and test feeds were manifested mainly in FW, especially during first six weeks. While control group showed high and low levels or respectively FW and SW isoforms, this difference was blurred in fish fed with salt containing diets and the expression patterns were closer to marine. Addition of calcium markedly increased variance of 1a expression in four of 12 analysed time-points and this was associated with lower average levels. Effect of dietary tryptophan was minor.

Smoltification associated genes

Thyroid hormone has long been implicated in seasonal and developmental physiology in salmonids. Its action depends on tissue-localized regulation of levels of active thyroid hormone (triiodothyronine) through spatiotemporal expression of thyroid hormone deiodinase (dio) genes. Atlantic salmon possesses two types of 2-deiodinase paralogs, dio2a and dio2b, responsible for conversion of thyroxine to triiodothyronine. Dio2b is induced in the brain and gills in response to increasing daylength, while dio2a is induced in the gill by SW through the presence of osmotic response elements (OREs) in its promoter region (Lorgen et al., 2015). Myeloperoxidase (*mpo*), an immune gene producing free radicals has shown strong down-regulation after SWT in our previous studies, and the expression changes were greater in post-smolts with poor performance. Here, *dio2a* showed strong fluctuations, and differences between the dietary groups were seen in only two time points: FW1 and SW13 (Figure 20, 21). The developmental changes of *dio2b* were from low expression in FW followed with a relatively small but stable increase after SWT. There was a trend towards increased expression from FW6 to

FW10 in the delayed FW group, and from SW6 to SW10 (except for NaCa) for the standard SW group. Significant dietary effects on *dio2b* expression were observed at SW10 (standards group) and SW11 (delayed group).

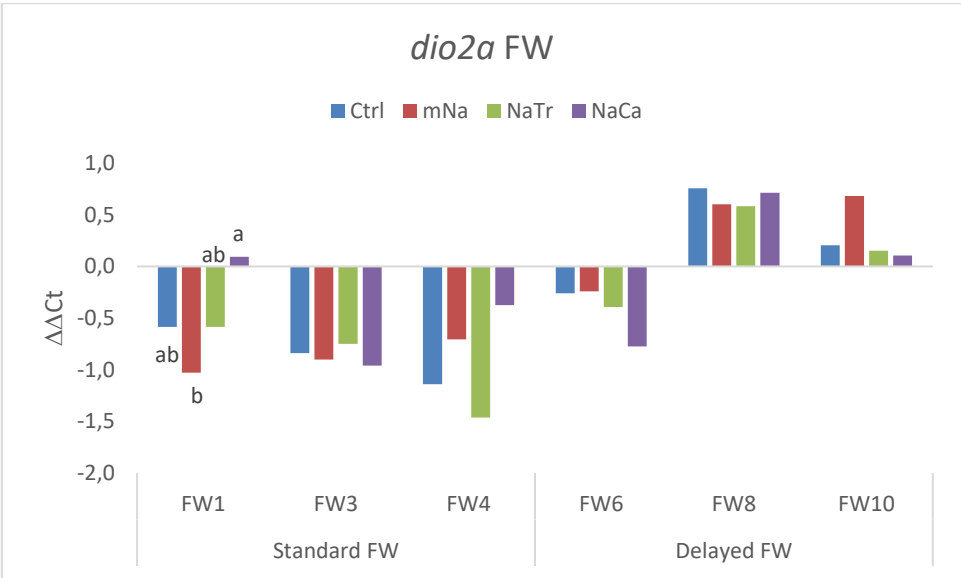


Figure 20 Gene expression of *dio2a* in during the standard FW period (FW1, FW3, FW4) and delayed FW period (FW6, FW8, FW10). Data are normalized $\Delta\Delta Ct$.

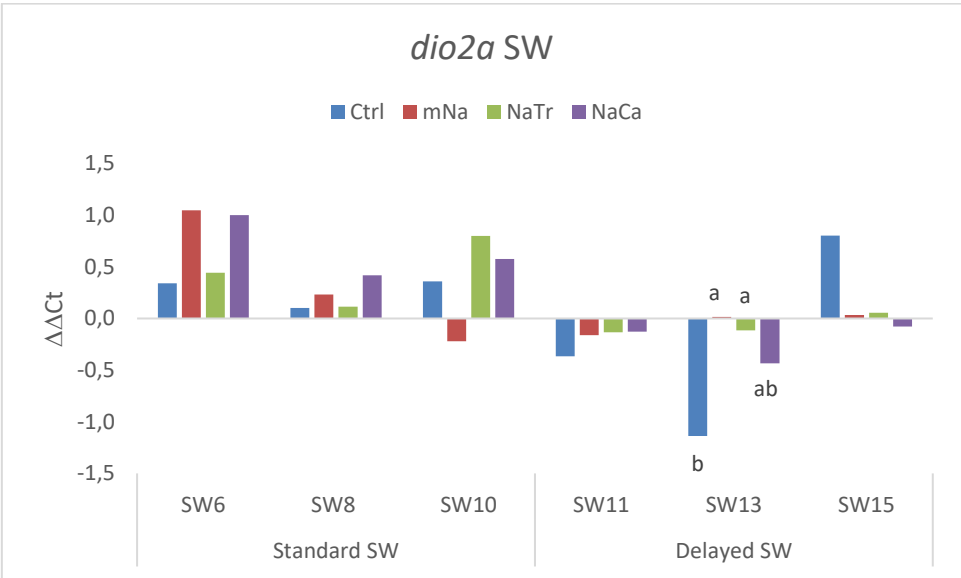


Figure 21 Gene expression of *dio2a* in during the standard SW period (SW6, SW8, SW10) and delayed SW period (SW11, SW13, SW15). Data are normalized $\Delta\Delta Ct$.

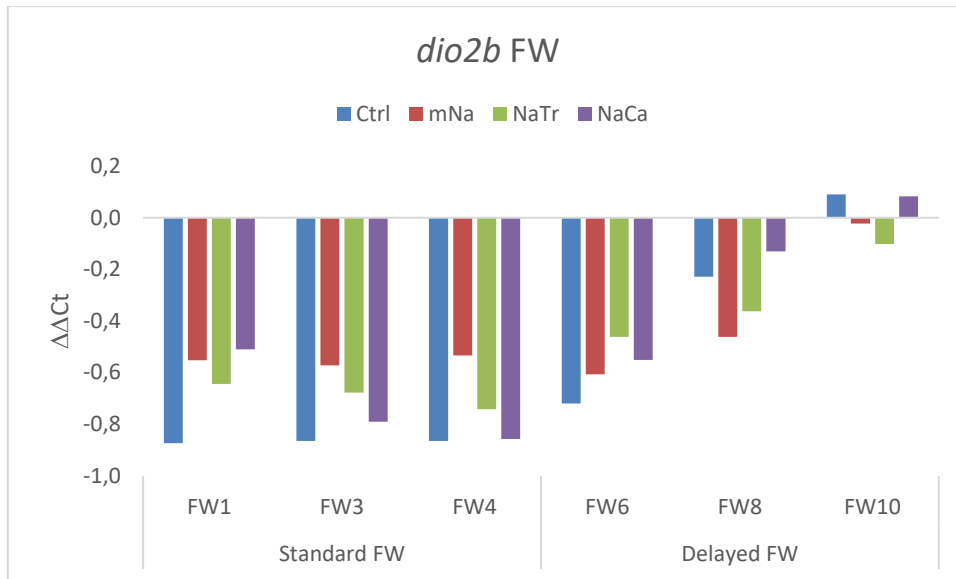


Figure 22 Gene expression of *dio2b* in during the standard FW period (FW1, FW3, FW4) and delayed FW period (FW6, FW8, FW10). Data are normalized $\Delta\Delta C_t$.

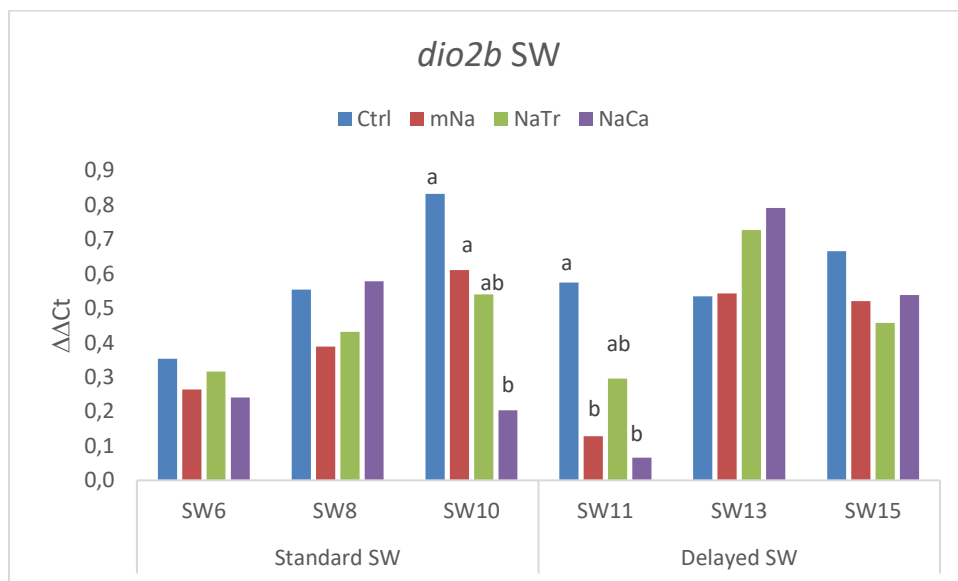


Figure 23 Gene expression of *dio2b* in during the standard SW period (SW6, SW8, SW10) and delayed SW period (SW11, SW13, SW15). Data are normalized $\Delta\Delta C_t$.

Mpo showed stable downregulation after SWT, which increased with time (Figure 24 and 25). Differences between the dietary groups were also small and unstable, best seen at FW4, SW11 and SW15. Of note was low expression of this gene in control at these time-points.

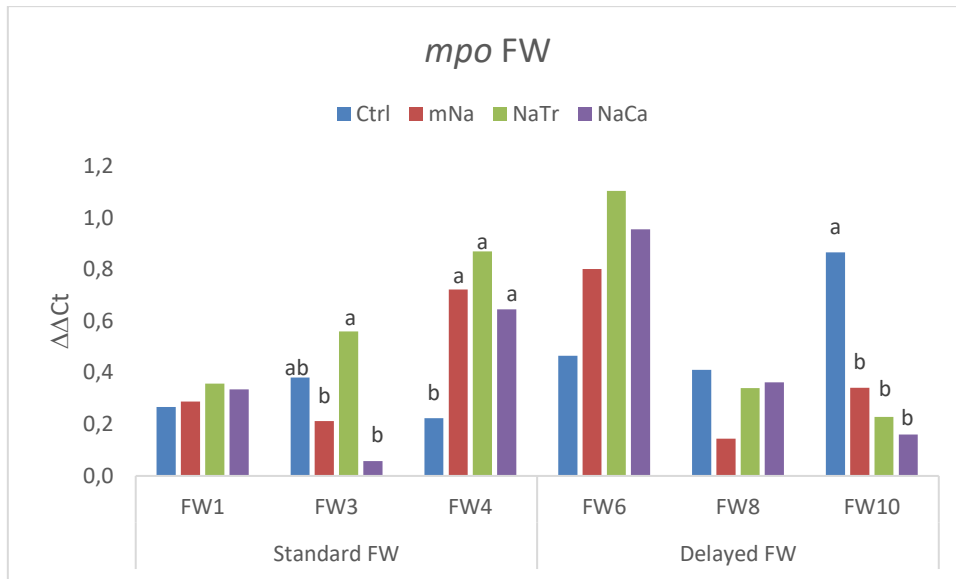


Figure 24 Gene expression of myeloperoxidase (*mpo*) in during the standard FW period (FW1, FW3, FW4) and delayed FW period (FW6, FW8, FW10). Data are normalized $\Delta\Delta Ct$.

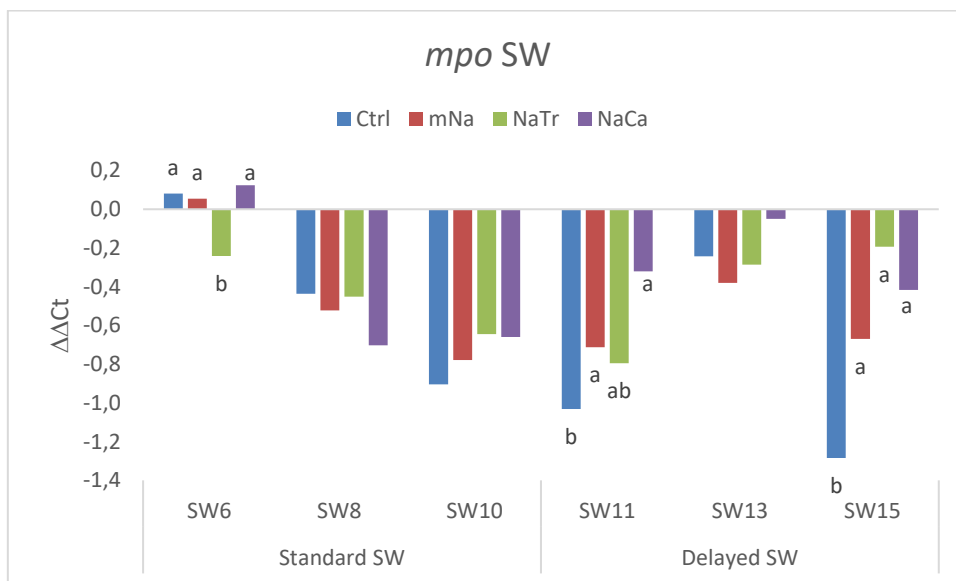


Figure 25 Gene expression of myeloperoxidase (*mpo*) in during the standard SW period (SW6, SW8, SW10) and delayed SW period (SW11, SW13, SW15). Data are normalized $\Delta\Delta Ct$.

Immune competence

The ImCom assay has been tested on a large number of samples including field material: smolts with good, intermediate, and poor performance (Krasnov et al. 2020 and unpublished data). A reference gill dataset (RGDS) was compiled to assess deviations from good / normal condition. Studies found two types of problems associated with respectively intermediate and high mortality: massive downregulation of immune genes or upregulation of gene markers of acute inflammation and stress – sentinels, this group includes *matrix metalloproteinase 9*, *serum amyloid a*, *cathelecidin*, *differentially regulated trout protein 1*, *immediate early response 2*, *il-1b* and *lect2*. Assay used in this trial also

included three most active genes of innate antiviral responses: *rtp2*, *isg15* and *gig2*. To evaluate the immune status, the mean $\Delta\Delta\text{Ct}$ and SD are used as simple integrative parameters. Neither difference between the study groups within this trial, nor significant deviation from the external reference – RGDS was found indicating a good condition of the immune system. Individual immune genes showed differences between the study groups but without any stable trend. The data are in the Appendix 9.

5 Discussion

During this trial, four groups of salmon were fed a control feed or different test feeds supplemented with salts and the amino acid tryptophan. In addition to different feed groups, a standard and a delayed production protocol was applied where the delayed group remained in FW for 6 additional weeks before being exposed to SW.

For both the standard and the delayed group there was a significant difference in growth in FW (TGC, SGR), where the control group grew faster and weighed more at the end of the FW phase. For the delayed group, the control fish weighed up to 1.5 times more than the test fed fish. The type of test feed did not influence growth. This is similar to the findings of earlier studies of salt-supplemented feeds (Nilsen et al., 2007) where growth rate of salmonids is adversely affected by salt-supplemented feeds. It is suggested by Salman and Eddy (1988) that the growth disparity is caused by protein dilution as their study found no significant differences in protein efficiency ratio among the fish feed different levels of salt. However, in the Salman and Eddy study (1988), diets varied much more in protein content (40.79-47.53 % dry weight) than in the current trial (table 7).

The fish fed the salt-supplement feeds grew better in SW than the control fish, however, neither the standard nor the delayed test fed groups caught up with the growth advantage of the control fish from FW. Other studies have also found that fish fed salt-supplemented feed grow better in SW compared to control fish (Salman & Eddy, 1988; Staurnes & Finstad, 2000).

Smolt index score did not vary among the different feed groups. No clear reduction of CF could be observed in any of the groups during the FW phase. Some minor, but significant, differences could be observed between salt fed fish at specific time points.

Plasma levels of chloride and magnesium measured after SWT showed small, and occasionally significant differences between groups. In the delayed group control fed fish showed lower levels of plasma chloride than the test fed fish, and the mNa fed group showed higher magnesium levels. During the SW stage very little difference in plasma chloride and magnesium was observed.

Gene expression in gill tissue was analysed for four genes associated with development of SW tolerance and SW response (*NKA* α isoforms 1a and 1b, deiodinase 2 isoforms *dio2a* and *dio2b*), and 18 immune- and stress-related genes. Both *NKA*'s showed temporal changes and responded to the diets. Salt-feeds significantly decreased *NKA* α 1a expression in standard FW. In the fish delayed on FW, a drop in *NKA* α 1a expression was observed in the control group and variance markedly increased in all groups, especially in NaCa. Transfer to SW suppressed *NKA* α 1a expression, and decrease was greater in control and NaCa. Later, significant deviations were found only in NaCa, mainly due to high variance. Expression of *NKA* α 1b was lower in the control group during the first six weeks in FW. A strong but transient increase of *NKA* α 1b took place in all groups after seawater transfer. Two *dio* isoforms were included as candidate markers of smoltification. Lorgen et al. (2015) showed a photoperiod history dependent increase in *dio2b* in the gill prior to SW transfer. An immediate upregulation of *dio2a* in SW exposed smolts was followed by an adjustment back to pre-SW levels within a month. Here, dietary effects on expression of *dio2a* and *2b* were minor and did not show any clear trend. Our previous studies found strong downregulation of myeloperoxidase (*mpo*) after seawater transfer. The functional role of this gene in the gill of postsmolts is unknown, but low expression has been associated with poor performance. In this study, *mpo* expression was significantly

lower in control, especially in the end of SW period. Other immune genes did not show significant deviation from the reference gill data set suggesting good condition of fish.

In fish exposed to a natural photoperiod, smoltification and SW pre-adaption can be observed by a marked decrease in *NKA α1a* mRNA and increase in *NKA α1b* mRNA already in FW (Nilsen et al., 2007). In fish reared under constant light this switch of isoforms takes place only after SW transfer. In this trial, effects of salt feeds were manifested at standard FW. Under the standard protocol the fish developed an intermediate phenotype with lower and higher expression of respectively *NKA 1a* and *1b* than the control.

The larger variation in gene expression in the delayed group while still in FW could be caused by desynchronization, whereby the introduction of salt-supplemented feed caused a temporary coordination of physiology moving towards SW-preadaptation. However as SW transfer is delayed, the fish i) becomes desynchronized due to endogenous rhythms, and ii) recession of the SW-pre-adaption occurs (Eriksson & Lundqvist, 1982)

Overall, results are not in favour of this protocol: sharp fluctuations and high individual variation of gene expression suggest deregulation. Lower stability and higher variation were also seen in salmon fed with additional calcium.

There are no major differences between the salt-supplemented feeds, however, the addition of calcium seems to create a more unstable gene expression profile, with higher individual variation.

6 References

- Krasnov A., Afanasyev S., Nylund S., Rebl A. (2020). Multigene expression assay for assessment of the immune status of Atlantic salmon. – *Genes* 11: 1236.
- Krasnov A., Burgerhout E., Johnsen H., Tveiten H., Bakke A.F., Lund H., Afanasyev S., Rebl A., Johansen L-H. (2021), Development of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) under hypoxic conditions induced sustained changes in expression of immune genes and reduced resistance to *Moritella viscosa*. – *Frontiers in Ecology and Evolution*.
- Bakke A., Rebl A., Frost P., Afanasyev S., Røyset K., Sjøteland T., Lund H., Boysen P., Krasnov A. (2021). Effect of two constant light regimens on antibody profiles and immune gene expression in Atlantic salmon following vaccination and experimental challenge with Salmonid Alphavirus. – *Fish Shellfish Immunol*.
- Christensen, A. K., Regish, A. M., & McCormick, S. D. (2018). Shifts in the relationship between mRNA and protein abundance of gill ion-transporters during smolt development and seawater acclimation in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 221, 63-73.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.03.020>
- Eriksson, L.-O., & Lundqvist, H. (1982). Salmonid Smoltification Circannual rhythms and photoperiod regulation of growth and smolting in Baltic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 28(1), 113-121. [https://doi.org/http://doi.org/10.1016/0044-8486\(82\)90014-X](https://doi.org/http://doi.org/10.1016/0044-8486(82)90014-X)
- Lorgen, M., Casadei, E., Król, E., Douglas, A., Birnie, M. J., Ebbesson, L. O., Nilsen, T. O., Jordan, W. C., Jørgensen, E. H., & Dardente, H. (2015). Functional Divergence of Type 2 Deiodinase Paralogs in the Atlantic Salmon. *Curr. Biol.*, 25(7), 936-941.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.01.074>
- Nilsen, T. O., Ebbesson, L. O. E., Madsen, S. S., McCormick, S. D., Andersson, E., Björnsson, B. T., Prunet, P., & Stefansson, S. O. (2007). Differential expression of gill Na⁺,K⁺-ATPase α - and β -subunits, Na⁺,K⁺,2Cl⁻ cotransporter and CFTR anion channel in juvenile anadromous and landlocked Atlantic salmon *Salmo salar*. *J. Exp. Biol.*, 210(16), 2885-2896.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1242/jeb.002873>
- Salman, N. A., & Eddy, F. B. (1988). Effect of dietary sodium chloride on growth, food intake and conversion efficiency in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Aquaculture*, 70(1), 131-144. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0044-8486\(88\)90012-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0044-8486(88)90012-9)
- Staurnes, M., & Finstad, B. (2000). The effects of dietary NaCl supplement on hypo-osmoregulatory ability and sea water performance of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) smolts. *Aquaculture Research*, 31(10), 737-743.<https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2000.00495.x>

Appendix 1 Production data of the fish (from the Aquaculture research station in Kårvik, Tromsø)

ORIGIN – AND PRODUCTION DATA for fish produced at THE AQUACULTURE RESEARCH STATION IN TROMSØ, land unit.

SPECIES: *Salmo salar L*

GENERATION: 2020

TRIBE: Standard gr. 1 (Aqua Gen Atlantic QTL-innOva PRIME)

PROVIDER: Aqua Gen Steigen

TANK NO.: C26, C27 og C29

Receiver: Mette W. Breiland

Project no: 20021

PRODUCTION DATA: 2020

	DATE	TEMPERATURE	Day x temp (celsius)
Admitted	09.01.2020	4-6	397
Eggs	-	8	-
Hatching	23.01.20	8	501
Start of feed	07.03.20	12	850

2020

	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep
Light	0:24	0:24	0:24/ 24:0	24:0	24:0	24:0	24:0	24:0	24:0
T C	8	8	8/12 9	9	9	9/12	12	12/ Nat	Nat/ 12
Feed	-	-	S.T	N.S	N.S	N.S	N.S/ N.O	N.O	N.O

Feed: ST=Nutra ST, Skretting. N.S = Nutra Sprint, Skretting. NO = Nutra Olympic, Skretting.

Light: 24:0 = continuous light, 6:18 = 6 h light and 18 hours of darkness, 0:24= continuous darkness

Status by delivery/notes:

Winter light regime from: None

Temperature during winter regime: None

Summer light regime from: None

Temperature during summer regime: None

Date of vaccination: None

Disease: None

Weight at vaccination: None

Treatment: None

Type of vaccination: None

Pit-tag: None

Number of fish vaccinated: None

Total number of fish: 3360

Date of transfer: 30.09.2020

Weight at transfer: 34,0 g

Fish is received - signature:

Provided by:

Date:

Enclosure:

Archived data

Jan Eirik Jensen

Engineer, Land Unit, section C

Appendix 2 Water quality registrations at the Aquaculture Research station in Kårvik, Tromsø

Appendix 3 Distribution of all fish at the start of the trial, 12 tanks, standard FW group

Table 3.1 Distribution of the four different feed codes, A-D, in the twelve tanks (E105-1 to E105-12) at the start of the feeding trial.

	E105-1	E105-2	E105-3	E105-4	E105-5	E105-6	E105-7	E105-8	E105-9	E105-10	E105-11	E105-12
Feed code A		X					X				X	
Feed code B				X		X			X			
Feed code C					X					X		X
Feed code D	X		X					X				

Appendix 4 Tank distribution in Room E102 and E103 (standard seawater group)

Table 4.1 Tank distribution in the two new rooms (E105 and E106) when the first group of fish (70 fish/tank) was transferred from their respective tanks (E105-1 to E105-12) to its seawater tanks (E102-1 to E102-6 and E103-1 to E103-6).

	E102-1	E102-2	E102-3	E102-4	E102-5	E102-6	E103-1	E103-2	E103-3	E103-4	E103-5	E103-6
E105-1						X						
E105-2					X							
E105-3				X								
E105-4			X									
E105-5		X										
E105-6	X											
E105-7												X
E105-8											X	
E105-9										X		
E105-10									X			
E105-11								X				
E105-12							X					

Appendix 6 Fatty acid composition of the feed

Table 6.1 Fatty acids (% of total fatty acids) of the feeds (unidentified fatty acids: 5.3-5.8 %, fatty acids below LOQ: 0.5-0.7 %). U (%): Expanded uncertainty of measurement (coverage factor k=2).

	Control	mNa	NaTr	NaCa	U (%)
C14:0	4.98	5.04	5.10	5.08	10
C15:0	0.39	0.39	0.40	0.40	10
C16:0	15.91	15.98	16.39	16.11	10
C17:0	0.36	0.38	0.38	0.37	10
C18:0	3.18	3.12	3.21	3.14	10
C20:0	0.33	0.33	0.32	0.32	10
C22:0	0.19	0.17	0.17	0.17	10
C23:0	0.10	0.10	0.11	0.12	10
Sum SAT	25.7	25.7	26.2	25.8	
C16:1n-7	4.71	4.80	4.74	4.80	10
C18:1n-9	21.41	21.47	21.14	21.27	10
C18:1n7	2.79	2.85	2.83	2.86	10
C20:1n-11	0.29	0.31	0.30	0.30	10
C20:1n-9	2.02	2.08	2.06	2.09	10
C22:1n-9	0.34	0.33	0.33	0.34	10
C22:1n-11	2.15	2.23	2.20	2.24	10
C24:1n-9	0.43	0.45	0.45	0.44	10
Sum MUFA	34.2	34.5	34.1	34.4	
C18:2n-6	8.58	8.29	8.05	8.14	10
C18:3n-6	0.11	0.12	0.11	0.12	10
C20:2n-6	0.27	0.25	0.24	0.25	10
C20:3n-6	0.10	0.11	0.10	0.10	10
C20:4n-6	0.72	0.72	0.71	0.70	10
C22:5n-6	0.30	0.29	0.29	0.30	10
Sum N-6	10.2	9.9	9.7	9.8	
C18:3n-3	3.05	2.98	2.99	3.02	10
C18:4n-3	1.44	1.46	1.44	1.45	10
C20:3n-3	0.13	0.14	0.14	0.14	10
C20:4n-3	0.43	0.43	0.42	0.42	10
C20:5n-3	9.36	9.16	9.09	9.14	10
C21:5n-3	0.34	0.34	0.33	0.34	10
C22:5n-3	1.21	1.18	1.18	1.19	10
C22:6n-3	8.61	8.67	8.59	8.65	10
Sum N-3	24.6	24.4	24.2	24.4	
Sum PUFA	34.9	34.3	33.9	34.2	

Appendix 7 Minerals in the feed

Table 7.1 Minerals in the feeds Control, mNa, NaTr and NaCa. U (%): Expanded uncertainty of measurement (coverage factor $k=2$).

	Control	mNa	NaTr	NaCa	U (%)
Sodium (%)	0.61	3.04	2.92	2.75	12
Potassium (%)	0.891	0.747	0.789	0.822	12
Magnesium (%)	0.252	0.190	0.200	0.201	12
Iron (mg/kg)	252	221	233	215	18
Copper (mg/kg)	12.3	8.4	14.9	11.2	18
Manganese (mg/kg)	48.2	43.3	45.3	46.1	18
Zinc (mg/kg)	208	198	220	203	18
Calcium (%)	1.58	1.47	1.58	1.63	12
Phosphorus (%)	1.83	1.69	1.79	1.66	12

Appendix 8 Free and total amino acids in the feed

Table 8.1 Free amino acids (g/100g) in the feeds Control, mNa, NaTr and NaCa. U (%): Expanded uncertainty of measurement (coverage factor $k=2$).

	Control	mNa	NaTr	NaCa	U (%)
Total amino acids	2.549	2.342	2.662	2.303	
Tryptophan	0.011	0.025	0.269	0.011	10

Table 8.2 Amino acid (g/100g) profile of the feeds. U (%): Expanded uncertainty of measurement (coverage factor $k=2$).

	Control	mNa	NaTr	NaCa	U (%)
Tryptophan	0.483	0.458	0.728	0.475	10
Total amino acids	45.517	44.712	44.133	45.568	

Appendix 9 Gene expression of immune genes

Time-feed	isg15				RTP2				tribi				CAMP				drtp1				ier2-2				il1b				lect2				MMP9				SAAS				MPO				CIQL2				C7				FCGR1A				hp				hsp11				serpine1				lyz2			
	(1)	(2)	(3)	(4)	(1)	(2)	(3)	(4)	(1)	(2)	(3)	(4)	(1)	(2)	(3)	(4)	(1)	(2)	(3)	(4)	(1)	(2)	(3)	(4)	(1)	(2)	(3)	(4)	(1)	(2)	(3)	(4)	(1)	(2)	(3)	(4)	(1)	(2)	(3)	(4)	(1)	(2)	(3)	(4)	(1)	(2)	(3)	(4)	(1)	(2)	(3)	(4)	(1)	(2)	(3)	(4)																
FW1-CL	0.65	0.23	0.46	0.48	0.52	0.28	0.64	0.70	0.13	0.97	0.75	0.39	0.09	0.00	0.08	0.67	0.83	0.49	0.74	0.53	0.84	0.78	0.19	0.66	0.37	0.13	0.97	0.76	0.55	0.82	0.88	0.65	0.58	0.27	0.20	0.49	0.50	0.47	0.92	0.95	0.63	0.60	0.83	0.24	0.67	0.44	0.02	0.49	0.10	0.00	0.00	0.59	0.47	0.52																		
FW1-mNa	0.65	0.12	0.26	0.48	0.20	0.08	0.64	0.43	0.05	0.97	0.74	0.38	0.09	0.19	0.94	0.67	0.54	0.29	0.74	0.36	0.87	0.78	0.29	0.84	0.37	0.49	0.37	0.76	0.39	0.92	0.88	0.74	0.67	0.27	0.83	0.08	0.50	0.18	0.46	0.95	0.66	0.63	0.83	0.18	0.81	0.44	0.10	0.92	0.10	0.17	0.18	0.59	0.81	0.88																		
FW1-NaCa	0.23	0.12	0.59	0.52	0.20	0.61	0.70	0.43	0.23	0.75	0.74	0.54	0.00	0.19	0.21	0.83	0.54	0.61	0.53	0.36	0.43	0.19	0.29	0.37	0.13	0.49	0.13	0.55	0.39	0.43	0.65	0.74	0.89	0.20	0.83	0.05	0.47	0.18	0.50	0.63	0.66	0.95	0.24	0.18	0.12	0.02	0.10	0.08	0.00	0.17	0.98	0.47	0.81	0.91																		
FW1-NaTr	0.46	0.26	0.59	0.28	0.08	0.61	0.13	0.05	0.23	0.39	0.38	0.54	0.08	0.94	0.21	0.49	0.29	0.61	0.84	0.87	0.43	0.66	0.84	0.37	0.97	0.37	0.13	0.82	0.92	0.43	0.58	0.67	0.89	0.49	0.08	0.05	0.92	0.46	0.50	0.60	0.63	0.95	0.67	0.81	0.12	0.49	0.92	0.08	0.00	0.18	0.98	0.52	0.88	0.91																		
FW3-CL	0.01	0.00	0.01	0.95	0.12	0.08	0.03	0.00	0.03	0.82	0.70	0.75	0.66	0.07	0.10	0.06	0.00	0.00	0.10	0.02	0.43	0.50	0.72	0.70	0.04	0.02	0.25	0.97	0.88	0.72	0.34	0.06	0.25	0.19	0.05	0.05	0.10	0.80	0.97	0.23	0.07	0.06	0.69	0.26	0.61	0.09	0.91	0.84	0.05	0.08	0.02	0.05	0.08	0.66																		
FW3-mNa	0.01	0.65	0.81	0.95	0.11	0.08	0.03	0.04	0.92	0.82	0.56	0.91	0.66	0.03	0.26	0.06	0.37	0.27	0.10	0.44	0.38	0.50	0.73	0.74	0.04	0.81	0.32	0.97	0.84	0.70	0.34	0.35	0.04	0.19	0.50	0.50	0.10	0.15	0.10	0.23	0.53	0.47	0.69	0.43	0.88	0.09	0.07	0.13	0.05	0.93	0.74	0.05	0.85	0.02																		
FW3-NaCa	0.00	0.65	0.80	0.12	0.11	0.83	0.00	0.04	0.04	0.70	0.56	0.50	0.07	0.03	0.00	0.00	0.37	0.79	0.02	0.44	0.10	0.72	0.73	0.99	0.02	0.81	0.24	0.86	0.84	0.84	0.06	0.35	0.00	0.05	0.50	0.98	0.80	0.15	0.82	0.07	0.53	0.90	0.26	0.43	0.51	0.91	0.07	0.76	0.08	0.93	0.69	0.08	0.85	0.03																		
FW3-NaTr	0.01	0.81	0.80	0.08	0.08	0.83	0.03	0.92	0.04	0.75	0.91	0.50	0.10	0.20	0.00	0.00	0.27	0.79	0.43	0.38	0.10	0.70	0.74	0.98	0.25	0.32	0.24	0.72	0.70	0.84	0.25	0.04	0.00	0.05	0.50	0.98	0.97	0.10	0.82	0.61	0.88	0.51	0.84	0.12	0.76	0.02	0.74	0.69	0.66	0.02	0.03	0.03																				
FW4-CL	0.42	0.53	0.19	0.27	0.82	0.37	0.36	0.67	0.07	0.26	0.38	0.09	0.01	0.01	0.00	0.44	0.25	0.04	0.83	0.90	0.75	0.06	0.63	0.42	0.16	0.52	0.65	0.64	0.73	0.64	0.00	0.01	0.00	0.41	0.03	0.03	0.29	0.69	0.86	0.03	0.09	0.05	0.51	0.51	0.24	0.62	0.89	0.53	0.67	0.38	0.56	0.52	0.17	0.04																		
FW4-mNa	0.42	0.83	0.05	0.27	0.20	0.05	0.36	0.20	0.01	0.26	0.77	0.54	0.01	0.83	0.41	0.44	0.67	0.19	0.83	0.75	0.91	0.06	0.14	0.25	0.16	0.39	0.30	0.64	0.44	1.00	0.00	0.59	0.35	0.41	0.18	0.18	0.29	0.17	0.33	0.03	0.59	0.80	0.51	0.98	0.57	0.62	0.55	0.86	0.67	0.21	0.85	0.52	0.41	0.13																		
FW4-NaCa	0.53	0.83	0.07	0.82	0.20	0.48	0.67	0.20	0.15	0.38	0.77	0.39	0.01	0.83	0.50	0.25	0.67	0.35	0.90	0.75	0.68	0.63	0.14	0.71	0.52	0.39	0.81	0.73	0.44	0.44	0.01	0.59	0.16	0.03	0.18	0.97	0.69	0.17	0.61	0.09	0.59	0.74	0.51	0.98	0.58	0.89	0.55	0.46	0.38	0.21	0.16	0.17	0.41	0.46																		
FW4-NaTr	0.19	0.05	0.07	0.37	0.05	0.48	0.07	0.01	0.15	0.09	0.54	0.39	0.00	0.41	0.50	0.19	0.19	0.35	0.75	0.91	0.68	0.42	0.25	0.71	0.65	0.30	0.81	0.64	1.00	0.44	0.00	0.35	0.16	0.03	0.18	0.97	0.86	0.33	0.61	0.05	0.80	0.74	0.24	0.57	0.56	0.53	0.86	0.46	0.56	0.85	0.16	0.04	0.13	0.46																		
FW6-CL	0.56	0.36	0.56	0.38	0.84	0.72	0.21	0.56	0.99	0.32	0.17	0.11	0.02	0.00	0.00	0.04	0.85	0.69	0.87	0.44	0.47	0.98	0.71	0.15	0.17	0.43	0.02	0.18	0.27	0.78	0.03	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.24	0.38	0.46	0.45	0.88	0.23	0.87	0.32	0.38	0.26	0.50	0.23	0.98	0.66	0.60	0.25	0.18	0.08																		
FW6-mNa	0.56	0.69	0.97	0.38	0.48	0.24	0.21	0.46	0.21	0.32	0.67	0.51	0.02	0.58	0.38	0.04	0.07	0.10	0.87	0.37	0.40	0.98	0.70	0.15	0.17	0.50	0.33	0.18	0.78	0.28	0.03	0.32	0.05	0.01	0.79	0.46	0.24	0.72	0.63	0.45	0.38	0.60	0.87	0.39	0.32	0.26	0.60	0.92	0.98	0.65	0.59	0.25	0.80	0.50																		
FW6-NaCa	0.36	0.69	0.69	0.84	0.48	0.61	0.56	0.46	0.57	0.17	0.67	0.79	0.00	0.58	0.68	0.85	0.07	0.81	0.44	0.37	0.94	0.71	0.70	0.28	0.43	0.50	0.12	0.27	0.78	0.40	0.00	0.32	0.29	0.01	0.79	0.34	0.38	0.72	0.88	0.88	0.38	0.19	0.32	0.39	0.07	0.50	0.60	0.55	0.66	0.65	0.91	0.18	0.80	0.64																		
FW6-NaTr	0.56	0.97	0.69	0.72	0.24	0.61	0.99	0.21	0.57	0.11	0.51	0.79	0.00	0.38	0.68	0.69	0.10	0.81	0.47	0.40	0.94	0.15	0.15	0.26	0.42	0.33	0.12	0.78	0.28	0.40	0.00	0.05	0.29	0.00	0.46	0.34	0.46	0.63	0.88	0.23	0.60	0.19	0.38	0.32	0.07	0.23	0.92	0.55	0.60	0.59	0.91	0.08	0.50	0.64																		
SW6-CL	0.33	0.26	0.56	0.01	0.00	0.85	0.43	0.07	0.35	0.51	0.99	0.83	0.99	0.38	0.40	0.20	0.16	0.33	0.35	0.44	0.78	0.00	0.04	0.15	0.06	0.99	0.19	0.49	0.30	0.11	0.86	0.76	0.04	0.87	0.06	0.48	0.23	0.22	0.66	0.00	0.00	0.00	0.76	0.34	0.08	0.39	0.20	0.89	0.88	0.68	0.65	0.76	0.23	0.94																		
SW6-mNa	0.33	0.83	0.14	0.01	0.62	0.01	0.43	0.28	0.09	0.51	0.51	0.62	0.99	0.38	0.40	0.20	0.88	0.72	0.35	0.84	0.49	0.00	0.36	0.12	0.06	0.06	0.52	0.49	0.69	0.33	0.86	0.66	0.05	0.87	0.04	0.57	0.23	0.98	0.41	0.00	0.45	0.11	0.76	0.48	0.13	0.39	0.60	0.60	0.56	0.76	0.15	0.81																				
SW6-NaCa	0.26	0.83	0.10	0.00	0.62	0.00	0.07	0.28	0.00	0.99	0.51	0.83	0.38	0.38	0.96	0.16	0.88	0.62	0.44	0.84	0.60	0.40	0.36	0.46	0.99	0.06	0.18	0.30	0.69	0.53	0.76	0.66	0.02	0.06	0.04	0.01	0.22	0.98	0.41	0.00	0.45	0.37	0.34	0.48	0.37	0.20	0.61	0.18	0.69	0.60	0.94	0.23	0.15	0.21																		
SW6-NaTr	0.56	0.14	0.10	0.85	0.01	0.00	0.83	0.62	0.83	0.40	0.40	0.96	0.33	0.72	0.62	0.78	0.49	0.60	0.70	0.49	0.60	0.15	0.12	0.46	0.19	0.52	0.18	0.11	0.33	0.53	0.04	0.05	0.02	0.66	0.41	0.41	0.00	0.11	0.37	0.08	0.13	0.37	0.89	0.36	0.18	0.65	0.56	0.94	0.94	0.81	0.21	0.21																				
SW8-CL	0.08	0.35	0.33	0.63	0.84	0.83	0.53	0.77	0.53	0.89	0.47	0.80	0.42	0.20	0.33	0.92	0.62	0.78	0.86	0.63	0.66	0.79	0.95	0.85	0.85	0.95	0.47	0.79	0.87	0.86	0.57	0.11	0.91	0.56	0.63	0.23	0.75	0.38	0.32	0.92	0.64	0.81	0.34	0.31	0.35	0.52	0.20	0.66	0.70	0.86	0.49	0.27	0.81	0.91																		
SW8-mNa	0.08	0.36	0.36	0.63	0.76	0.78	0.53	0.71	0.99	0.89	0.41	0.90	0.42	0.59	0.82	0.92	0.68	0.72	0.86	0.74	0.55	0.79	0.75	0.66	0.85	0.88	0.57	0.79	0.90	0.68	0.57	0.26	0.62	0.56	0.90	0.51	0.75	0.55	0.47	0.92	0.59	0.75	0.34	0.94	0.97	0.52	0.46	0.81	0.70	0.82	0.73	0.27	0.19	0.28																		
SW8-NaCa	0.35	0.36	0.92	0.84	0.76	1.00	0.77	0.71	0.71	0.47	0.41	0.36	0.20	0.59	0.73	0.62	0.68	0.47	0.63	0.74	0.39	0.95	0.75	0.89	0.95	0.88	0.49	0.87	0.90	0.75	0.11	0.26	0.12	0.63	0.90	0.45	0.38	0.55	0.88	0.64	0.59	0.79	0.31	0.94	0.91	0.20	0.46	0.36	0.86	0.82	0.59	0.81	0.19	0.75																		
SW8-NaTr	0.33	0.36	0.92	0.83	0.76	1.00	0.53	0.99	0.71	0.80	0.90	0.36	0.33	0.82	0.73	0.																																																								

<i>isg15</i>	"Duncan test; variable ISG15 (##12_ddCt) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .77299, df = 1354.0"
<i>rtp2</i>	"Duncan test; variable RTP2 (##12_ddCt) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 1.1297, df = 1354.0"
<i>trib1</i>	"Duncan test; variable TRIB1 (gig2) (##12_ddCt) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .42739, df = 1354.0"
<i>camp</i>	"Duncan test; variable CAMP (##12_ddCt) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .77940, df = 1354.0"
<i>drtp1</i>	"Duncan test; variable drtp1 (##12_ddCt) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .73437, df = 1354.0"
<i>ier2-2</i>	"Duncan test; variable IER2-2 (##12_ddCt) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .42043, df = 1354.0"
<i>il1b</i>	"Duncan test; variable IL1B (##12_ddCt) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .41367, df = 1354.0"
<i>lect2</i>	"Duncan test; variable LECT2 (##12_ddCt) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .34208, df = 1354.0"
<i>mmp9</i>	"Duncan test; variable MMP9 (##12_ddCt) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .25141, df = 1354.0"
<i>saa5</i>	"Duncan test; variable SAA5 (##12_ddCt) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .98282, df = 1354.0"
<i>mpo</i>	"Duncan test; variable MPO (##12_ddCt) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .28774, df = 1354.0"
<i>c1ql2</i>	"Duncan test; variable C1QL2 (##12_ddCt) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .68909, df = 1354.0"
<i>c7</i>	"Duncan test; variable C7 (##12_ddCt) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .44722, df = 1354.0"
<i>fcgr1a</i>	"Duncan test; variable FCGR1A (##12_ddCt) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .10520, df = 1354.0"
<i>hp</i>	"Duncan test; variable HP (##12_ddCt) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 1.0894, df = 1354.0"
<i>hsp1a1</i>	"Duncan test; variable HSP1A1 (##12_ddCt) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .14411, df = 1354.0"
<i>serpine1</i>	"Duncan test; variable SERPINE1 (##12_ddCt) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .12732, df = 1354.0"
<i>lyzc2</i>	"Duncan test; variable lyzc2 (##12_ddCt) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .14011, df = 1354.0"

Santiago, veinticinco de abril del dos mil veintidós

PROVEYENDO ESCRITO DE FECHA 21-04-2022 CON EL CODIGO C/2022/004878:
A LO PRINCIPAL: TENGASE PRESENTE EN LA VISTA DE LA CAUSA, AL OTROSI:
POR ACOMPAÑADOS, CON CITACION.

Rol TDPI: 1489-2021

Proveído por la presidenta del Tribunal de Propiedad Industrial Sra. Carmen Iglesias
Muñoz

NOTIFICADO POR EL ESTADO DIARIO CON ESTA FECHA

Mef

This document is digitally signed

Signer: CARMEN GABRIELA IGLESIAS
MUNOZ
Date: lun, abr 25, 2022 13:19:26 CLT
Location: PUNE

This document is digitally signed

Signer: Marta Beatriz Araya Fernandez
Date: lun, abr 25, 2022 14:18:54 CLT
Location: PUNE

Solicitud N° 674-2017 "ALIMENTO PARA PECES QUE COMPRENDE SALES DE SODIO, MAGNESIO Y CALCIO Y UN MODULADOR DEL RECEPTOR DE CATIONES POLIVALENTES (PVCR) EN LA FORMA DE TRIPTÓFANO O FENILALANINA; Y USO PARA EL TRATAMIENTO PROFILÁCTICO Y/O TERAPÉUTICO DEL SÍNDROME HEMORRÁGICO DEL SMOLT (HSS) EN SALMONIDAE"

Rol N° 1489-2021

Lugar 17

Jueves 23 de marzo del 2023

Primera sala

EN LO PRINCIPAL: SUSPENSIÓN VISTA DE LA CAUSA; **OTROSÍ:** ACOMPAÑA DOCUMENTO QUE INDICA.

H. TRIBUNAL DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

CRISTIÁN BARROS MICHELL, abogado, en representación de **EUROPHARMA AS.**, ambos ya individualizados en estos autos a UD. respetuosamente digo:

Vengo en solicitar la suspensión de la vista de la causa materia de autos, fijada en tabla para el día jueves 23 de marzo del 2023, 17° lugar, primera sala.

POR TANTO, de acuerdo al Art. 17 bis B de la Ley 19039 en relación con el artículo 165 N° 5 del Código de Procedimiento Civil,

A este Honorable Tribunal de Propiedad Industrial pedimos: Acceder a lo solicitado y decretar la suspensión de la vista de la causa.

OTROSÍ: Que en este acto, vengo en acompañar copia del comprobante de pago realizado en la Tesorería General de la República, por concepto de suspensión de la vista de la causa.

POR TANTO,

A este Honorable Tribunal de Propiedad Industrial, pedimos tener por acompañado el comprobante de pago realizado en la Tesorería General de la República por concepto de suspensión de la vista de la causa.

**Cristian
Kenneth
Barros
Michell**

Firmado
digitalmente por
Cristian Kenneth
Barros Michell
Fecha: 2023.03.21
09:19:40 -03'00'



Tesorería General
de la República

COMPROBANTE DE TRANSACCION

Rut - Rol	79713300-0
Formulario	10
Folio	5500781
Vencimiento	31-03-2023
Moneda de Pago	CLP
Total Pagado	15.620
Fecha Pago	20-03-2023 17:58:39
Institución Recaudadora	BANCO CHILE
Identificador de Transacción	45854526-40571128

No válido para pago en Instituciones Recaudadoras



03201800612023033101010514



Solicitud N° 674-2017 "ALIMENTO PARA PECES QUE COMPRENDE SALES DE SODIO, MAGNESIO Y CALCIO
Y UN MODULADOR DEL RECEPTOR DE CATIONES POLIVALENTES (PVCR) EN LA FORMA DE TRIPTÓFANO O
FENILALANINA; Y USO PARA EL TRATAMIENTO PROFILÁCTICO Y/O TERAPÉUTICO DEL SÍNDROME
HEMORRÁGICO DEL SMOLT (HSS) EN SALMONIDAE"

Rol N° 1489-2021

Lugar 17

Jueves 23 de marzo del 2023

Primera sala

DELEGA PODER

H. TRIBUNAL DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

CRISTIÁN BARROS MICHELL, abogado, en representación de **EUROPHARMA
AS.**, ambos ya individualizados en estos autos a UD. respetuosamente digo:

Que sin perjuicio de mis facultades, vengo en delegar poder a la abogada
habilitada para el ejercicio de la profesión **DANIELA PAZ GUERRERO FERRADA**, de mí
mismo domicilio, quien firma en señal de aceptación.

POR TANTO,

A UD. PIDO tenerlo presente.

**DANIELA
GUERRERO
FERRADA**
Firmado
digitalmente por
DANIELA GUERRERO
FERRADA
Fecha: 2023.03.22
15:06:15 -03'00'

**Cristian
Kenneth
Barros Michell**
Firmado
digitalmente por
Cristian Kenneth
Barros Michell
Fecha: 2023.03.22
11:19:46 -03'00'

Solicitud N° 674-2017 "ALIMENTO PARA PECES QUE COMPRENDE SALES DE SODIO, MAGNESIO Y CALCIO Y UN MODULADOR DEL RECEPTOR DE CATIONES POLIVALENTES (PVCr) EN LA FORMA DE TRIPTÓFANO O FENILALANINA; Y USO PARA EL TRATAMIENTO PROFILÁCTICO Y/O TERAPÉUTICO DEL SÍNDROME HEMORRÁGICO DEL SMOLT (HSS) EN SALMONIDAE"

Rol N° 1489-2021

Lugar 17

Jueves 23 de marzo del 2023

Primera sala

EN LO PRINCIPAL: SE ANUNCIA PARA ALEGATO; **OTROSÍ:** SOLICITUD QUE INDICA.

H. TRIBUNAL DE PROPIEDAD INDUSTRIAL.

DANIELA PAZ GUERRERO FERRADA, en representación de **EUROPHARMA AS.**, a este H. Tribunal de Propiedad Industrial respetuosamente digo:

Vengo en anunciarme para alegar por el apelado **EUROPHARMA AS.**, en esta causa que fue fijada en tabla para el día jueves 23 de marzo del 2023, primera sala, en el 17º lugar.

El alegato tendrá una duración de 10 minutos.

POR TANTO,

A ESTE H. TRIBUNAL DE PROPIEDAD INDUSTRIAL PIDO: tener por anunciado.

OTROSÍ: De conformidad con el auto acordado de este H. Tribunal de Propiedad Industrial de fecha 24 de marzo de 2020 sobre audiencias por sistema de video conferencia, vengo en hacer presente que haré uso del sistema de videoconferencia y que para estos efectos mi dirección de e-mail es dguerrero@sargent.cl y mi teléfono +56973883009.

POR TANTO,

A ESTE H. TRIBUNAL DE PROPIEDAD INDUSTRIAL PIDO: tenerlo presente y acceder a lo solicitado.

**DANIELA
GUERRERO
FERRADA**

Firmado
digitalmente por
DANIELA GUERRERO
FERRADA
Fecha: 2023.03.22
15:14:58 -03'00'

Solicitud N° 674-2017
Rol N° 1489-2021
Lugar 17
Jueves 23 de marzo del 2023
Primera sala

ACOMPAÑA PLIEGO DE REIVINDICACIONES.

H. Tribunal de Propiedad Industrial

CRISTIÁN BARROS MICHELL, abogado habilitado para el ejercicio de la profesión, cédula de identidad 13.658.156-2, domiciliado en Avenida Andrés Bello 2711, piso 19, Las Condes, Santiago, en representación de **EUROPHARMA AS** en los antecedentes sobre la solicitud de patente de invención N° 674-2017, a Ud. respetuosamente digo:

Que vengo en acompañar un nuevo pliego de reivindicaciones de la presente solicitud. Respecto de este nuevo pliego, señalamos que este consta solo de 5 reivindicaciones. A su vez, destacamos que dicho pliego constituye una limitación en el pliego de reivindicaciones y que cumple a cabalidad con el requisito de sustento.

POR TANTO,

RUEGO a este Honorable Tribunal de Propiedad Industrial tenerlo por presentado y acompañado.

**Cristian
Kenneth
Barros
Michell**

Firmado
digitalmente por
Cristian Kenneth
Barros Michell
Fecha: 2023.03.22
16:16:46 -03'00'

REIVINDICACIONES

1. Un alimento adecuado para salmonidae que comprende proteína, grasa, carbohidratos, vitaminas, minerales y agua, CARACTERIZADO porque el alimento adecuado para salmonidae además comprende de 10-100 g/kg en peso de sales de sodio (Na^+), de 0,1-100 g/kg en peso de sales de magnesio (Mg^+), y 0,1-100 g/kg en peso de sales de calcio (Ca^{2+}), donde el alimento para peces comprende de 3,934 – 39,340 g/kg en peso de Na^+ , de 2-10 g/kg en peso de un modulador del receptor de cationes polivalentes (PVCR) en la forma de triptófano, de 0,026 – 25,530 g/kg en peso de Mg^{2+} , y de 0,036 – 36,110 g/kg en peso de Ca^{2+} , de 6,202 – 199,020 g/kg en peso de Cl^- , en donde el modulador del receptor de cationes polivalentes está en la forma de aminoácidos libres.

2. El alimento para peces de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque las sales de sodio son NaCl .

3. El alimento para peces de acuerdo con la reivindicación 2, CARACTERIZADO porque las sales de magnesio son MgCl_2 .

4. El alimento para peces de acuerdo con la reivindicación 2, CARACTERIZADO porque las sales de calcio son CaCl_2 .

5. El alimento para peces de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, CARACTERIZADO porque comprende 6% en peso de NaCl , 0,75% en peso de CaCl_2 , 0,25% en peso de MgCl_2 y 0,4% en peso de L-triptófano.

Santiago, veintitrés de marzo del año dos mil veintitrés.

A la presentación de fecha 21-03-2023 Código 9992: A lo principal: Como se pide a la suspensión de la vista de la causa; al otrosí: Por acompañado comprobante de consignación.

ROL TDPI N° 1489-2021

Proveído por el Presidente de la Primera Sala del Tribunal de Propiedad Industrial Sr. Marco Arellano Quiroz.

NOTIFICADA POR EL ESTADO DIARIO CON ESTA FECHA

MTG

This document is digitally signed

Signer: MARCO ANTONIO ARELLANO
QÚIROZ
Date: jue, mar 23, 2023 07:48:11 CLT
Location: PUNE

This document is digitally signed

Signer: MARTA ARAYA FERNANDEZ
Date: jue, mar 23, 2023 08:17:19 CLT
Location: PUNE

Santiago, veintitrés de marzo del año dos mil veintitrés.

A la presentación de fecha 22-03-2023 Código 10030: Téngase presente la delegación de poder en favor de Daniela Guerrero Ferrada.

A la presentación de fecha 22-03-2023 Código 10031: A todo: Estése a lo resuelto en el código 9992 del escrito de fecha 21-03-2023.

ROL TDPI N° 1489-2021

Proveído por el Presidente de la Primera Sala del Tribunal de Propiedad Industrial Sr. Marco Arellano Quiroz.

NOTIFICADA POR EL ESTADO DIARIO CON ESTA FECHA

MTG

This document is digitally signed

Signer: MARCO ANTONIO ARELLANO
QÚIROZ
Date: jue, mar 23, 2023 07:45:21 CLT
Location: PUNE

This document is digitally signed

Signer: MARTA ARAYA FERNANDEZ
Date: jue, mar 23, 2023 08:24:57 CLT
Location: PUNE

Santiago, veintitrés de marzo del año dos mil veintitrés.

A la presentación de fecha 22-03-2023 Código 10033: Por acompañado con citación nuevo pliego de reivindicaciones.

ROL TDPI N° 1489-2021

Proveído por el Presidente de la Primera Sala del Tribunal de Propiedad Industrial Sr. Marco Arellano Quiroz.

NOTIFICADA POR EL ESTADO DIARIO CON ESTA FECHA

MTG

This document is digitally signed

Signer: MARCO ANTONIO ARELLANO
QÚIROZ
Date: jue, mar 23, 2023 08:17:51 CLT
Location: PUNE

This document is digitally signed

Signer: MARTA ARAYA FERNANDEZ
Date: jue, mar 23, 2023 08:25:37 CLT
Location: PUNE

Rol TdPI : 1489-2021
Solicitud : 201700674
Patente de Invención

EN LO PRINCIPAL: Se tenga presente; **EN EL OTROSÍ:** Acompaña documento.

H. TRIBUNAL DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

María Trinidad Rojas Wünkhaus, en representación de la oponente y apelante Biomar Chile S.A., en el expediente de la solicitud de patente de invención N° 201700674, rol N° 1489-2021, al H. Tribunal de Propiedad Industrial respetuosamente digo:

Recientemente, se nos ha hecho llegar una declaración de don Greg Deacon, quien trabajó como nutricionista en Skretting (antes llamado Moore-Clark) entre los años 1990 y 2007, y luego como nutricionista senior part-time para Skretting.

Dicha declaración complementa el contenido del documento identificado como D2 en autos, de modo que D2 divulga un alimento que comprende cada uno de los componentes del alimento descrito en la reivindicación principal de autos.

D2 menciona, en su tabla 19 un alimento que comprende sales de sodio, sales de magnesio y triptófanos libres. Si bien no menciona un contenido de calcio, sí señala que los alimentos de la tabla 19 se basan en una "dieta estándar para salmónidos de agua dulce de Moore Clark".

Don Greg Deacon, en su declaración, confirma que todos los alimentos de Moore-Clark que podrían incluirse dentro de una

“dieta estándar para salmónidos de agua dulce de Moore-Clark” de la tabla 19 de D2 comprenderían calcio en una cantidad aproximada de 2,4% (o 24 g/kg), lo cual se encuentra dentro del rango de 0,036-36,011 g/kg reivindicado en autos.

En dicha declaración se adjunta un folleto del alimento “Moore-Clark’s Select 6 + 6 Freshwater Extruded Smolt Feed”, que coincide con el alimento descrito como “dieta estándar para salmónidos de agua dulce de Moore Clark” de la tabla 19 de D2.

Por lo tanto, la presente solicitud carece de novedad y de nivel inventivo en vista de D2, complementado con la declaración de Deacon.

POR TANTO,

al H. Tribunal de Propiedad Industrial respetuosamente pido:

Se sirva tenerlo presente.

OTROSÍ: Sírvasse tener por acompañada la declaración de Deacon, de fecha 7 de diciembre de 2021.



In the matter of Appeal No. T-579/21
Opposition by Nutreco IP Assets B.V. (also Cargill and
Biomar)
Against European Patent No. 3197290 (Application No.
15766520.9) of Europharma AS

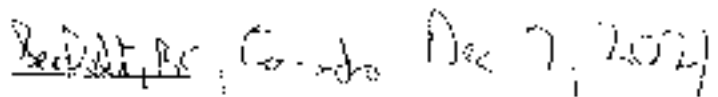
Declaration of Greg Deacon

1. I, Greg Deacon, hereby declare as follows. I refer to my CV attached hereto as Annex 1 for details of my qualifications and experience.
2. I worked as a nutritionist for Skretting (previously called Moore Clark) from 1990 until my retirement in 2007. Thereafter I was employed part time by Skretting for 13 years in a position called Senior Nutritionist.
3. Skretting North America supplies Moore Clark fish feed.
4. I have been shown document D2 filed in 2001 and asked what the calcium content would be of the "Moore Clark standard freshwater salmonid diet" referred to at Example 8.
5. Any possible Moore Clark feed intended to be referred to in Example 8 of D2 would have a calcium (Ca²⁺) content within the range of 0.036-36.011 g/kg by weight. This is a very wide range which would always be satisfied by the calcium provided by fish meal in the feed.
6. As evidence of this, attached hereto as Annex 2 is information relating to the Moore-Clark fish feed "Moore-Clark's Select 6 + 8 Freshwater Extruded Smolt Feed" from June 1992. This relates to a freshwater feed for Atlantic salmon smolts.
7. The information in Annex 2 was disclosed publicly and non-confidentially to customers around that time in the form of a brochure, and the feed was on sale. This is confirmed in both cases by the sales contact information provided on the final page.
8. The proximate analysis indicates a calcium content of 2.4 % i.e. 24 g/kg. I confirm that this value is correct. The ingredients are indicated to include fish meal (high in calcium). The calcium in the feed was derived mainly from the fishmeal in the formulation. I would have provided the proximate analysis and ingredients list.
9. I have no reason to think that the calcium content of the feed would have changed by the year 2001 but do not have further documentation to show this.
10. My understanding therefore of Example 8 of D2 is that it refers to the diet of Annex 2, or to a similar updated formulation having a similar calcium content, certainly within the range of 0.036-36.011 g/kg by weight.

And I make this declaration sincerely believing the contents thereof to be true:



Greg Deacon



Place/Date

In the matter of Appeal No. T1879/21
Opposition by Nutreco IP Assets B.V. (also Cargill and
Biomar)
Against European Patent No. 3197290 (Applicator No
15765520 9) of Europharma A.S.

ANNEX 1

Curriculum vitae

Greg Deacon

CITIZENSHIP: Canadian

EDUCATION:

1986

Bachelor of Science (Hons.), Dept. Animal Science, Faculty of Agriculture UBC,
Vancouver. Animal nutrition with specialization in fish nutrition.

WORK EXPERIENCE:

Aug. 1987 – Present

Employed by Moore-Clark first as a Sales Consultant and since 1990 as Nutritionist.
Responsible for formulations, quality standards for ingredients and feed and the
management of research and development.

Sept. 1986 – Aug. 1987

Employed by White Crest Mills as Sales Consultant and Assistant Nutritionist.
Responsible for formulations and sales on the Sunshine Coast.

1972 – 1975

Employed as fish culturist at B.C.'s first salmon farm on the Sunshine Coast.

PUBLISHED JOURNAL ARTICLES:

- Dosanji, B.S., D.A. Higgs, D.J. McKenzie, D.J. Randall, J.G. Estes, N. Rowshandel, M.
Rowshandel, and G. Deacon. 1998. Influence of dietary blends of menhaden oil and
canola oil on growth, muscle lipid composition and thyroidal status of Atlantic salmon
(*Salmo salar*) in sea water. *Fish Physiol. Biochem.* 19: 123-134.
- McKenzie, D.J., D.A. Higgs, B.S. Dosanjh, G. Deacon, and D.J. Randall. 1998. Dietary fatty
acid composition influences swimming performance in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in
seawater. *Fish Physiol. Biochem.* 19: 111-122.
- Saton, S., D.A. Higgs, B.S. Dosanjh, R.W. Hardy, J.G. Estes and G. Deacon. 1998. Effect of
extrusion processing on the nutritive value of canola meal for chinook salmon (*Oncorhynchus
tshawytscha*) in sea water. *Aquaculture Nutrition* 4: 115-122.
- Kiesling, A., B. Dosanjh, D. Higgs, G. Deacon and N. Rowshandel. 1995. Dorsal aorta
cannulation: a method to monitor changes in food levels of astaxanthin in voluntarily feeding
Atlantic salmon. *Aquaculture Nutrition* 1: 43-50.

In the matter of Appeal No. T1879/21
Opposition by Nutreco IP Assets B.V. (also Cargill and
Blomar)
Against European Patent No. 3197299 (Application No
15766520.9) of Europharma AS

March, B. E., Hagen, W.E., Deacon, G., MacMillan, C. and Welsh, M.G., 1990. Intestinal absorption of astaxanthin, plasma astaxanthin concentration, body weight and metabolic rate as determinants of flesh pigmentation in salmonid fish. *Aquaculture*, 90: 313-322

Referred Book Chapters and Conference Articles

Higgs, D.A., B.S. Dosanjh, A.F. Prendergast, R.M. Beames, R.W. Hardy, W. Riley and G. Deacon. 1995. Chapter 11. Use of rapeseed/canola protein products in finfish diets. In D. Sessa and C. Lim (Eds.) *AOCS monograph entitled "Nutrition and utilization technology in aquaculture"*, AOCS Press, Champaign, IL. p. 130-156.

Non-Refereed Contributions

Higgs, D.A., B.S. Dosanjh, G. Deacon, N. Rowsandell, and D. L. McKenzie. 1995. Use of canola oil in salmon diets. In: *Proceedings of 10th International Rapeseed Congress*, September 25-29th, Canberra, Australia.

Higgs, D.A., B.S. Dosanjh, R.M. Beames, A.F. Prendergast, S. Satoh, C. Lim, C. Kissil, S.A. Mwachireya, and G. Deacon. 1997. Use of rapeseed/canola protein products in aquatic feeds. In: *Book of Abstracts World Aquaculture '97*, February 19-23, 1997, Seattle Washington, U.S.A. p.214.

Higgs, D.A., B.S. Dosanjh, R.M. Beames, A.F. Prendergast, S.A. Mwachireya, and G. Deacon. 1996. Nutritive value of rapeseed/canola protein products for salmonids. In *Proceedings CFIA Eastern Nutrition Conference* May 15-17, 1996, Dartmouth/Halifax, p. 187-196.

Dosanjh, B., D. Higgs, G. Deacon and A. Farrell. 1996. New research may increase omega-3 in farm salmon. *Northern Aquaculture Feed Supplement* (February), p. 5-8,33.

Higgs, D.A., B.S. Dosanjh, A.F. Prendergast, R.M. Beames, R.W. Hardy, W.W. Riley, Jr. and G. Deacon. 1995. Canola protein products in aquaculture. *Bull. Aquacul. Assoc. Canada* 95-2: 25-32

Higgs, D.A., A.F. Prendergast, R.M. Beames, B.S. Dosanjh, S. Satoh, S.A. Mwachireya and G. Deacon. 1995. Potential for reducing costs of salmon production by dietary inclusion of novel rapeseed/canola protein products. *Proceedings of the 9th International GCIRC Rapeseed Congress*, Cambridge, U.K., July 4-7, 1995. p. 133-138

Higgs, D.A., A.F. Prendergast, B.S. Dosanjh, D.M. Beames, G. Deacon and R.W. Hardy. 1994. Canola protein offers hope for efficient salmon production. pp. 377-382. In: D.D. MacKinlay (Ed.), *Proceedings of an International Fish Physiology Symposium, "High Performance Fish"* held Vancouver, B.C., U.B.C., July 16-21, 1994

Higgs, D.A., A.F. Prendergast, B.S. Dosanjh, D.M. Beames, R.W. Hardy and G. Deacon. 1994. Potential for rapeseed/canola protein products to improve salmonid farming profitability. *New Developments in Seafood Science and Technology Symposium*. *Aquaculture: Development and Commercialization of Alternative Protein for Fish Feed*. May

In the matter of Appeal No. T1879/21
Opposition by Nutreco IP Assets B.V. (also Cargill and
Biomar)
Against European Patent No. 3197290 (Application No
15796520-9) of Europharma AS

13-14, 1994. Sponsored by Page Technologies Inc. and B.C. Food Technologists, p. 15-16.
Abstract.

Prendergast, A.F., D.A. Higgs, D.M. Bearnas, E.S. Dissanjhi and G. Deacon. 1984. Searching
for substitutes - canola. Northern Aquaculture 16(3): 15-20.

In the matter of Appeal No. T1879/21
Opposition by Nutreco IP Assets B.V. (also Cargill and
Biomar)
Against European Patent No. 3197280 (Application No
15766520.9) of Europharma AS

ANNEX 2

In the matter of Appeal No. T1879/21
Opposition by Nulrecht IP Assets BV (also Cargill and
Biomar)
Against European Patent No. 3197290 (Application No
15736520.9) of Europharma AS



SELECT 6+6

Smoltification Diets

Your smolts are your future

Smoltification is a critical period in the life cycle of salmon, where the fish transition from freshwater to seawater. This process is highly sensitive to environmental conditions and nutrition. Select 6+6 Smoltification Diets are specifically formulated to support optimal smoltification, ensuring your fish are healthy and ready for the next stage of their life.

6+6 FEEDING PROGRAM

CR-5206 V. 01/21

- Optimal growth and survival during smoltification
- Improved feed conversion ratio (FCR)
- Enhanced resistance to diseases and stress
- Reduced mortality and losses

SAVING FISH

- Reduces the risk of disease and stress
- Improves the overall health and vitality of your fish
- Supports a strong immune system
- Ensures your fish are ready for the challenges of seawater

Investing in Select 6+6 Smoltification Diets is an investment in the future of your salmon farming operation. It ensures that your smolts are healthy, strong, and ready to thrive in seawater, maximizing your yield and profitability.

In the matter of Appeal No. T18/9321
 Opposition by Nutreco IP Assets B.V. (also Cargill and
 Bionor)
 Against European Patent No. 3197250 (Application No
 15766520.9) of Europharma AS

SELECT 6+6 Smoltification Diets

FRESHWATER 6



6 WEEKS PRE-TRANSFERR

- ▶ 100% complete diet
- ▶ 100% digestible
- ▶ 100% soluble

FEATURES

- ▶ High protein content
- ▶ High energy density
- ▶ High digestibility
- ▶ High solubility
- ▶ High palatability
- ▶ High stability

SELECT FRESHWATER 6 is a complete, highly digestible and soluble diet for salmonids during the pre-transfer period. It is formulated to provide the highest energy density and protein content, ensuring optimal growth and health of the fish.

SALTWATER 6



6 WEEKS POST-TRANSFERR

- ▶ 100% complete diet
- ▶ 100% digestible
- ▶ 100% soluble

BENEFITS

- ▶ High protein content
- ▶ High energy density
- ▶ High digestibility
- ▶ High solubility
- ▶ High palatability
- ▶ High stability

SELECT SALTWATER 6 is a complete, highly digestible and soluble diet for salmonids during the post-transfer period. It is formulated to provide the highest energy density and protein content, ensuring optimal growth and health of the fish.

In the matter of Appeal No. T 1879/21
Opposition by Nutreco IP Assets B.V. (as ex Dargi and
Biomar)
Against European Patent No. 3197290 (Application No.
15765520.9) of Europharma AS

The road to success is now a highway.

For salmon farmers,
transferring smolts to salinized water
delays over the roughest stretch of
the road to success. So Merck-Clark
has developed a program that will
put you on the fast track to
a profitable harvest.



Smoltification Diets

In the matter of Appeal No. 71879/21
Opposition by Nutreco IP Assets B.V. (also Cargill and
Biomar)
Against European Patent No. 2197290 (Application No.
15766520 9) of Europharma AS

**How do you increase your
profits?**

**Talk with a Moore-Clark
sales consultant.**

**Call toll-free:
1-800-561-9273**

**Or fax your order today:
(506)-529-4383**

Moore-Clark's commitment to our clients is evident in our Flex Plus service program, which includes:

- ▶ Personalized attention from a sales consultant
- ▶ Personalized attention from a technical consultant
- ▶ Personalized attention from a nutritionist
- ▶ Personalized attention from a nutritionist



Moore-Clark

MOORE-CLARK COMPANY

1000 WEST 10TH AVENUE



NAME _____

ADDRESS _____

CITY _____

Santiago, treinta y uno de marzo del año dos mil veintitrés.

A la presentación de fecha 29-03-2023 Código 1073: A lo principal: Téngase presente; al otrosí: Por acompañado con citación.

ROL TDPI N° 1489-2021

Proveído por el Presidente del Tribunal de Propiedad Industrial Sr. Marco Arellano Quiroz.

NOTIFICADA POR EL ESTADO DIARIO CON ESTA FECHA

MTG

This document is digitally signed

Signer: MARCO ANTONIO ARELLANO
QÚIROZ
Date: vie, mar 31, 2023 08:28:48 CLT
Location: PUNE

This document is digitally signed

Signer: Marta Beatriz Araya Fernandez
Date: lun, abr 3, 2023 11:05:16 CLT
Location: PUNE

Solicitud N°: **674-2017**

Titular: **EUROPHARMA AS**

RoI TPI N°: **1489-2021**

1 Sala, 2ndo Lugar

Jueves 6 de abril 2023

EN LO PRINCIPAL: TENGASE PRESENTE

OTROSÍ: ACOMPAÑA DOCUMENTOS CON CITACION.

H. Tribunal de Propiedad Industrial

Cristián BARROS MICHELL, abogado habilitado para el ejercicio de la profesión, domiciliado en Avenida Andrés Bello 2711, piso 19, Las Condes, Santiago, en representación de **EUROPHARMA AS**, ya individualizado en los autos relativos a la solicitud de patente de invención N° **674-2017**, a UD. respetuosamente digo:

Con fecha 29 de octubre de 2021, el oponente **BIOMAR CHILE S.A.** presentó un recurso de apelación en contra de la sentencia de **INAPI** del 7 de octubre de 2021 aceptando a registro la solicitud de patente de invención N° **674-2017**.

Mediante el presente escrito de Téngase Presente, solicitamos que se confirme la sentencia de **INAPI** aceptando la solicitud de autos y se rechace la oposición, sobre la base de los argumentos de hecho y de derecho que a continuación paso a exponer:

En primer lugar, vengo en hacer presente que con fecha 22 de marzo de 2023 se presentó un nuevo pliego de reivindicaciones, que consta de 5 reivindicaciones. En el otrosí de este escrito, se vuelve a presentar el mismo pliego de reivindicaciones con la finalidad de hacer más fácil la comprensión de este escrito de Téngase Presente.

La reivindicación 1 del pliego recién mencionado ha sido restringido en comparación al pliego que fue analizado por INAPI. En este sentido, en dicha reivindicación se incorporó que el alimento reivindicado es adecuado para salmonidae. Además, se ha incorporado la materia de la reivindicación 2 en la reivindicación 1, eliminado de la reivindicación 1 la opción de fenilalanina para el modulador del receptor de cationes polivalentes (PVCR). Dichas modificaciones poseen sustento a través de toda la memoria descriptiva, por ejemplo, en la página 1 y en los ejemplos de aplicación. Además, se han eliminado las reivindicaciones 2, 7 y 8 del pliego de reivindicaciones.

Por lo tanto, la nueva reivindicación 1, ha quedado redactada de la siguiente manera:

“Un alimento adecuado para salmonidae que comprende proteína, grasa, carbohidratos, vitaminas, minerales y agua, CARACTERIZADO porque el alimento adecuado para salmonidae además comprende de 10-100 g/kg en peso de sales de sodio (Na^+), de 0,1-100 g/kg en peso de sales de magnesio (Mg^+), y 0,1-100 g/kg en peso de sales de calcio (Ca^{2+}), donde el alimento para peces comprende de 3,934 – 39,340 g/kg en peso de Na^+ , de 2-10 g/kg en peso de un modulador del receptor de cationes polivalentes (PVCR) en la forma de triptófano, de 0,026 – 25,530 g/kg en peso de Mg^{2+} , y de 0,036 – 36,110 g/kg en peso de Ca^{2+} , de 6,202 – 199,020 g/kg en peso de Cl^- , en donde el modulador del receptor de cationes polivalentes está en la forma de aminoácidos libres”.

En cuanto a los argumentos esgrimidos por la contraparte en su escrito de apelación, estimamos pertinente realizar las siguientes observaciones que demuestran que la solicitud de autos cumple con todos los requisitos de patentabilidad.

A.- Comentarios en relación al documento D12 (Hoseini) en combinación con el documento D13 (Sauvant):

En cuanto al documento D12 y que supuestamente afectaría la novedad del invento de la solicitud de autos, es necesario señalar que dicho documento del arte previo se refiere a un ensayo en el que se estudia el efecto de la alimentación con L-triptófano sobre la tolerancia al estrés en una especie de pez no anádromos (carpa común). **Es decir, D12 se refiere a peces distintos a salmones que son peces anádromos**, los peces anádromos se caracterizan por vivir la mayor parte de su vida en el mar, y migran al agua dulce (ríos) para reproducirse.

Por lo tanto, es evidente que el alimento divulgado por D12 no es adecuado para los salmónidos, ni para la esmoltificación de las crías de salmónidos.

Al respecto se hace referencia al documento D17 (Nutrient Requirements off Fish and Shrimp; The National Academies Press), específicamente a la Tabla 18-1 páginas 326 y las páginas 106-107, que se acompañan con citación en el otrosí de este escrito.

Como se puede apreciar, en la página 106 de D17, se afirma que el nivel óptimo de lípidos en la dieta del salmón es del 35%, mientras que los peces de agua dulce cultivados, como la carpa, simplemente no toleran niveles elevados de lípidos en la dieta. Además, los alimentos adecuados para las carpas suelen incluir un nivel de carbohidratos que no es adecuado para los salmónidos. Por lo tanto, una persona normalmente versada en la materia reconocería que el alimento divulgado en la tabla 1 de D12 (Hoseini), que comprende un 7,4% de lípidos y un 21,1% de carbohidratos, no sería adecuado en un alimento para salmónidos y para la

esmultificación de salmónidos. Esto último también lo confirma el Dr. Harris en la página 2, sección 2 de su segunda declaración (E7) Segunda Declaration of Dr. William Harris, que se acompaña con citación en un otrosi de este escrito. En vista de lo anterior, se puede afirmar que D12 no divulga todas las características de la reivindicación 1.

En cuanto a la afirmación del oponente de autos en su recurso de apelación que el documento D12 afectaría la novedad del invento de autos, es importante señalar que en su demanda de oposición el oponente no fundo ni esgrimió siquiera que la solicitud de autos supuestamente carecería de novedad. Por lo tanto, todo argumento respecto de dicha supuesta falta de novedad es extemporánea.

Por todas las razones señaladas en los párrafos anteriores, es que podemos afirmar que la reivindicación 1 modificada es novedosa respecto a D12.

A su vez, y por las razones que señalaremos a continuación, el documento D12 tampoco afecta el nivel inventivo de la solicitud de autos.

En este sentido, es necesario destacar que el propósito del documento del arte previo D12 es completamente diferente al de la presente invención. Dicho documento se relaciona con la tolerancia al estrés osmótico en carpas, el cual corresponde a un pez estenoalino. Como bien sabe una persona normalmente versada en el estado de la técnica, el pez estenoalino, a diferencia de los peces anádromos, no puede tolerar una amplia fluctuación en la salinidad del agua, y son peces de agua dulce, no sufriendo la transformación fisiológica de la esmultificación como ocurre con los salmones que son peces anádromos. La persona normalmente versada en el estado de la técnica será muy consciente del hecho de que la carpa *Cyprinus carpio* no es un pez salmónido, y por esa razón no estaría interesada en leer este documento para la solución del problema técnico abordado por la solicitud de autos. Por lo que se puede afirmar que D12

resuelve un problema técnico diferente al de la solicitud de autos. Al respecto es necesario señalar que existe bastante jurisprudencia de las distintas autoridades que resuelven que si un documento resuelve un problema técnico diferente que aquel resuelto por la solicitud correspondiente, dicho documento no interfiere con la solicitud. A modo de ejemplo, podemos señalar la sentencia de este Honorable Tribunal de Propiedad Industrial Rol TPI 1794-2019 emitido el 28 de julio de 2021, fallo N° 10.664 emitido el 10 de junio de 2021 respecto de la solicitud 3161-2014 por INAPI y sentencia Rol TPI 1538-2020 respecto de la solicitud 387-2018 emitido por este mismo Tribunal el 23 de agosto de 2022.

En cualquier caso, no se puede considerar que D12 represente estado de la técnica cercano, ya que para reunir dicha condición debería revelar información concebida para el mismo fin o con el mismo objetivo que la invención reivindicada.

En este sentido, es necesario señalar que la presente invención se refiere a un alimento para peces adecuado para peces salmónidos. La persona normalmente versada en el estado de la técnica reconocerá que los peces salmónidos son anádromos, es decir, pertenecen al grupo de peces que nacen en agua dulce y que migran y pasan la mayor parte de su vida en agua salada antes de volver a agua dulce para desovar. La persona normalmente versada en el estado de la técnica sabrá que la esmoltificación consiste en una serie de cambios de desarrollo independientes y coordinados en la bioquímica, fisiología, morfología y comportamiento de los peces salmónidos juveniles. Por lo tanto, es un proceso complejo al que no se someten los peces que viven en agua dulce o salada durante toda su vida.

Por lo tanto, la persona normalmente versada en el estado de la técnica, con miras a un alimento que pueda utilizarse para inducir la esmoltificación en Salmonidae, no examinaría un documento relativo a la osmorregulación en la carpa.

Es más, para que un documento del estado de la técnica se anticipe a la reivindicación 1, debe divulgar directamente y sin ambigüedades el alimento para Salmonidae según la reivindicación 1. Este simplemente no es el caso del documento del arte previo en comento. Por el contrario, D12 no revela el nivel de sales de calcio, magnesio, sodio, cloruro, ni el nivel de iones de calcio, iones de sodio, iones de magnesio o iones de cloruro. Además, el nivel de dichas sales e iones no puede deducirse a partir de la información proporcionada del alimento para peces divulgado en D12.

Al respecto, se hace referencia a la tabla 1, página 106 de D12, que muestra que no se proporciona información sobre el tipo de harina de pescado utilizada en la preparación del alimento de prueba utilizado en el experimento divulgado en D12. La tabla 1 muestra que el alimento de prueba comprende un 50% de harina de pescado, además de harina de soja, harina de trigo, harina de maíz, gluten de trigo, apenas harina de carne. No se proporciona información sobre el origen de la harina de pescado. Una persona normalmente versada en el estado de la técnica no sabría el contenido de las sales e iones mencionados basándose en la información proporcionada en D12 al no saber qué tipo de harina de pescado se utiliza para preparar el alimento para peces.

Por el contrario, la persona normalmente versada en la materia sabría que hay bastante diferencia entre los distintos tipos de harina de pescado en cuanto al contenido de calcio, sodio, magnesio y cloruro.

Además, una persona normalmente versada en la materia no habría estado motivado a calcular las cantidades de sales divulgadas en D12 para preparar un alimento para salmónidos como aquí se reivindica.

A este respecto, se hace referencia al extracto del libro de texto de Sauvant et al. (2004) (D13), en las Tablas de composición y valor nutricional de las materias primas para piensos. En la página 272, se proporciona la composición de un producto de harina de pescado (Fish meal 62%) con un contenido de calcio (g/kg) de 55,4 con una desviación estándar (SD) de 11,9. En la página 274, se proporciona el contenido de otra harina de pescado (harina de pescado 65%) que comprende 38,5 g/kg de calcio, sin embargo con una desviación estándar de 8,2. Además, en la página 276 se presenta otra harina de pescado (harina de pescado, 70%) que contiene aún menos calcio, es decir, sólo 24,1 g/kg de calcio, con una desviación estándar de 7,9. Por lo tanto, la harina de pescado 70% comprende significativamente menos calcio en comparación con la harina de pescado 62%.

Sin información sobre el tipo de harina de pescado que se menciona en la tabla 1 de D12, la persona normalmente versada en el estado de la técnica no puede saber el contenido real de magnesio, calcio, sodio y cloruro en el alimento para peces descrito en D12. Además, se observa que no hay información en D12 con respecto a la composición de la mezcla de minerales, las sales y la mezcla de vitaminas que aparentemente se añaden en el alimento (véase la tabla 1, página 1062).

Además, en D12 no se indica qué tipo de harina de pescado se utiliza. Por lo tanto, la selección de la harina de pescado 70% parece ser el resultado de especulaciones solamente fundadas en la necesidad de buscar algún argumento para intentar sustentar la oposición de autos. Una persona normalmente versada en el estado de la técnica podría suponer con la misma facilidad que el alimento para peces divulgado en D12 comprendiera, por ejemplo, harina de pescado al 62%, lo que daría lugar a un alimento con un contenido de iones de calcio superior a 36,110 Ca²⁺.

Como hemos recalcado en varias ocasiones en este escrito, el documento del arte previo D12 se refiere a experimentos realizados en una especie diferente, es decir, un pez carpa (*Cyprinus carpio*). *Cyprinus carpio* no es como los peces salmónidos anádromos que viven primero como parr juvenil en agua dulce y luego se transforman en un smolt tolerante al agua salada que se mitiga al agua de mar. Por el contrario, el *Cyprinus carpio* permanece en agua dulce durante todo su ciclo vital. Aunque la *Cyprinus carpio* puede estar expuesta al aumento de la salinidad del agua, por ejemplo, en la desembocadura de un río, la persona normalmente versada en la materia no consideraría un estudio de los efectos en una especie no anádroma y su capacidad para adaptarse a un aumento ocasional del agua salada, cuando se trata de un pienso aplicable para la esmoltificación del salmón. Por lo tanto, D12 se considera no relacionado y muy alejado de la invención reivindicada y nunca se considerará relevante con respecto a la actividad inventiva.

El oponente también sostiene que D12 enseña que un alimento que cae dentro del ámbito de protección de la reivindicación 1 induce la tolerancia al agua salada en peces carpa, y en particular, que la suplementación con triptófano induce un aumento del cortisol basal. Como se ha comentado anteriormente, el alimento divulgado en D12 NO esté dentro del ámbito de la reivindicación 1 modificada.

Al respecto, es necesario señalar que el documento Basic 2013 (Aquaculture 388-391: páginas 8-13), en la página 9, segundo párrafo, que se acompaña en el otrosí de este escrito, indica:

“La transformación parr-smolt (o esmoltificación), que permite a los peces juveniles hacer frente a los desafíos osmóticos del agua de mar, se ve afectada por la respuesta neuroendocrina al estrés y viceversa (Barton et al., 1985). La esmoltificación coincide con

aumentos transitorios de cortisol que también pueden afectar al bienestar de los peces, ya que el cortisol suprime la inmunocompetencia, lo que los hace potencialmente más susceptibles a las infecciones u otros factores de estrés externos (Maule et al., 1987).”

Por lo tanto, aunque se produce un aumento transitorio del cortisol durante la esmoltificación, no se sabe si este aumento transitorio del cortisol es un requisito previo para la esmoltificación o una consecuencia de la transformación parr. Si el aumento transitorio del cortisol es un prerequisite para la esmoltificación, seguramente no sería una buena idea alimentar a los peces con una dieta que proporcione un aumento de los niveles de cortisol. Además, también se sabe que el cortisol suprime la inmunocompetencia, lo que hace que los peces sean potencialmente más susceptibles a las infecciones u otros factores de estrés externos, lo que apunta en la dirección de no añadir nada a la alimentación que pueda aumentar los niveles de cortisol.

Además, como se muestra en la figura 1 página 267 de **Lepage, 2005**, (*“Tryptophan affects both gastrointestinal melatonin production and interrenal activity in stressed and nonstressed rainbow trout”*; *J. Pineal Res. 2005; 38: 264-271*), parece que el Triptófano induce un aumento del cortisol en los peces no estresados y produce una disminución del cortisol en los peces estresados. Por lo tanto, el Triptófano parece tener efectos diferentes en los peces no estresados y en los estresados. Se acompaña copia de Lepage, 2005, en el otrosí de este escrito.

A la vista de lo anterior, una persona normalmente versada en el estado de la técnica no sabría si un mayor nivel de Triptófano en la dieta tendría un efecto sobre la esmoltificación y, en particular, no sabría si un mayor nivel de Triptófano en la dieta tendría un efecto positivo sobre la esmoltificación o si sería beneficioso para los peces.

B.- Comentarios en relación al documento D5 (Basulto)

El documento del arte previo D5 (Basulto) es un documento que se publicó hace más de 30 años antes de la fecha de prioridad de la presente solicitud. Se puede argumentar que esto por sí mismo no descalifica el documento como estado de la técnica relevante, sin embargo, es importante tener en cuenta que el modelo que estaban estudiando en ese momento es completamente diferente de los peces utilizados por la industria hoy en día, lo que cuestiona la relevancia de los datos en D5 para la industria de la acuicultura actual.

También hay que mencionar que D5 estaba estudiando peces salvajes (D5, página 46, sección "peces") que son significativamente más propensos al estrés que los peces que utilizan en la industria acuícola actual. En este sentido, dichos peces tienen una genética totalmente diferente. Este hecho es una clara indicación de que D5 no puede constituir el estado de la técnica más cercano. Además, D5 no enseña que los peces puedan ser esmoltificados mediante la alimentación con sal.

En el mejor de los casos, D5 enseña una tendencia de aumento de la supervivencia con el aumento de la cantidad de sal inorgánica en la dieta, pero el autor admite los siguientes problemas en el estudio realizado:

- que el alcance estadístico de los experimentos no es suficiente para confirmar que la alimentación con sal podría facilitar la transición del agua dulce al agua de mar;
- que la alimentación con sal tiene el costo de una disminución significativa del aumento de peso; y
- el autor sugiere, por tanto, acortar el periodo de tratamiento.

Sin embargo, si el periodo de tratamiento se reduce a un mes, los datos de la tabla 6 muestran que la mejor supervivencia se obtiene no añadiendo ninguna sal a la dieta. Con lo cual se desincentivaría la adición de sal a la dieta de los peces.

En la sección de materiales y métodos (página 46 de D5) queda claro que se realizaron dos estudios, uno en 1974 y el otro en 1975. A su vez, en la sección "Prueba de tolerancia al agua salada" de la página 48 del mismo documento se describe que el estudio de 1975 incluye dos series de experimentos, cuyos resultados se presentan en la tabla 5 y 6, respectivamente, en la página 52 de D5.

Los datos presentados en la tabla 6 son de especial interés a este respecto. A continuación, explicaremos cómo se realizó este estudio experimental.

En este experimento de 1975 se utilizaron crías de salmón nacidas en 1973, lo que significa que los peces tenían 2 años. Se sacaron 25 peces del cubo en marzo y se les alimento con diferentes dietas durante 31 días. Estos peces se transfirieron al agua de mar en abril. Luego, se sacan otros 34 peces del cubo en abril y se les alimenta con diferentes dietas durante 36 días. Estos peces se transfirieron al agua de mar en mayo. A continuación, se sacaron 38 peces del cubo en mayo y se les alimento con diferentes dietas durante 40 días. Estos peces se transfirieron al agua de mar en junio.

En total, los tres grupos diferentes fueron alimentados con dietas de prueba durante un período de tiempo similar, pero fueron expuestos al agua de mar en diferentes momentos. Basándose en estos datos, es evidente que los peces no se esmoltificaron en abril, sino que en mayo considerando que todos los grupos de prueba experimentaron un enorme aumento de la supervivencia, independientemente del alimento de prueba administrado. **Por tanto, parece claro que los peces recibieron una señal de esmoltificación que no procedía del alimento.**

Esto también lo confirma el autor en la página 53, líneas 4-6, cuando dice lo siguiente "*En ambas series de experimentos se pudo comprobar claramente para todos los grupos el aumento natural con el tiempo de la tolerancia al agua de mar. La tasa media de supervivencia pasó del*

0% en marzo al 82-82,9% en junio". Así pues, los peces recibieron una señal de esmoltificación diferente a la del alimento.

Si se observa la alimentación con sal durante un mes, sólo los peces no- esmoltificados que fueron expuestos al agua de mar en abril mostraron una mejor supervivencia al utilizar mayores cantidades de sales. Sin embargo, la supervivencia fue sólo del 40%, lo que está lejos de ser aceptable.

Al respecto es importante recordar que el objetivo de la presente invención es la esmoltificación de los peces utilizando el alimento reivindicado, para el tratamiento o la prevención del síndrome hemorrágico del smolt. En cambio, el objetivo de D5 es lograr una transición más fácil del agua dulce al agua de mar para los peces que están expuestos a una señal natural de esmoltificación. Por lo tanto, el objetivo de D5 y de la invención reivindicada es completamente diferente. Por el contrario, la presente invención tiene como objetivo la esmoltificación de los peces basada en el alimento y sin ninguna otra señal de esmoltificación. En el apartado anterior de este escrito hemos individualizado distintas sentencias de las autoridades que señalan que para que los documentos del arte previo sean capaces de interferir respecto de una solicitud estos tienen que versar respecto del mismo problema de la técnica que la solicitud correspondiente.

De esta forma, se puede indicar que fue una señal natural de esmolt, denominada por Basulto "*el aumento natural con el tiempo de la tolerancia al agua de mar*", la que indujo la metamorfosis de parr a smolt, y no el alimento. Así pues, el objetivo de D5 era investigar si la alimentación con sal podía facilitar la transición del agua dulce al agua de mar para los peces expuestos a una señal natural de smolt.

Además, hay grandes variaciones en los resultados presentados por Basulto (por ejemplo, las tablas 5 y 6) y las tasas de mortalidad están muy lejos de lo que es aceptable en la industria acuícola actual. En este sentido, la tendencia al aumento de la supervivencia con el aumento del contenido de sal que señala el autor va seguida también de una reducción significativa del crecimiento y de un pobre índice de conversión alimenticia. El propio autor concluye que se necesita más investigación para comprender mejor los efectos de la alimentación con sal.

Por el contrario, los resultados de las pruebas de campo 4 y 6 de la presente patente muestran que los peces son esmoltificados por el alimento adecuado para salmonidae reivindicado. De esta forma, el problema técnico objetivo es mejorar la esmoltificación en comparación con lo que se consigue en Basulto. Está claro que los peces en Basulto esmoltifican, **pero esta esmoltificación no se debe al alimento.**

La tendencia al aumento de la supervivencia con el incremento del contenido de sal señalada por Basulto va seguida también de una reducción significativa del crecimiento y de un pobre índice de conversión alimenticia. La única sugerencia de Basulto para resolver el problema de la reducción del crecimiento es reducir el período de tratamiento. Sin embargo, Basulto también muestra que la reducción del período de tratamiento disminuye la supervivencia y que a un mes de tratamiento no hay, de hecho, ningún efecto de la sal.

En resumen: la persona normalmente versada en el estado de la técnica que comience con el alimento divulgado en D5 no tendría ninguna expectativa razonable de éxito, por lo que dicho documento no afecta el nivel inventivo de la solicitud de autos.

C.- Comentarios respecto del documento Espe et al., 1994

Espe 1994 se refiere a un estudio que investiga hasta qué punto las mezclas de aminoácidos libres podrían sustituir a las fuentes de proteínas intactas para la síntesis de proteínas musculares en el salmón del Atlántico.

La reivindicación 1 de las reivindicaciones concedidas señala que el alimento para salmones comprende 2-10 g/kg en peso de un modulador del receptor de cationes polivalentes (PVCR) en la forma de triptófano, el que está en la forma de aminoácidos libres. Como el alimento divulgado en Espe 1994 comprende 1,74 g/kg de triptófano, la reivindicación 1 no está anticipada por Espe 1994. Además, Espe 1994 no está relacionado con la esmoltificación de salmónidos y, por lo tanto, no es relevante con respecto a la actividad inventiva.

Por otra parte, se ha demostrado en la solicitud el efecto ventajoso de triptófano, tal como fue testado en los ejemplos de la solicitud que indican un efecto significativo de la dieta con L-TRP sobre los cambios en la actividad de la ATPasa $\text{Na}^+ \text{K}^+$ de las branquias.

D.- RESPECTO DEL MÉTODO PROBLEMA-SOLUCIÓN (MPS)

El estado de la técnica más cercano es aquel que tiene el mayor número de características y efectos técnicos comunes con la invención reivindicada, que constituye el punto de partida más prometedor para un desarrollo que conduzca a la invención. Al seleccionar el estado de la técnica más cercano, la primera consideración es que debe estar dirigido a un mismo objetivo o un efecto similar al de la invención o, al menos, pertenecer al mismo campo técnico o a uno estrechamente relacionado con la invención reivindicada. Los documentos que no poseen la misma finalidad no pueden, por la misma razón, representar el trampolín más prometedor y ser el estado de la técnica más cercano.

El oponente indica que no sólo D5, D7 y D11, sino también D12 y Espe-1994 pueden representar el estado de la técnica más cercano. Mi mandante discrepa respetuosamente a este respecto.

En primer lugar, se observa que D5 es una publicación bastante antigua, y la persona normalmente versada en el estado de la técnica reconocería que la publicación de los años setenta tiene menos relevancia cuando se consideran los alimentos para salmonidae para proporcionar smolt listos para el agua salada en la fecha de prioridad. D5 se publicó en un momento en que la persona normalmente versada en el estado de la técnica tenía bastante falta de conocimiento del proceso de esmoltificación, Además, dicha persona reconocería que el pez utilizado en los ensayos que figuran en D5 es un pez silvestre, y que los peces silvestres serían más propensos a sufrir estrés en comparación con los peces de cultivo que se han criado y cultivado durante decenios, como ocurre con los experimentos realizados más cerca de la fecha de prioridad. El hecho que en D5 se realizaran sus experimentos con peces silvestres también podría explicar las altas tasas de mortalidad y aumentaría el escepticismo acerca de los resultados notificados en D5.

Hay también otra razón por la cual la persona normalmente versada en el estado de la técnica pondría poco énfasis en los experimentos notificados en D5. En efecto, dicha persona reconocería que los resultados de la adición de sales al agua reportados en D5 son contradictorios.

Al respecto, es necesario señalar que en la tabla VI se presenta la misma tendencia que en la tabla V. También se puede observar un aumento de la supervivencia en mayo, y aquí el grupo que no ha recibido el alimento de prueba con sal muestra una mejor supervivencia que el grupo al que se le administró un alimento con un 8% de sal. El grupo que recibió el alimento

con un 12% de sal muestra resultados similares al grupo de control con respecto a la supervivencia, pero no con respecto al crecimiento y la eficiencia alimentaria. En junio, se observa una nueva mejora con respecto a la supervivencia, sin embargo, el grupo de peces al que se le administró el alimento de control tiene un mejor rendimiento que el de los peces con alimento con sal añadida. El grupo de control también muestra un mejor crecimiento y eficiencia de la alimentación.

Así pues, sobre la base de lo que antecede, se afirma que D5 no puede representar el trampolín más prometedor para una persona normalmente versada en la materia para proporcionar el alimento reivindicado.

A su vez, el documento D7 es una copia de una hoja de datos de productos del productor de alimentos para peces Skretting que presenta tres alimentos para peces. La única información proporcionada en esta hoja de datos es que Skretting ha probado un alimento con sal añadida, y muestra una tasa de mortalidad reducida. No se proporciona más información, por ejemplo, sobre el tipo y la cantidad de sales, la alteración del ensayo, los análisis realizados, etc. Con las claras indicaciones en otras referencias con respecto a la falta de pruebas de adición de sal en informes anteriores y las claras indicaciones sobre la necesidad de señales de invierno y verano si se añade sal al alimento, es difícil ver cómo D7 podría representar el estado de la técnica más cercano. No hay nada en la hoja de datos de Skretting (D7) que guíe a la persona normalmente versada en la materia hacia el alimento reivindicado con una expectativa razonable de éxito.

A su vez, y tal como explicamos en detalle en la sección A.- de este escrito, D12 se refiere a experimentos realizados en una especie diferente, es decir, un pez carpa, por lo que dicho documento está dirigido a un propósito distinto al de la invención. Por lo tanto, considerar

dicho documento en el análisis de nivel inventivo de la solicitud de autos simplemente no tiene sustento.

Luego, el documento Espe 1994 se refiere a un estudio que investiga hasta qué punto las mezclas de aminoácidos libres pueden sustituir a las fuentes de proteínas intactas para la síntesis de proteínas musculares en el salmón del Atlántico. Por lo tanto, Espe-1994 se dirige a una finalidad y un efecto totalmente diferentes al de la invención reivindicada y, por lo tanto, no puede considerarse que constituya el estado de la técnica más cercano.

Si el alimento para peces reivindicado se considera un mero alimento alternativo para salmónidos parr, entonces es una pregunta válida preguntarse si una persona normalmente versada en el estado de la técnica habría tenido algún incentivo para añadir Triptófano libre al alimento.

El mercado de los alimentos para peces es muy sensible a los costos, y las proteínas en general (Espe 1994, lo menciona en primera frase de la introducción) y en particular los aminoácidos libres se consideran ingredientes costosos. Por lo tanto, la persona normalmente versada en el estado de la técnica no habría tenido ningún incentivo para añadir Triptófano libre a menos que la inclusión de dicho ingrediente en el alimento tuviera una ventaja significativa. Desde un punto de vista nutricional, Biomar puede argumentar que Triptófano puede proporcionarse en forma polimerizada, pero los aminoácidos libres son más costosos, y no hay ninguna razón para añadir Triptófano en forma libre; ya que sólo proporcionará mayores costos. Una persona normalmente versada en el estado de la técnica bien sabe esto.

Además, queremos hacer notar que en el documento, **Lepage-2002 et al** (*“Elevated dietary intake of L-tryptophan counteracts the stress-induced elevation of plasma cortisol in*

rainbow trout (Oncorhynchus mykiss”; *The Journal of Experimental Biology*, 205, 3679-3687 (2002)) que se acompaña en el otrosí de este escrito, enseña que la adición de L- Triptófano en la dieta de la trucha arco iris aumenta los niveles basales de cortisol de los peces no estresados (ver página 3682, figura 2). Este hallazgo también ha sido confirmado en **Lepage-2005 (E9)**, (“*Tryptophan affects both gastrointestinal melatonin production and interrenal activity in stressed and nonstressed rainbow trout*”; *J. Pineal Res.* 2005; 38: 264-271) (ver página 267, figura 1a). Por lo que el triptófano podría tener un efecto en los niveles de cortisol, por lo que no habría ningún incentivo de agregar triptófano a la dieta de los peces.

Además, como se discute en **Basic-2013** “*Short- and long-term effects of dietary L-tryptophan supplementation on the neuroendocrine stress response in seawater-reared Atlantic salmon (Salmon salar)*”; *Aquaculture* 388-391. 8-13 (ver página 9, columna de la izquierda, segundo párrafo, líneas 9-12), se sabe que el cortisol suprime la inmunocompetencia haciendo que los peces sean potencialmente más susceptibles a las infecciones. Por lo tanto, la persona normalmente versada en el estado de la técnica no sabría si el efecto positivo en algunos peces sobre la respuesta al estrés en la trucha arco iris sería contrarrestado por el potencial efecto negativo relacionado con las infecciones en los salmones. De cualquier forma, no habría ningún incentivo para agregar Triptófano libre al alimento de salmonidae.

Finalmente, respecto al **Estudio NOFIMA-2021** podemos señalar que éste se discutió a fondo durante los procedimientos ante los tribunales en Noruega y también se ha presentado como prueba en el caso europeo correspondiente que está pendiente ante las salas de apelación.

Durante el procedimiento ante los tribunales en Noruega, tanto Jesse Trushenski como Richard Torrisen testificaron y ambos proporcionaron sus comentarios con respecto al diseño del estudio y los resultados presentados en el **Estudio NOFIMA-2021**.

Se adjunta en el otrosí de este escrito una Declaración de **Jesse Trushenski** (E2) incluyendo sus comentarios (página 10 a 12 del informe) con respecto al diseño del estudio y los resultados presentados en **Estudio NOFIMA-2021**.

Como verán, hay muchos problemas con el diseño experimental presentado en **Estudio NOFIMA-2021**, y el hallazgo más importante es que los peces inscritos en el estudio fueron esmoltificados al inicio del ensayo. Dado que los peces fueron esmoltificados antes de que se les alimentara con las diferentes dietas de prueba, simplemente no es posible concluir sobre el efecto de las dietas en la esmoltificación.

De hecho, el párrafo final de la sección 4 de la Declaración de **Jesse Trushenski** señala: *“En resumen, el experimento Nofima 2021 queda invalidado por los errores en la formulación del alimento y el diseño experimental, junto con el hecho de que los peces ya se estaban esmoltificando al inicio del experimento. Por lo tanto, no se pueden extraer conclusiones significativas de los resultados comunicados. en el mismo”* (traducción).

Lo mismo ha sido confirmado por **Richard Torrisen** en la página 2, penúltimo párrafo de la Declaración de **Richard Torrisen** (E3). Se reproduce el penúltimo párrafo de la Declaración aquí: *“El principal reto de este experimento es que todos los peces experimentales muestran claros valores de smolt antes de que se les administren las diferentes dietas experimentales. Incluso los peces de control muestran una buena capacidad de osmorregulación al inicio. Esto significa que el experimento no consiste en inducir la esmoltificación en el salmón atlántico, sino más bien en un estudio del crecimiento y en tratar de mantener el estado de esmoltificación en el salmón atlántico en agua dulce con diferentes dietas de prueba. Para luego comparar el crecimiento tras la transferencia al mar entre los*

diferentes grupos de tratamiento”. Se acompaña copia de la Declaración de **Richard Torrisen** en el otrosí de este escrito.

Además, en la página 35, segundo párrafo de la decisión de los tribunales de Noruega (E5) se afirma que: “The Court of Appeal finds that two of the experiments performed by Biomar in 2016 (the Sterling experiment) and 2021 (Nofima) do not provide grounds for a different assessment of the requirement for technical effect. That smoltification may also be possible to achieve with a different composition, e.g. using amino acids other than free tryptophan, does not mean that EP'290 lacks technical effect”.

Este párrafo de la decisión emitida por el tribunal de Noruega se puede traducir como sigue: “*El Tribunal de Apelación considera que dos de los experimentos realizados por Biomar en 2016 (experimento **Sterling**) y 2021 (**Nofima**) no dan pie a una evaluación diferente de los requisitos de efecto técnico. Que la esmoltificación también pueda lograrse con una composición diferente, por ejemplo, utilizando aminoácidos distintos del triptófano libre, no significa que el PE'290 carezca de efecto técnico*”.

Este último confirma también que no se puede llegar a ninguna conclusión sobre el efecto de la dieta de prueba en la esmoltificación sobre la base de los resultados presentados en **Estudio NOFIMA-2021**.

Por otra parte, se quiere hacer notar que mi mandante inició un ensayo en noviembre de 2021, el informe resultante y los comentarios correspondientes se presentan en la sección 5 (páginas 8 a 22) de la Cuarta Declaración del Dr. William Harris (E4). En dicha sección se hace una revisión y evaluación de la fase de agua dulce en la esmoltificación del salmón atlántico con diversos alimentos experimentales. Se analizan distintos alimentos que incluyen dieta de control + NaCl + MgCl₂ + CaCl₂ y triptófano libre. Las composiciones de los alimentos figuran

en la tabla II de la página 10 de dicho informe. El ensayo se realiza en salmones atlánticos juveniles durante un intervalo de 29 días en agua dulce. A la vista de los resultados presentados en la sección 5 de E4, se puede afirmar que los datos presentados en la figura 6 del estudio EUROPHARMA/STIM.AS-2021 queda claro que el triptófano tiene un efecto sorprendente en el desarrollo de la hipoosmorregulación en el salmón del Atlántico.

E.- Comentarios respecto de solicitudes equivalentes aceptadas a la fecha en otras jurisdicciones:

El 21 de febrero de 2020, el tribunal de la ciudad de Oslo emitió una decisión sobre la validez de NO/EP3197290B1 (18-100119TVI-OTIR/05). Se determinó que la solicitud Europea equivalente (EP'290) revelaba un novedoso e inventivo alimento para peces y por lo tanto mantuvo confirmó la validez de la patente.

Las consideraciones y conclusiones del Tribunal de la Ciudad de Oslo con respecto al estado de la técnica más cercano (D2) mencionan que la actividad inventiva no se ve afectada.

El tribunal también consideró si la invención reivindicada carecía de actividad inventiva, comenzando por Basulto et al. El tribunal concluyó que la presente solicitud sustenta que los peces que proporcionan un alimento enriquecido con sodio, calcio, magnesio y triptófano libre bajo luz constante (refiriéndose al experimento 6) tienen claramente mejores propiedades de producción en el mar en comparación con el alimento de control y la fotomanipulación tradicional. **El tribunal concluye que las reivindicaciones en cuestión no son obvias a la luz de Basulto et al.**

A su vez, en el otrosí de este escrito se acompaña la decisión del Comité de Apelación del Tribunal Supremo de Noruega del 12 de julio de 2022 y una traducción de la misma.

A la luz de lo expuesto, solicitamos respetuosamente que se confirme la sentencia de INAPI y se rechace la oposición, aceptando el pliego limitado debidamente acompañado ante este Tribunal ya que cumple con todos los requisitos exigidos por la Ley y su Reglamento al efecto.

POR TANTO,

SOLICITO a este Honorable Tribunal de Propiedad Industrial, tenerlo presente.

OTROSÍ: A UD. Pido se sirva tener por acompañados con citación los siguientes documentos:

1. Nuevo pliego de reivindicaciones.
2. Nutrient Requirements off Fish and Shrimp; The National Academies Press; páginas 106, 107, y páginas 326, 327.
3. Segunda Declaration of Dr. William Harris
4. Basic 2013; Aquaculture 388-391: páginas 8-13
5. Lepage-2002 et al; *The Journal of Experimental Biology*, 205, 3679-3687.
6. Lepage-2005 (E9); *J. Pineal Res.* 2005; 38: 264-271.
7. Cuarta Declaración del Dr. William Harris
8. Declaración de Jesse Trushenski
9. Declaración de Richard Torrisen
10. Decisión del Comité de Apelación del Tribunal Supremo de Noruega
11. Copia simple de sentencia de Tribunal de Propiedad Industrial Rol TPI 1794-2019 emitido el 28 de julio de 2021
12. Copia simple de fallo N° 10.664 emitido el 10 de junio de 2021 respecto de la solicitud 3161-2014 por INAPI



13. Copia simple de sentencia de Tribunal de Propiedad Industrial Rol TPI 1538-2020 emitida el 23 de agosto de 2022.

POR TANTO,

SOLICITO A UD. Tenerlos por acompañados con citación.

REIVINDICACIONES

1. Un alimento adecuado para salmonidae que comprende proteína, grasa, carbohidratos, vitaminas, minerales y agua, CARACTERIZADO porque el alimento adecuado para salmonidae además comprende de 10-100 g/kg en peso de sales de sodio (Na^+), de 0,1-100 g/kg en peso de sales de magnesio (Mg^+), y 0,1-100 g/kg en peso de sales de calcio (Ca^{2+}), donde el alimento para peces comprende de 3,934 – 39,340 g/kg en peso de Na^+ , de 2-10 g/kg en peso de un modulador del receptor de cationes polivalentes (PVCR) en la forma de triptófano, de 0,026 – 25,530 g/kg en peso de Mg^{2+} , y de 0,036 – 36,110 g/kg en peso de Ca^{2+} , de 6,202 – 199,020 g/kg en peso de Cl^- , en donde el modulador del receptor de cationes polivalentes está en la forma de aminoácidos libres.

2. El alimento para peces de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque las sales de sodio son NaCl .

3. El alimento para peces de acuerdo con la reivindicación 2, CARACTERIZADO porque las sales de magnesio son MgCl_2 .

4. El alimento para peces de acuerdo con la reivindicación 2, CARACTERIZADO porque las sales de calcio son CaCl_2 .

5. El alimento para peces de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, CARACTERIZADO porque comprende 6% en peso de NaCl , 0,75% en peso de CaCl_2 , 0,25% en peso de MgCl_2 y 0,4% en peso de L-triptófano.

NUTRIENT REQUIREMENTS OF FISH AND SHRIMP

Committee on Nutrient Requirements of Fish and Shrimp

Board on Agriculture and Natural Resources

Division on Earth and Life Studies

NATIONAL RESEARCH COUNCIL
OF THE NATIONAL ACADEMIES

THE NATIONAL ACADEMIES PRESS
Washington, D.C.
www.nap.edu

mitochondria resulting in DNA appearing to be retained in tissues, independent of dietary concentration.

DIETARY LIPID LEVEL

A true lipid requirement for any species of fish or shrimp cannot be specifically defined because it is influenced by a variety of nutritional factors. As a macronutrient, lipid is principally a source of energy. The amount of dietary lipid required is influenced by the contents of dietary protein and carbohydrates, which can also serve as sources of energy. As previously described, protein and carbohydrate can also be sources of lipid through lipogenesis with amino acids and pyruvate serving as the main carbon sources. As protein sources are the most costly ingredients in diets formulated for commercial use, the goal is to minimize dietary protein that might be used as a source of energy. Therefore, with an appropriate amount of energy supplied by lipid, protein requirements can be reduced or "spared." In turn, the level of lipid required to satisfy the energy requirement could be reduced through the provision of sources of carbohydrates in species that can effectively utilize these nutrients. However, carbohydrates are more efficiently digested by some species (often herbivorous/omnivorous) than others. Thus, some species may have limited capabilities of digesting carbohydrate, thereby restricting its use as an effective source of energy. It may be that species that have evolved on high-lipid food sources are more likely to have a poor utilization of dietary carbohydrate. Environmental temperature may be another factor for the difference as most investigated carnivores are coldwater species and most herbivorous species are warmwater fish. The amount of dietary lipid is also affected by its source relative to the satisfaction of requirements for essential fatty acids (EFA). The relative amount of lipid to satisfy the EFA requirements is dependent upon lipid source(s) and corresponding fatty acid profiles. For commercial diet formulation, generally TAG-rich oils/fats are provided as ingredients of diets to ensure that specific requirements for PUFA and/or LC-PUFA are effectively satisfied.

Although an "optimum" level of dietary lipid cannot be truly defined for any species, there is a range within which dietary lipid should be supplied. The lower limit will be defined as the amount of lipid required to supply the requirements for EFA (and cholesterol and phospholipid in some species at specific life stages), which will depend upon the precise lipid source(s) and their corresponding fatty acid profiles. However, higher dietary levels may be necessary to satisfy obligatory lipid deposition required to successfully fulfill or realize certain physiological stages often associated with reproduction (migration/spawning). Increasing dietary lipid above the minimum level will support higher growth rates, possibly partly based on protein sparing, toward an upper limit where excess lipid leads to unwanted deposition of lipid in the peritoneal cavity, liver, or other tissues (Company et al., 1999; Craig et al., 1999; Oatley and Gotlin, 2000).

This represents wasted energy as there is little point in supplying an energy-yielding nutrient that is simply deposited unused in tissue stores. Of course, deposited lipid contributes to increased weight, but as it is not flesh (muscle), it is not contributing to yield. This is highlighted in species such as Atlantic cod (*Gadus morhua*) that deposit lipid in the liver or other species with large perivisceral storage. So-called "oily" fish such as Atlantic salmon (*Salmo salar*), which deposit significant amounts of lipid in the flesh, are able to tolerate and utilize higher dietary lipid levels.

Fish

Notwithstanding the above caveats, various studies have investigated the relationships between dietary lipid contents, growth, and lipid deposition in fish. Weight gain was increased in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in fish fed dietary lipid at 21% compared to 8–11% (Luzzana et al., 1994), and growth was higher in brown trout (*Salmo trutta*) fed dietary lipid at 29% compared to 21% (Arzol et al., 1993). Furthermore, weight gain in Atlantic salmon was higher in fish fed diets containing 38–47% lipid compared to fish fed 31% lipid (Henro and Sandnes, 1999). However, high dietary lipid increases flesh lipid levels in freshwater fish and salmonids including rainbow trout (Dias et al., 1999) and Atlantic salmon (Bell et al., 1998; Henro and Sandnes, 1999). Despite this, the upper level for dietary lipid in salmon diets doubled between the 1970s and late 1990s, when an optimal dietary lipid level of 35% was suggested (Elinch and Room, 1997). However, deposition of excess dietary lipid in the flesh can impact carcass and product quality, causing problems of oily texture and pigmentation that lead to consumer and processor resistance (Bell et al., 1998; Hillestad et al., 1998) and may influence early sexual maturation in males (Shearer and Swanson, 2000). Some problems may be alleviated by feeding a low-fat "finishing" diet prior to slaughter (Rasmussen et al., 2000).

However, in contrast to the above situation with salmonids, it should be noted that > 85% of all farmed finfish production is of freshwater, predominantly low trophic level fish species including carps and tilapia (Lacou et al., 2010), which generally cannot tolerate such high levels of dietary lipid (often < 10%). This may be associated with these species having natural diets that generally contain lower levels of lipid and, perhaps, higher levels of carbohydrate that they are thus adapted to utilize more effectively and efficiently (see Chapter 7). As a result these species seem to have a lower ability to utilize high dietary lipid and so commercial feeds.

Weight gain of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) was increased in fish fed diets containing lipid at 15% compared to 9% lipid (Manuel Vergara et al., 1996), and 19% compared to 11 and 15% (Lanari et al., 1999), but a lower limit to the growth-promoting effect of high-fat diets in marine fish was indicated because growth rate was higher in sea bass fed 24% lipid compared to fish fed 30% lipid (Pérez

and Oliva-Teles, 1999). Flesh, organ, and visceral lipid increases as dietary lipid increases in marine fish including turbot (*Psetta maxima*) (Saether and Johling, 2001) and sea bass (Calucutan and Coloso, 1995). High-fat diets may also promote the development of fatty liver pathology (Cahallern et al., 1999).

Shrimp

In shrimp and other crustaceans, weight gain responses to different levels of dietary oils, either alone or in combination, indicate that highest gains are generally achieved at dietary levels of 5–6% inclusion. Higher levels (> 10%) often retard growth (Kanazawa et al., 1977a; Davis and Robinson, 1986; Sheen and D'Abramo, 1991), most probably due to a reduction in consumption caused by high caloric content and/or an inability to metabolize high levels efficiently (reduced digestibility). Reduced growth has been shown to be associated with accumulation of lipid in tissue (Castell and Covey, 1976; Pemat and Adelung, 1983; González-Félix et al., 2002a). These conclusions on dietary lipid levels were drawn from experiments in which marine-derived sources containing good profiles of n-3 LC-PUFA, including cod liver oil, menhaden fish oil, pollock liver oil, and short neck clam oil, were used. Some studies have included plant oils that are good sources of n-6 PUFA.

In summary, because of the complex metabolic interactions between protein, lipid, and carbohydrate mentioned at the beginning of the section, definition of precise dietary lipid requirements in fish and shrimp are not particularly useful or meaningful. Although lipid up to 20% of the dry weight of the diet allows protein to be effectively utilized for growth in many fish species without depositing excessive lipid in the tissues (Sargent et al., 2002), lipid can have a protein-sparing effect in many species that has driven the use of so-called "high-energy" (high-lipid) diets to become increasingly widespread in aquaculture. High-energy diets can have consequences by altering lipid and fatty acid metabolism with health and welfare implications for the fish and product quality for the consumer (Sargent and Tacoa, 1999). More detailed accounts of nutritional energetics and the role of lipid as an energy source and its interaction with other dietary components, including protein and carbohydrate, are provided in Chapter 4.

SPECIFIC REQUIREMENTS

Essential Fatty Acids

As vertebrate and crustacean species cannot synthesize any PUFA from monounsaturated fatty acids *de novo* (see Figure 6-5), they therefore have an absolute dietary requirement for certain specific n-3 and n-6 PUFA. Dietary deficiency of these "essential fatty acids" results in various pathologies: the animal stops growing and reproducing, and

eventually dies (Das, 2006). The biologically active PUFA required for many essential metabolic and physiological processes are the LC-PUFA, 20:4n-6 (ARA, arachidonic acid), 20:5n-3 (EPA) and 22:6n-3 (DHA) (Das, 2006). In contrast, the shorter chain C_{18} PUFA, typified by linoleic acid 18:2n-6 and α -linolenic acid 18:3n-3, have no specific metabolic roles in themselves, although they can serve as precursors for the corresponding n-6 and n-3 LC-PUFA (Sargent et al., 1995a). Note that vertebrates and crustaceans are unable to interconvert the n-6 and n-3 PUFA families (Figure 6-5). Species vary in their capacity to convert C_{18} PUFA to LC-PUFA. In species that cannot perform these conversions, dietary C_{20} and C_{22} LC-PUFA are essential, and their C_{18} homologues do not satisfy EPA requirements. In species that can perform the conversions, C_{18} PUFA, and C_{20-22} LC-PUFA can all be termed EFA with the LC-PUFA often being more effective nutritionally than their C_{18} counterparts. Definition of the optimal amounts of EPA to satisfy the requirements for normal growth and development has been a well-studied area of lipid metabolism in fish, driven by the needs of the aquaculture industry. Of particular importance, the requirements can vary quantitatively during ontogenesis and, therefore, accurate definition of EFA requirements for a given species involves determining not only the absolute requirements of specific PUFA and the optimal balance between different PUFA, but also how these requirements vary at different life stages (Fischer, 2010).

Methodological Challenges

Appreciation of quantitative EFA data requires some considerations of the methodology used for determining these requirements. The methodology is difficult because an EFA-deficient feed has to be produced, which requires an essentially lipid-free diet. This is hard to achieve without affecting other important aspects of the diet, such as attraction and palatability. The consequence of these difficulties is that EFA requirements were generally measured in small fish fed diets with much lower lipid levels than are commonly used today, with consequently lower growth rates. Therefore, the quoted estimates of EFA requirements probably represent the levels that were sufficient to (1) prevent appearance of deficiency signs and (2) to maintain growth at that particular, albeit low, dietary lipid level. The EFA requirements can be expressed as a percentage of the total lipid, percentage of diet, or percentage of total fatty acids. It is apparent that the quantitative requirement for EFA may vary with the total dietary lipid level, and this may also vary with the stage of development (Lequendo, 1996). For instance, the requirement for n-3 LC-PUFA appeared to increase as the level of lipid in the diet increased in red sea bream (*Lagrus major*) fingerlings (Takeuchi et al., 1992a), yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) fingerlings (Takeuchi et al., 1992b), and *Penaeus monodon* (Glencross et al., 2002a), although there was no apparent variation in the requirement for n-3 LC-PUFA as

NUTRIENT REQUIREMENTS OF FISH AND SHRIMP

Committee on Nutrient Requirements of Fish and Shrimp

Board on Agriculture and Natural Resources

Division on Earth and Life Studies

NATIONAL RESEARCH COUNCIL
OF THE NATIONAL ACADEMIES

THE NATIONAL ACADEMIES PRESS
Washington, D.C.
www.nap.edu

THE NATIONAL ACADEMIES PRESS 500 Fifth Street, N.W. Washington, DC 20001

NOTICE. The project that is the subject of this report was approved by the Governing Board of the National Research Council, whose members are drawn from the councils of the National Academy of Sciences, the National Academy of Engineering, and the Institute of Medicine. The members of the committee responsible for the report were chosen for their special competences and with regard for appropriate balance.

This study was supported by a grant from the Agricultural Research Service of the United States Department of Agriculture under Contract No. 59-0790-5-186, the National Oceanic and Atmospheric Administration under Award No. NA46OAR4170833, the United Soybean Board under Project No. 8490, and internal National Research Council funds derived from sales of publications in the Animal Nutrition Series. Any opinions, findings, conclusions, or recommendations expressed in this publication are those of the author(s) and do not necessarily reflect the views of the organizations or agencies that provided support for the project.

Library of Congress Cataloging-in-Publication Data

Nutrient requirements of fish and shrimp / Committee on the Nutrient Requirements of Fish and Shrimp, Board on Agriculture and Natural Resources, Division on Earth and Life Studies, National Research Council of the National Academies.

p. cm.

Includes bibliographical references and index.

ISBN-13: 978-0-309-16338-5 (cloth)

ISBN-10: 0-309-16338-2 (cloth)

ISBN-13: 978-0-309-16339-2 (pdf)

ISBN-10: 0-309-16339-0 (pdf)

1. Fishes—Nutrition—Requirements. 2. Shrimps—Nutrition—Requirements. 3. Fishes—Feeding and feeds. 4. Shrimps—Feeding and feeds. I. National Research Council (U.S.). Committee on the Nutrient Requirements of Fish and Shrimp.

SH156.N865 2011

395.3'88—dc22

2011008752

Additional copies of this report are available from the National Academies Press, 500 Fifth Street, N.W., Lockbox 285, Washington, DC 20055; (800) 624-6242 or (202) 334-3313 (in the Washington metropolitan area); Internet, <http://www.nap.edu>.

Copyright 2011 by the National Academy of Sciences. All rights reserved.

Printed in the United States of America

Nutrient Requirements Tables

The values in the nutrient requirements tables represent minimum requirements for maximum performance of fish and shrimp under experimental conditions. With few exceptions, the data were obtained with juvenile and larval fish and shrimp and under conditions considered to be optimal. However, requirements for some nutrients (e.g., essential fatty acids, vitamins) vary with the developmental stage and possibly with physiological stage. Where several values appear in the literature, the value presented in the table represents a consensus of the committee for the most reasonable estimate of the requirement. Some of the listed dietary requirements for shrimp are much higher than those for fish species. The differences are probably an artifact resulting from the feeding habits of shrimp that can result in a substantial loss of certain nutrients from feeds before ingestion. These values, although probably not needed to meet actual metabolic requirements, are presented because they are the only values reported in the scientific literature.

The stated requirements do not include any surpluses. In practice, however, a margin of safety is commonly added, whereby nutrient levels are increased to compensate for processing and storage losses, variation in composition and bioavailability of nutrients in feed ingredients, possible interactive effects, and variation in requirements caused by environmental effects. If diet formulations contain different digestible nutrient densities (e.g., formulated to contain

higher or lower concentrations of digestible energy or protein than the values listed in the table), the other nutrient concentrations should be modified appropriately. The challenges associated with defining and meeting essential nutrient requirements are discussed in the preceding chapters.

The requirements for amino acids, fatty acids, vitamins and minerals were determined with diets containing pure and chemically defined ingredients that are highly digestible to the organisms; therefore, the values in the table represent almost 100% bioavailability to the targeted species. Consequently, nutrient bioavailability must be considered when formulating diets from practical feedstuffs because the bioavailability of nutrients is usually substantially less than bioavailability of nutrients in purified diets.

For many farmed fish species, no amino acid requirement data are available. In practice, feeds for these species are sometimes formulated to meet the essential amino acid requirements of salmon or trout, based on the assumption that essential amino acid requirements are similar among carnivorous fish species. A similar approach is commonly used in the formulation of diets for shrimp. Refer to Chapter 5 for a detailed discussion of essential amino acid requirements for fish and shrimp. For other essential nutrients, feeds are either over-fortified (vitamins) or formulated to meet requirements that have been determined for similar species.

TABLE 18-1 Nutrient Requirements of Freshwater Fish (dry-matter basis)^{a,b}

Item	Atlantic Salmon <i>Salmo salar</i>	Common Carp <i>Cyprinus carpio</i>	Roahu <i>Lebeche rohu</i>	Tilapia <i>Oreochromis spp.</i>	Channel Catfish <i>Ictalurus punctatus</i>	Hybrid Striped Bass <i>Morone saxatilis</i> × <i>Morone chrysops</i>	Rainbow Trout <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Pacific Salmon <i>Oncorhynchus spp.</i>
Typical Energy and Protein Concentrations^c								
Digestible energy (kcal/kg diet)	4,400	3,200	3,200	3,400	3,000	4,000	4,200	4,200
Digestible protein (%)	36	32	32	29	29	36	38	40
Nutrient Requirements								
Amino acids (%)								
Arginine	1.8	1.7	1.7	1.2	1.2	1.0	1.5	2.2
Histidine	0.8 ^d	0.5	0.9	1.0	0.6	NT	0.9	0.7
Isoleucine	1.1	1.0	1.0	1.0	0.8	NT	1.1	1.0
Leucine	1.5	1.4	1.5	1.9	1.3	NT	1.5	1.6
Lysine	2.4	2.2	2.3	1.6	1.6	1.6	2.4	2.2
Methionine	0.7	0.7	0.7	0.7	0.6	0.7	0.7	0.7
Methionine + cysteine	1.1	1.0	1.0	1.0	0.9	1.1	1.1	1.1
Phenylalanine	0.9	1.3	0.9	1.1	0.7	0.9	0.9	0.9
Phenylalanine + tyrosine	1.8	2.0	1.6	1.6	1.6	NT	1.2	1.8
Threonine	1.1	1.5	1.7	1.1	0.7	0.9	1.1	1.1
Tryptophan	0.3	0.3	0.4	0.3	0.2	0.2	0.2	0.3
Valine	1.2	1.4	1.5	1.5	0.8	NT	1.2	1.2
Taurine	NR	NR	NT	NT	NR	NR	NR ^e	NT
Fatty acids (%)								
18:3n-3	1.0	0.5-1.0	NT	NT	1.0-2.0	NR	0.7-1.0	1.0
n-3 LC-PUFA ^f	0.5-1.0	R	NT	R	0.5-0.75	0.5-1.0	0.4-0.5	1.0
18:2n-6	NT	1.0	NT	0.5-1.0	NT	NT	1.0	1.0
Cholesterol (%)								
Cholesterol	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Phospholipids (%)								
Phospholipids	NT (4.0-6.0) ^g	NT (2.0) ^g	NT	NT	NT	NT	NT (4.0-14.0) ^g	NT
Macrominerals (%)								
Calcium	NR	0.34	NT	0.07 ^h	0.045 ^h	NR	NR	NR
Chlorine	NT	NT	NT	0.15	0.17	NT	NT	NT
Magnesium	0.04	0.05	NT	0.06	0.04	NT	0.05	NT
Phosphorus	0.50	0.70	NT	0.40	0.12	0.50	0.70	0.60
Potassium	NT	NT	NT	0.30-0.30	0.26	NT	NT	0.80
Sodium	NR	NT	NT	0.15	0.06	NT	NR	NT
Microminerals (mg/kg)								
Copper	5	3	NT	5	5	NT	3	NT
Iodine	R	NT	NT	NT	1.1	NT	1.1	1
Iron	30-60	150	NT	85	30	NT	NT	NT
Manganese	10	12	NT	7	2.4	NT	12	NT
Selenium	NT	NT	NT	NT	0.25	0.25	0.15	R
Zinc	37	15	NT	20	30	37	15	NT
Fat-soluble vitaminsⁱ								
A (mg/kg)	NT	1.2	NT	1.8	0.6	0.5	0.75	R
D (mg/kg)	NT	NT	NT	9	12.5	NT	40	NR
E (mg/kg)	0 ^j	100	1.2	60	50	28	50	50
K (mg/kg)	<10	NT	NT	NT	R	NT	R	R

continued

In the matter of:

European Patent No. 3.197290B1

In the name of

Eurapharma AS

-and-

Opposition by Cargill, Incorporated (O1)

Biomar Group AS (O2)

Nutreco IP Assets B.V. (O3)

Second Declaration of Dr. William Harris

I have previously provided a declaration in the matter of EP3197290B1 dated the 29th October 2020. I understand that in the present proceedings, said declaration is numbered D44. I am also aware of that a declaration prepared for court proceedings in Norway has been filed by one of the opponents in the present proceedings, given the reference number D31.

I have been provided with a copy of a letter of the opponent Biomar Group AS dated the 22nd March 2021. In light of said letter, I have been asked to comment upon the following:

1. Leopoldo et al. (D40)

I understand that it is argued that the skilled person working within the field of salmonids, in particular smoltification of salmonids, would be aware of and consider D40 and the teaching thereof.

In D40, the authors report effects of dietary tryptophan addition on the survival, growth and aggressiveness of juvenile mud crabs.

I find the attempt to suggest that specific developments in feeds of crustaceans vs. those in teleost fish become possible due to the interest of a skilled individual is not credible. There are profound biological differences between crustaceans and teleost fish. These include the fact that crustaceans possess shells -exoskeleton not bones -inner skeletons, undergo regular molting of their shells for growth, are known to display complex multiple intermediate growth stages, possess eyestalk hormones that are not present in fish as well as osmoregulatory physiological systems and adaptive behaviors that differ significantly from those of teleost fish. All of these differences between crustaceans vs. teleost fish reflect 500 million years of evolution. The significant reported differences in physiology and molecular biology/genetics shows that these biological systems display only a very limited amount of similarity. For these reasons above, it does not seem credible that an individual skilled in the art would readily consider that a feed designed for crustaceans can be readily adapted to a feed for teleost fish and vice versa.

Furthermore, the Leopoldo experimental diets shown in Table 2 would not be suitable for diets that could be fed to either Atlantic salmon parr or smolt. Comparison of standard Atlantic salmon diets vs. Leopoldo diets shows that the fat content (9.49-8.75 % lipid) and energy content (17.5 MJ/kg) of the Leopoldo diets are too low to meet the recommended lipid (18-22 % lipid) and energy (>22 MJ/kg) requirements of Atlantic salmon diets.

Feeding Atlantic salmon (parr or smolt) the Leopoldo diets would likely result in significantly reduced growth caused by too low levels of fat and energy. Reduced growth during the freshwater phase would be expected to negatively affect these fish both when the parr go through the smoltification process (Thorpe et al. 1982; Sgholt, T. et. al. 1995) as well as their survival rate after transfer to seawater due to unfavorable surface area/volume ratios of the resulting fish (Lee and Lee 2020). Further, parr to smolt transformation (smoltification) is an energy demanding process and it would therefore be expected that the Leopoldo diets would not promote, much less enhance, the smoltification. Growth and survival after transfer to seawater are the two most important key performance indicators for the fish farmers, and the seawater management arm of a salmon aquaculture company would not even consider using feed which would negatively affect these indicators. Similarly, the freshwater hatchery management arm of the salmon aquaculture company would not consider feeds that reduce the growth rates of parr-smolt since it will prolong their rearing interval and hence the costs of producing smolt that can then be transferred to sea.

2. Hoseini et al. (D20)

I understand that it is argued that the skilled person working within the field of salmonids, in particular smoltification of salmonids, would be aware of and consider D20 and the teaching thereof.

In D20, the authors report effects of dietary tryptophan on osmotic stress tolerance in common carp, *Cyprinus carpio*, juveniles.

Similar to the Leopoldo experimental diets shown in Table 1 of D40, the Hoseini diet shown in Table 1 of D20 would not be suitable for feeding Atlantic salmon parr or smolt. Comparison of standard Atlantic salmon diets vs. Hoseini diet show that the fat content of the Hoseini diet is too low to meet the lipid (18-22 % lipid) requirements of salmon diets.

Feeding Atlantic salmon (parr or smolt) the Hoseini diet would likely result in reduced growth caused by too low levels of fat. As mentioned in #1 above, the reduced growth during the freshwater phase would be expected to negatively affect the survival rate after transfer to seawater due to an unfavorable surface area of the fish. Further, parr to smolt transformation (smoltification) is an energy demanding process and it would therefore be expected that the Leopoldo diets would obstruct rather than promote smoltification. Growth and survival after transfer to seawater are the two most important key performance indicators for the fish farmers, and they would not even consider using feed which would negatively affect these indicators.

3. Section 4.2.2 of Blomar's submission

In section 4.2.2 of Blomar's submission, reference is made to my first declaration, page 10, and it is asserted that "Dr. Harris confirms in D44 that it is in no way plausible that smoltification is achieved from the trials of the opposed patent". It is furthermore suggested, last paragraph on page 7, and based on the citation from my first declaration, that "the feed may influence some of the factors used to determine sea-water readiness, but there is no evidence that it induces smoltification".

I find this to be a misrepresentation of both the facts and my opinion. To set the record straight, I stated in my first declaration, D44, that the data in the EP 290 did not provide every one of the criteria used by many authors to compare dietary induced EP 290 smolt from "true smolt", since the co-inventors of this patent did not test every single parameter that was available. As a result, a definitive conclusion as to whether dietary EP 290 smolt were identical to "true smolt" as defined by multiple published criteria was not possible for me to reach. By contrast, what I also stated was that all of the biological criteria studied as well as the ability of dietary induced smolt to be successfully transferred

to seawater as reported by the co-inventors were entirely consistent with them being fully smoltified fish. Moreover, other studies that were cited and summarized (cf. the presentation of Borge Takvam and Strilberry et al.) in D44 Section 6, demonstrated that feed-only EP'290 smolts displayed characteristics entirely consistent with these fish achieving smolt status. To my understanding, it is not necessary to prove that dietary smolt are exactly the same as photoperiod manipulated smolt for purposes of showing that the claimed feed works as asserted.

4. Comments to D2 (WO02/30182) in section 4.4.2 of Biomar's submission

In Biomar's submission dated the 22nd March 2021, reference is made to a declaration submitted in court proceedings in Norway (D31) as well as my first declaration filed in the present matter (D44).

I find that the statements made by Biomar in Section 4.4.2 are somewhat misleading. There are several areas that I believe require clarification. These are:

- The exemplification provided in WO'0182 consisted of a limited number of experiments and tests with various combinations of PVCr modulators added to either the rearing water or feed. The co-inventors of the patent considered their data and other factors including usefulness and industrial applicability at the time and elected to pursue the claims in this patent on the combination of these factors. In other words, the co-inventors of WO'0182 did not attempt to exhaustively test every possible combination of PVCr modulators as feed ingredients in an effort to achieve a feed-only solution for salmon smoltification such as is provided in EP'290.
- Biomar's comments listed on the last paragraph of page 11 and continuing on paragraph 1 of page 12 are directed at PVCr activators vs. de-activator ratios. These comments provided do not take into account that PVCr activators have different dose-response relationships with PVCr activation. For example, Ca²⁺ ions are ~10 times more potent vs. Mg²⁺ ions to achieve the same degree of activation. Similarly, the deactivation of PVCrs by Na⁺ ions is not linear over a range of concentrations of NaCl present in salt added diets. In summary, these data obtained from detailed studies of full-length clones of PVCrs expressed in cells, do not support the simple relationships between PVCr activators and deactivators as summarized in these comments.

In other words, in EP'290, the test diet 2 is used throughout the field trials. However, the skilled person would understand from the teaching in EP'290 that there is not just a single formulation that will work, but rather multiple formulations that can achieve the same degree of PVCr modulation. To achieve this same degree of outcome, i.e. that the fish becomes ready for transfer to seawater in the same way as is achieved with test diet 2, one might use different concentrations of the minerals and the amino acid in the feeds. That is, when compared with test diet 2, I would, for example, expect that also a feed with somewhat lower Ca²⁺ and somewhat higher Mg²⁺ levels as compared with test diet 2, or with higher Ca²⁺ and lower Mg²⁺, all within the range of EP'290, would achieve the same results as test diet 2, i.e. smoltification of the fish. Smoltification would also be expected to occur with a feed similar to test diet 2 with a somewhat lower levels of Ca²⁺ and Mg²⁺, or a somewhat higher level of Ca²⁺ and Mg²⁺.

5. Comments the presentation of Borge Takvam and Strilberry et al.

On page 14 of Biomar's submission, also by referring to my first declaration (D44) and the presentation by Borge Takvam and Strilberry et al. (given document numbers D61 and D62 in the present proceedings), Biomar states that "data sets regarding the effectiveness..." have not been provided in the patent or since", and further that "D61 and D62 confirms that the effects relating cost-benefit are

also not present, i.e. the feed does not provide equal results on all parameters while reducing costs and labor due to non-adding of salts to the rearing water"

I find that Blomar's reading of my first declaration is not accurate. What I stated is that EP'290 did not provide a mechanism of action data set nor rigorous trials that were followed all the way to harvest of the fish. However, referring to D61 and D62, I find that compelling data for the applicability of the feed of EP'290 is provided and I find these consistent with the information provided in EP'290.

In the Takvam report, the authors concluded that fish fed with the feed of EP'290 appeared to feed earlier and displayed higher growth rates after transfer to seawater vs. standard photoperiod induced smolt during the first 90 days of tracking. Subsequently, Feed Only EP'290 smolt had been tracked over an interval of 10 months with growth to 1250-1850 gm body weight. They observed no differences in mortality between the two treatments. In this regard, Blomar has commented on the 1 % increase in mortality displayed by the smaller Feed Only smolts that were put to sea in August (30 days earlier) than the remaining fish. Since these fish were smaller (111-124gm) vs. later transferred fish, this small increased mortality is balanced by an increase in hatchery output and warmer waters as discussed below.

As I noted in my first declaration and as reported in D61 but not mentioned by Blomar is the ability to transfer Feed Only smolts to sea at earlier times where seawater temperatures are warmer and EP'290 smolts feed aggressively after their transfer. This capability together with the increases in overall capacity of the freshwater hatchery produced by obtaining a larger biomass throughput are valuable and not mentioned by Blomar. Overall, my understanding of analyses in the Takvam report made by commercial farming managers were quite positive and their comments are directed at the overall cost of the EP'290 product related to the fact that they would like to see such a product available at a cheaper price and not that they had performed some cost-benefit analysis of the EP'290 process.

In the Striberry et al. article, there appears to be some confusion about the data and its interpretation by Blomar. First, are the data and its labeling in Figure 2 of Striberry. Figure 2 and its accompanying legend designate certain fish as provided 24 hr. light and fed standard feed (LL) in white bars. By contrast, other fish were provided exposure to a reduced photoperiod and then 24 hr. light and fed standard feed are denoted by grey bars and termed (SP-LL). Fish fed with the EP'290 diet and provided 24 hr. light (LL+L+Diet) are denoted by white crosshatched bars and fish provided both exposure to reduced photoperiod and EP'290 diet (SP-LL+Diet) are shown as grey crosshatched bars. The group cited by Blomar (mistakenly called standard feed with 24 hr. light) as having the largest average body mass in July is, in fact, the LL+L+Diet group which is EP'290 diet with continuous exposure to light.

Second, feeding of both continuous light groups of fish (LL) and (LL+L+Diet) were both restricted to 7 hr. per 24 hr. day in order for them to be similar to the two experimental groups of fish exposed to a winter photoperiod where they received 7 hr. of light and 17 hr. of darkness. In short, the photoperiod fish could not be fed during their exposure to darkness and the authors did not feed the two groups exposed to continuous light during this same 17 hr. interval even though the fish could have ability to consume more feed. This experimental design feeding restriction serves to reduce the size differences between the two photoperiod groups and two continuous light groups. The point is that such differences in size of the resulting fish would likely be even larger than the authors observed if standard hatchery practices were followed.

Brookings, South Dakota USA



H. William Harris M.D. Ph.D.

April 14, 2021

Date

REFERENCES

- Lee, M. and J-W Lee. (2010) Differential seawater adaptability in three different sizes of under-yearling steelhead trout. *Dev. Reprod.* 24:215.
- Sigholt, T, M Staurnes, HJ Jakobsen, T Asgare, (1995) Effects of continuous light and short-day photoperiod on smolting, seawater survival and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 130:373.
- Thorpe, J.E., Talbot, C. and Villarreal, C. (1982) Bimodality of growth and smolting in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture*, 28, pp. 123-32



Short- and long-term effects of dietary L-tryptophan supplementation on the neuroendocrine stress response in seawater-reared Atlantic salmon (*Salmo salar*)



Dean Basic^{a,*}, Åshild Krogdahl^a, Joachim Schjolden^a, Svante Winberg^b, Marco A. Vindas^c, Marie Hillestad^d, Ian Mayer^a, Eystein Skjerve^e, Erik Höglund^f

^a Norwegian School of Veterinary Science, The Aquaculture Nutrition Centre, Department of Basic Sciences and Aquatic Biotechnology, PO Box 4140 Dep, 0033 Oslo, Norway

^b Uppsala University, Department of Neuroscience, Microbiology, Uppsala Biomedical Centre, PO Box 595, 751 24 Uppsala, Sweden

^c Norwegian University of Life Science, Department of Animal and Agricultural Sciences, PO Box 1432 Ås, Norway

^d Biotek AS, Nordre gate 11, 701, Trondheim, Norway

^e Norwegian School of Veterinary Science, Center for Epigenetics and Biotechnology, PO Box 8106 Dep, 0033 Oslo, Norway

^f Danish Institute for Fisheries Research, Department of Marine Ecology and Aquaculture, North Sea Center, PO Box 701, DK-9850 Ørnholtz, Denmark

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 October 2012

Received in revised form 18 December 2012

Accepted 12 January 2013

Available online 22 January 2013

Keywords:

L-Tryptophan

Atlantic salmon

Stress response

Cortisol

Monoamines

Aquaculture conditions

ABSTRACT

The essential amino acid L-tryptophan (Trp) is the immediate precursor of the neurotransmitter serotonin (5-HT). Supplementing Trp through diet has been shown to suppress the neuroendocrine stress response in vertebrates including teleosts. In salmonid fish, adjusting to the social environment as well as habituation to seawater involves the neuroendocrine stress response, suggesting that such environmental factors may modulate the stress-reducing effects of Trp. To date, studies that have investigated the neuroendocrine effects of dietary Trp have only been conducted in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), a salmonid species, under conditions featuring social isolation in the freshwater environment. Here, we address the effects of dietary Trp on post-stress plasma cortisol and hypothalamic monoamines in seawater-adapted Atlantic salmon (*Salmo salar*), reared at densities relevant for aquaculture. Fish were given feed containing 1, 2, 3 or 4 times the Trp content in normal feed for one week. Subsequently, the fish were reintroduced to feed containing the lowest Trp level corresponding to standard commercial feed for a number of days prior to exposure to an acute confinement stressor. Basal plasma cortisol levels were lower among both stressed fish at 1 and 10 days post dietary Trp supplementation. By comparison, stressed fish displayed stimulatory post-stress plasma cortisol responses at 1 and 2 days after the Trp regimen was terminated. However, a reversed pattern was observed among these fish at 10 days after Trp treatment. The overall effects of dietary Trp were more pronounced in dopamine (DA) neurochemistry compared to 5-HT in the hypothalamus. The results demonstrate both short- and long-term effects of elevated dietary Trp on the neuroendocrine stress response. These findings suggest that hypothalamic DA may be more involved than 5-HT in the stress-reducing effects of Trp in seawater-adapted Atlantic salmon, reared at densities relevant for aquaculture.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Exposure to unavoidable stressors in domesticated animals can be detrimental to animal welfare, depending on intensity and duration of the disturbance, and is therefore an important concern in aquaculture. In vertebrates, the endocrine reaction in such circumstances involves elevation of circulating glucocorticoids, mediated through several brain neurotransmitter systems including serotonin (5-hydroxytryptamine;

5-HT) and dopamine (DA) (Clausen, 1993; Dinan, 1995; Höglund et al., 2000; Koopmans et al., 2003; Gverli et al., 1999; Sullivan and Gramon, 1998; Summers et al., 2003; Winberg and Nilsson, 1993). Cortisol is the main corticosteroid hormone in fish and is often used as a physiological indicator of the primary stress response (Ellis et al., 2012). The link between the neurotransmitter 5-HT and its regulation of the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) or fish adrenal (HPA in mammals) axis has been extensively investigated (reviewed by Clausen, 1993; Dinan, 1996; Winberg and Nilsson, 1993). Both stimulatory and inhibitory effects have reported of this monoamine regarding the release of glucocorticoids, the end product of the HPA-axis, in teleosts (Höglund et al., 2002; Winberg et al., 1997).

The essential amino acid L-tryptophan (Trp) is the precursor of the monoamine 5-HT. Moreover, the rate of synthesis of central 5-HT is

Abbreviations: 5-HT, serotonin; 5-HIAA, 5-hydroxyindoleacetic acid; DA, dopamine; DOPA, 3,4-dihydroxyphenylacetate acid; Trp, L-tryptophan; HPL, hypothalamic pituitary–adrenal; HPA, hypothalamic pituitary–adrenocortical.

* Corresponding author. Tel.: +47 22964992.

E-mail address: dean.basic@nmbu.no (D. Basic).

largely determined by the availability of circulating Trp relative to other large neutral amino acids (LNAAs) (Fernstrom and Wurtman, 1997; Johnston et al., 1990). Previous studies have reported behavioral effects of dietary Trp supplementation which is related to changes in 5-HT signaling, such as decreased aggression and attenuation in stress-induced anorexia in several teleost species (Höglund et al., 2005, 2007; Hsueh et al., 2003; Winberg et al., 2001; Wolkers et al., 2012). Furthermore, Trp enriched feed has been shown to have a dose-dependent reducing effect on post-stress plasma cortisol levels in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in freshwater (Lepage et al., 2002). These endocrine responses have all been demonstrated on the day after feeding the fish with Trp for one week, although a longer treatment time seems to abolish these Trp effects (Lepage et al., 2003).

The above studies report stress reducing effects as a general response to dietary Trp treatment in fish. To our knowledge, most investigations regarding dietary manipulations of Trp have so far only been conducted in freshwater-adapted salmonid fish. The life cycle among most salmonid species features both a fresh- and a seawater phase. The post-smolt transformation (or smoltification), which allows the juvenile fish to cope with the osmotic challenges of seawater, is affected by the neuroendocrine stress response and vice-versa (Barton et al., 1985). Smoltification coincides with transient rises in cortisol which may also affect the welfare of the fish since cortisol suppresses immunocompetence, making the fish potentially more susceptible to infections or other external stressors (Mauk et al., 1987). While such effects of stress have been extensively reported during the freshwater phase, less information is available when it comes to dietary Trp treatment and stress coping in seawater post-smoltification.

Neurotransmission by both 5-HT and DA is affected by social experience: these monoamines integrate the behavioral and endocrine response to a stressor (Overli et al., 1999; Summers and Winberg, 2006; Winberg and Näsyan, 1993), suggesting that the social context is also a factor that potentially could influence the stress reducing effects of dietary Trp treatment. However, most studies that have investigated the stress reducing effects of Trp have been conducted in socially isolated fish (Basic et al., in press; Höglund et al., 2005, 2007; Lepage et al., 2002, 2003, 2005a, 2005b). It remains to be determined whether the HPI stress axis, as well as the central monoamines that regulate it, is equally sensitive to dietary Trp enrichment in the salmon smolt fully adapted to seawater and reared at densities relevant for aquaculture.

On this basis, the aims of this study were to determine whether a Trp-enriched diet resulted in suppression of the neuroendocrine stress response in seawater adapted Atlantic salmon smolts reared together in groups. Moreover, it was also of interest to investigate if these putative effects persisted after continuation of Trp supplementation.

2. Materials and methods

2.1. Experimental conditions and feed

The experimental animals used in this study were seawater adapted 1-year-old Atlantic salmon post-smolts (100 g in body mass), obtained from the commercial fish production company Marine Harvest AS. Upon arrival to the experimental facilities at Solbergstrand Marine Research Station, Oslo Fjord, approximately 1200 fish were randomly allocated to twelve indoor tanks (0.25 m³ in size, surface area and water depth corresponding to 0.25 m² and 0.85 m respectively). These tanks were continuously supplied with ambient seawater (7 L/min) from a depth of 60 m in the fjord, and equipped with tightly fitted top nets. Temperature varied between 8.3 °C and 10.5 °C while pH remained stable around 8.0. The light/dark regime was automatically controlled and adjusted to conditions at latitude 59°N (Oslo, Norway).

Prior to the experiment, approximately 100 fish were stocked in each of the tanks at a biomass density of approximately 17 kg/m². The fish were acclimated to these environmental conditions for one month. During this time, the fish were fed commercial salmon pellets

(BioMar, 4 mm) at 1% of their body mass/day using automated belt feeders. Four different types of experimental feed were prepared by BioMar AS, Brøndø, Denmark. These feeds contained different levels of Trp in relation to the total amount of other LNAAs. The feeds, specifically developed for Atlantic salmon, were identical in energetic value and differed only in Trp-amount; the control feed contained 0.40% Trp (1×Trp) whereas the experimental feeds contained 0.79% Trp (2×Trp), 1.19% Trp (3×Trp) or 1.58% Trp (4×Trp).

A set of 36 glass aquaria (46 L 0.13 m³ and a water depth of 5 cm), located in a separate room adjacent to the tank facility, were used to subject the fish to acute confinement stress individually. Each aquarium was equipped with tightly fitted transparent lids and continuously supplied with ambient seawater (0.5 L/min), while the light regime was produced using fluorescent tubes (30 W, natural light) located 20 cm above the water surface.

Following acclimation, the experimental feed regimes were run in triplicates, giving a total of twelve tanks. The fish were fed either 1×Trp, 2×Trp, 3×Trp or 4×Trp at a rate of 1% of body mass/day for 7 days using the same automated belt feeders. The experimental diet was then terminated and the fish were fed control feed (1×Trp) for 0, 1 or 9 days before sampling (designated as days 1, 2 or 10 from now on).

2.2. Stress and sampling

Fish were deprived of food for 24 h before sampling was initiated. Subsequently within this time frame, fish were then sampled either directly (undisturbed controls) or transferred and kept socially isolated in confinement for 30 min on the morning following the last day of feeding. The experiment was conducted over a period of 47 days and body mass among sampled fish ranged from 46 to 123 g (mean ± SD: 82 ± 18 g, N = 270).

At sampling, individual fish were humanely killed with a lethal dose of Benzocaine (ethyl-m-aminobenzoate methanesulphonate; 500 mg/L) and a blood sample (approximately 0.8 mL) was collected from the caudal vasculature using a syringe pre-treated with EDTA. Blood samples collected were immediately centrifuged (13,000 rpm, 4 °C, 2 min) and the plasma fraction transferred to 1.5 mL Eppendorf tubes and snap frozen on dry ice. During days 1 and 10 post dietary Trp treatment, immediately following collection of blood, the brains were quickly excised from the skull. The hypothalamus was dissected, wrapped in aluminum foil and quickly frozen in liquid nitrogen. The time points of 1 and 10 days were chosen for determining the acute and long term effects of dietary Trp on hypothalamic levels of monoamines and their metabolites. All samples were stored at −70 °C for later analyses of plasma cortisol and brain monoaminergic activity. After sampling was completed, the gastro-intestinal (GI) tract was opened in all fish in order to check for feed content. A previous study reported changes in cortisol response to acute stress in socially isolated rainbow trout after 7 days of feeding with dietary Trp, although in the same study no changes in cortisol levels were observed when the experimental feed regime lasted only 3 days (Lepage et al., 2003). To account for such a possible bias in this experiment, those individuals that lacked feed in the GI-tract (in total 10 fish) were omitted from the subsequent data analysis. None of the sampled fish were found to be sexually mature.

The experiment was conducted in accordance with the Norwegian Animal Welfare Act and approved by the Norwegian experimental animals committee (EDU).

2.3. Assays

The concentration of cortisol in the plasma samples was analyzed in ethyl acetate extracts using the radioimmunoassay, according to the protocol by Pieninger and Clark (2001).

For monoamine determination, the hypothalamus was first weighed, thawed on ice and then homogenized in 200 µL of cold sodium phosphate

buffer (pH 7.5) by ultrasonication. Following homogenization, 200 μ l 8% perchloric acid containing 20 ng 3,4-dihydroxybenzylamine (DHBA)/ml was added to the homogenate as an internal standard. These samples were then centrifuged at 10,000 \times g for 10 min at 4 °C after which, the supernatants were used to quantify concentrations of 5-HT and DA as well as their main metabolites 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) by high performance liquid chromatography (HPLC) with electrochemical detection, as described by Overli et al. (1999). The ratios of catabolite to its parent monoamine as well as metabolite concentrations were used as estimations of central serotonergic and dopaminergic activities. These variables are commonly used as measures of monoamine activity in studies investigating the effects of stress and behaviour (Shannon et al., 1986; Summers, 2001). Monoamine content was analyzed by comparison with standard solutions of known concentrations and corrected for recovery of the internal standard using HPLC software (CSW, DataApex Ltd., the Czech Republic).

2.4. Data treatment and statistics

The triplicates for each dietary treatment group were checked for possible differences between tanks using a one-way ANOVA. Tank effects were negligible in all variables, with a residual variance of 3%, and the triplicates were subsequently pooled. The analyses were performed on data within each sampling time (e.g. days after feeding with experimental diet) separately, rather than taking into account all factors at once. None of the data fulfilled the assumptions of normal distribution. However, for the monoamine results, log transformation of data was sufficient to achieve normality. Thus, these data were analyzed using a two-way ANOVA with dietary Trp content and confinement-stress as factors for each sampling time. A Tukey's HSD post-hoc test (for unequal Ns) was performed whenever significant effects were found in the ANOVA. Plasma cortisol levels were analyzed by quantile regression, since this data set deviated from normality despite log-transformation. As preliminary tests showed that fish subjected to confinement exhibited highly significant elevated plasma cortisol levels compared to undisturbed counterparts (quantile regression, $p < 0.0001$), subsequent statistical analysis was carried out on stressed and non-stressed fish separately. The significance level was set at $\alpha = 0.05$ and results on monoamine ratios and cortisol levels are presented as means \pm standard error of the mean (SEM) and medians with range, respectively. All statistics were performed

in Stata 11/SE for Windows (StataCorp, College Station, TX, USA) and Statistica 9 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

3. Results

3.1. Plasma cortisol

Data on plasma cortisol levels in stressed and non-stressed fish at 1, 2 and 10 days following dietary Trp supplementation are shown in Fig. 1. On day 1, non-stressed fish displayed a significant decrease in basal levels of plasma cortisol at moderate dietary Trp doses compared to the group continuously fed control feed (2 \times Trp; $p < 0.51$, 3 \times Trp; $p < 0.01$, 4 \times Trp; $p < 0.71$). By contrast, the results indicated a tendency towards a positive dose-response relationship between dietary Trp and plasma cortisol levels among stressed fish on day 1 post-Trp treatment (2 \times Trp; $p = 0.16$, 3 \times Trp; $p = 0.13$ and 4 \times Trp; $p < 0.11$). On day 2, a similar pattern was observed among stressed fish in which those previously fed 4 \times Trp displayed significantly higher plasma cortisol concentrations (2 \times Trp; $p = 0.79$, 3 \times Trp; $p = 0.72$, 4 \times Trp; $p = 0.04$). In non-stressed fish there were no effects of Trp treatment 2 days after terminating Trp supplementation (2 \times Trp; $p < 0.60$, 3 \times Trp; $p = 0.36$, 4 \times Trp; $p = 0.63$).

At 10 days post-Trp treatment, the effects of diet were observed in both stressed and non-stressed fish. A highly significant dose-dependent decrease in basal levels of cortisol ($p < 0.001$) in 2-, 3- and 4 \times Trp) was detected among non-stressed fish. In stressed fish a curvilinear pattern was observed: a strong tendency towards decreased cortisol levels was evident at 2 \times Trp ($p = 0.02$) and was significantly lower at 3 \times Trp ($p < 0.01$). The cortisol response tended to return towards control levels albeit still being lower than 1 \times Trp, at 4 \times Trp ($p = 0.16$).

3.2. Monoamines and their metabolites in the hypothalamus

Concentrations of hypothalamic 5-HT and DA, and their metabolites are presented in Table 1, along with the metabolite:parent monoamine ratios. On day 1 following dietary Trp treatment, the ANOVA showed significant effects of diet on DOPAC levels ($p < 0.03$) and DOPAC:DA ratios ($p < 0.04$), effects that were independent of confinement stress. There was a trend towards higher DOPAC concentrations and higher DOPAC:DA ratios in fish receiving higher doses of Trp. However, the subsequent post-hoc test did not detect differences between individual treatment groups. A similar trend was observed in 5-HIAA:5-HT ratios

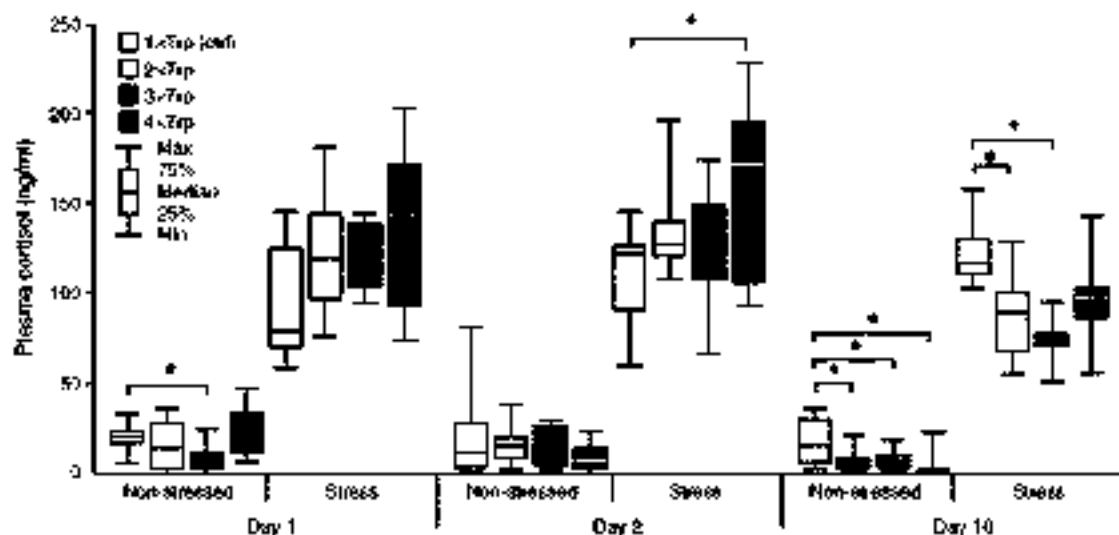


Fig. 1. Plasma concentrations of cortisol at 1, 2 and 10 days post-dietary Trp supplementation. Data are presented as medians with range, significant ($\alpha = 0.05$) \times near-significant ($\alpha = 0.1$) effects are indicated by asterisks and symbols, respectively (quantile regression).

Table 1

Concentrations of monoamines and their metabolites (presented as ng/g tissue) as well as the ratio between these own in the hypothalamus. Data are presented as mean \pm SEM (number of individual), and the *p*-values from the 2-way ANOVA (bold indicates significant effects at the level of $\alpha = 0.05$) are given for each sampling.

		5-HT (ng/g)	5-HIAA (ng/g)	5-HIAA/5-HT	DA (ng/g)	DOPAC (ng/g)	DOPAC/DA
Day 1 after the experimental diet							
Non-stressed	1-Trp	543 \pm 179 (9)	190 \pm 37 (9)	0.50 \pm 0.10 (9)	1062 \pm 138 (9)	17 \pm 5 (9)	0.025 \pm 0.002 (9)
	2-Trp	403 \pm 45 (8)	139 \pm 16 (9)	0.36 \pm 0.04 (8)	937 \pm 106 (8)	11 \pm 3 (8)	0.024 \pm 0.003 (8)
	3-Trp	347 \pm 18 (9)	155 \pm 19 (7)	0.45 \pm 0.05 (9)	973 \pm 61 (9)	10 \pm 3 (9)	0.020 \pm 0.003 (9)
	4-Trp	283 \pm 21 (9)	124 \pm 14 (9)	0.44 \pm 0.04 (9)	897 \pm 65 (9)	17 \pm 12 (9)	0.043 \pm 0.013 (9)
Stressed	1-Trp	302 \pm 25 (9)	142 \pm 10 (9)	0.48 \pm 0.05 (9)	623 \pm 79 (9)	15 \pm 4 (9)	0.020 \pm 0.004 (9)
	2-Trp	449 \pm 50 (9)	178 \pm 25 (9)	0.39 \pm 0.03 (9)	1038 \pm 109 (9)	28 \pm 3 (9)	0.025 \pm 0.003 (9)
	3-Trp	335 \pm 38 (9)	205 \pm 27 (9)	0.64 \pm 0.10 (9)	1015 \pm 86 (9)	15 \pm 5 (9)	0.028 \pm 0.006 (9)
	4-Trp	333 \pm 20 (6)	194 \pm 16 (6)	0.61 \pm 0.08 (6)	1038 \pm 53 (6)	19 \pm 4 (6)	0.038 \pm 0.003 (6)
	Trp:	<i>p</i> < 0.21	<i>p</i> < 0.81	<i>p</i> = 0.07	<i>p</i> = 0.85	<i>p</i> = 0.03	<i>p</i> = 0.04
	Stress:	<i>p</i> = 0.04	<i>p</i> < 0.11	<i>p</i> = 0.04	<i>p</i> = 0.64	<i>p</i> = 0.32	<i>p</i> = 0.44
	Trp \times stress:	<i>p</i> = 0.23	<i>p</i> > 0.16	<i>p</i> = 0.81	<i>p</i> = 0.72	<i>p</i> = 0.63	<i>p</i> = 0.84
Day 10 after the experimental diet							
Non-stressed	1-Trp	345 \pm 25 (9)	129 \pm 12 (9)	0.41 \pm 0.07 (9)	1055 \pm 52 (9)	28 \pm 4 (9)	0.029 \pm 0.006 (9)
	2-Trp	197 \pm 14 (8)	106 \pm 13 (9)	0.57 \pm 0.06 (9)	1068 \pm 16 (9)	11 \pm 2 (9)	0.023 \pm 0.003 (9)
	3-Trp	339 \pm 32 (9)	131 \pm 11 (9)	0.40 \pm 0.04 (9)	1044 \pm 31 (8)	11 \pm 2 (8)	0.021 \pm 0.002 (8)
	4-Trp	359 \pm 26 (8)	146 \pm 20 (9)	0.47 \pm 0.06 (8)	907 \pm 110 (9)	14 \pm 4 (9)	0.049 \pm 0.012 (9)
Stressed	1-Trp	353 \pm 25 (7)	206 \pm 22 (7)	0.59 \pm 0.10 (7)	1115 \pm 51 (7)	10 \pm 2 (7)	0.028 \pm 0.003 (7)
	2-Trp	327 \pm 32 (9)	180 \pm 14 (9)	0.52 \pm 0.06 (9)	1002 \pm 53 (9)	26 \pm 3 (9)	0.028 \pm 0.004 (9)
	3-Trp	332 \pm 30 (9)	174 \pm 22 (9)	0.56 \pm 0.06 (9)	1074 \pm 71 (9)	11 \pm 4 (9)	0.029 \pm 0.003 (9)
	4-Trp	261 \pm 23 (9)	155 \pm 10 (9)	0.57 \pm 0.06 (9)	1063 \pm 36 (9)	15 \pm 4 (9)	0.033 \pm 0.004 (9)
	Trp:	<i>p</i> < 0.87	<i>p</i> > 0.88	<i>p</i> = 0.01	<i>p</i> = 0.49	<i>p</i> = 0.04	<i>p</i> = 0.016
	Stress:	<i>p</i> = 0.69	<i>p</i> = 0.002	<i>p</i> = 0.006	<i>p</i> = 0.25	<i>p</i> = 0.04	<i>p</i> = 0.47
	Trp \times stress:	<i>p</i> = 0.81	<i>p</i> > 0.76	<i>p</i> = 0.76	<i>p</i> = 0.31	<i>p</i> = 0.72	<i>p</i> = 0.18

(*p* = 0.07) but this was not reflected in 5-HT (*p* = 0.21) or 5-HIAA levels (*p* = 0.81). Exposure to confinement stress induced significantly higher 5-HIAA/5-HT ratios (*p* < 0.04), whereas no such an effect was found in brain concentrations of 5-HT (*p* < 0.64), 5-HIAA (*p* = 0.11), DA (0.64), DOPAC (*p* = 0.32), or in DOPAC/DA ratios (*p* = 0.44). The ANOVA also showed that there was no interaction between diet and stress neither in brain levels of 5-HIAA (*p* < 0.16), 5-HT (*p* = 0.23), DA (*p* < 0.22), DOPAC (*p* = 0.63), nor in 5-HIAA/5-HT (*p* = 0.83) or DOPAC/DA ratios (*p* = 0.84).

At day 10, 5-HIAA/5-HT ratios as well as 5-HIAA levels were also significantly elevated as a result of confinement stress (*p* = 0.006 and *p* = 0.002, respectively), regardless of experimental diet. However, the rise in 5-HIAA/5-HT ratios was not reflected in 5-HT-levels (*p* = 0.69). There were no effects of diet on brain levels of 5-HT (*p* = 0.87), 5-HIAA (*p* = 0.88), DA (*p* = 0.49) or 5-HIAA/5-HT ratios (*p* = 0.90). No interaction between stress and diet was observed in brain concentrations of 5-HT (*p* = 0.81), 5-HIAA (*p* = 0.76), DA (*p* = 0.31), DOPAC (*p* = 0.72), 5-HIAA/5-HT (*p* = 0.76) or DOPAC/DA ratios (*p* = 0.18). Brain DOPAC-levels

were significantly affected by both dietary Trp (*p* = 0.04) and confinement stress (*p* = 0.04) although no interaction was detected between these two factors (*p* = 0.72). The post-hoc test revealed that fish on 4-Trp diet displayed significantly higher DOPAC-levels than those fed 2-Trp (Fig. 2, *p* < 0.04). Brain DOPAC/DA ratios were also significantly affected among fish fed elevated dietary Trp, independent of exposure to confinement stress, at 10 days post-experimental feed regime (*p* = 0.003). The post-hoc tests showed that the group on 4xTrp had significantly elevated DOPAC/DA ratios (Fig. 2) as compared to fish on 2-Trp (*p* = 0.01) or 3-Trp (*p* = 0.01).

4. Discussion

The study objective was to elucidate how long the effects of dietary Trp supplementation on stress responsiveness persist in Atlantic salmon post-smolts, when reared in a social environment in seawater. Previous reports in Atlantic cod (Basc et al., in press) and in rainbow trout (Lepage et al., 2002, 2003, 2005a) have all documented acute

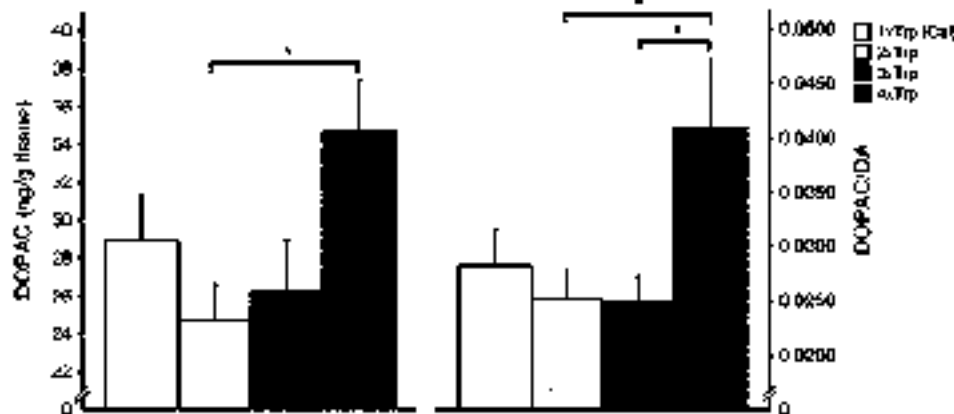


Fig. 2. DOPAC-levels and DOPAC/DA-ratios in the hypothalamus at 10 days post-dietary Trp supplementation. Results are presented by pooling stressed and unstressed fish. Significant effects are indicated by asterisks (2-way ANOVA with Tukey's post-hoc test for unequal N's). Data are shown as mean \pm SEM.

counteractive effects of dietary Trp on post-stress plasma cortisol in socially isolated fish. The results presented here demonstrate that dietary Trp induced both acute stimulatory and long-term inhibitory effects on neuroendocrine stress reactivity in Atlantic salmon, in a dose–response dependent manner.

Introducing rainbow trout to a Trp-enriched feed regimen for 7 days has been shown to induce slight elevations in basal cortisol levels, whereas the same dietary treatment also evoked a suppression in post-stress cortisol response (Lepage et al., 2002). Those effects were observed on the day after feeding the fish with Trp for one week. By contrast, our data indicated an opposite pattern regarding endocrine responsiveness on the same day. Moreover, an elevation in post-stress cortisol levels was also observed at 2 days after dietary Trp among stressed fish in our study. In comparison, Basic et al. (in press) recently found that the suppressive effect on post-stress plasma cortisol levels was present for 1 day, but not at 2 and 6 days following a 7 day Trp-enriched diet regimen in Atlantic cod (*Gadus morhua*). The researchers also reported no acute changes in basal cortisol levels among undisturbed fish in that experiment. At 10 days post-Trp treatment, on the other hand, the effects on plasma cortisol were reversed, and Trp suppressed both basal and post-stress levels of cortisol in a dose dependent manner, according to our data. This is in contrast to previous studies in cod and rainbow trout, suggesting a rather short time-window for the effects of dietary Trp treatment on HPI-axis activity. Previously, Lepage et al. (2003) demonstrated that continuously feeding with Trp-enriched feed resulted in suppressed stress responsiveness after 7 days, but not after 3 or 28 days of Trp treatment in rainbow trout. Since the studies mentioned above were conducted on socially isolated fish, it is possible that the contrasting results presented here are related to differences in social context.

An additional factor contributing to the inconsistent effects of Trp on cortisol reactivity between this study and those conducted on rainbow trout (Lepage et al., 2002, 2003, 2005a,b; Winberg et al., 2007) could be attributed to the fact that the salmon were kept in seawater. Differences in stress responsiveness have been demonstrated in seawater-acclimated coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), which were more responsive to stress in terms of mortality, ion regulatory capacity, plasma levels of cortisol and prolactin, compared to fish kept in freshwater (Avalba et al., 1991; Banton et al., 1985). However, since this is the first study reporting the effects of dietary Trp treatment in smoltified Atlantic salmon, it cannot be excluded that the effects presented here are species-specific.

The elevations in hypothalamic 5-HIAA/5-HT ratios in fish subjected to confinement-stress, both on days 1 and 10 (including 5-HIAA-levels on day 10) after feeding with Trp-supplemented diets, are in line with the general consensus that the 5-HT system is involved in the activation of the neuroendocrine stress response (Winberg and Nilsson, 1993; Winberg et al., 1997). Moreover, Trp treatment tended to elevate the 5-HIAA/5-HT ratio, which is consistent to previous studies in rainbow trout (Lepage et al., 2002, 2003, 2005b) and the general consensus that Trp-enriched feed enhances 5-HT signaling. Furthermore, Trp seemed to elevate DOPAC-levels and DOPAC/DA ratios at 1 day after termination of the Trp treatment period, a pattern which was also apparent after 10 days. This suggests that excess amounts of Trp act stimulatory on DA signaling, lasting for at least 10 days after dietary supplementation. However, the contrasting effect on plasma cortisol response indicates that hypothalamic DA is not directly involved in mediating the effects of Trp on HPI-axis reactivity. Apart from DA and 5-HT, other neurotransmitters/modulators also participate in regulating the HPA/HPI-axis activity (reviewed by Herman and Cullinan, 1997). Further studies are needed to elucidate to what extent they, along with 5-HT and DA, convey the Trp-induced effects on stress responsiveness.

The effects of Trp on DA transmission are consistent with recent findings from our laboratory, showing that treatment with Trp-enriched feed in general, augmented DOPAC/DA ratios to some extent in Atlantic cod (Basic et al., in press). Previous studies in rats have demonstrated

that dietary Trp can affect dopaminergic transmission through the Trp metabolite kynurenic acid. However, the action of this metabolite on DA signaling is mainly inhibitory in rats (Okuno et al., 2011). More studies are needed to investigate if and how this metabolite interacts with the dopaminergic system in fish. Other mechanisms than those related to kynurenic acid may be involved in the interaction between the 5-HT- and DA-systems. For example, treatment with the selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) fluoxetine has been found to reduce DA-transmission in mice (Morelli et al., 2011). Interestingly, dietary Trp-treatment and the SSRI citalopram have been observed to suppress aggression and post-stress plasma cortisol in a similar manner in rainbow trout (Lepage et al., 2005b). This indicates that common mechanisms may be involved in inducing the effects of Trp and SSRI in fish. Further studies are needed to verify if these mechanisms also include those that are affecting central dopaminergic transmission. Moreover, it cannot be ruled out that our results on monoaminergic signaling may be related to the fact that the salmon were fully acclimated to seawater. In addition to structural reorganization in the brain, changes in neurotransmitter levels including DA and 5-HT occur during smoltification (Ebbesson et al., 1996; Storm et al., 1997). During this process, fish change their social behavior from being territorial and highly aggressive towards forming shoals (Hutchison and Avata, 1968). Still, very few studies have addressed the involvement of these monoamines in regulating social behavior and neuroendocrine stress responsiveness among salmonids in the marine environment. Further studies are needed to investigate whether such structural and neurochemical changes are associated with the long-term effects of Trp on plasma cortisol reported in the study presented here.

Hatchery-reared fish can be exposed to frequent and continued periods of stress, resulting in elevations in plasma cortisol levels. Such circumstances may lead to suppression in growth and immune functions of the fish (Ashley, 2007). In aquaculture, Atlantic salmon are hatched and kept in freshwater facilities until smoltification, after which they are transferred to seawater pens for further growth. Transportation is also necessary before slaughter, i.e. from the sea cages to the slaughter facility, sometimes over long distances in well boats. Transportation is a rather intense stressor, involving elements of crowding, novel social context, starvation, and movements. Reducing stress during this transfer-phase could be beneficial in terms of growth performance and welfare of the fish. In this study, we show that Trp supplementation suppresses the cortisol response after exposure to confinement stress at 10 days after the feed regime was terminated in smoltified salmon. Further studies are needed to investigate if dietary Trp treatment reduces the stress associated with aquaculture practices, such as smolt transportation, and to determine whether this improves growth and welfare in farmed salmon.

5. Conclusion

Treatment with Trp-enriched feed for one week resulted in suppressed basal levels of cortisol at 1 and 10 days after the feed regime was terminated, in Atlantic salmon reared in an aquaculture setting. Furthermore, a tendency towards a stimulatory effect on post-stress plasma levels was observed at day 2, an effect which was significant at 4 × Trp at 2 days post-Trp treatment. However, at 10 days post-Trp treatment this pattern was reversed and inhibitory effects of dietary Trp were observed. This demonstrates that the effects of Trp on stress response are time-specific even after termination of dietary pretreatment. In the hypothalamus, DOPAC-levels as well as DOPAC/DA ratios were augmented at the highest Trp dose on days 1 and 10 post-Trp treatment. This suggests that dopaminergic signaling is indirectly involved in suppressing the endocrine stress response. Further studies are needed to determine whether these effects of dietary Trp pretreatment are species-specific, context-dependent and/or related to more general physiological changes associated with smoltification and seawater-adaptation in salmonid fish.

Acknowledgments

This study was funded by BioMar AS, the Norwegian Research Council and the Norwegian School of Veterinary Science. We would like to thank Tom Pottinger for assisting us with the laboratory work and for his input on the manuscript.

References

- Ashley, P.J., 2007. Fish welfare: current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science* 104, 199–235.
- Avella, M., Schreck, C.B., Prasad, P., 1991. Plasma prolactin and cortisol concentrations of stressed coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, in fresh-water or salt-water. *General and Comparative Endocrinology* 81, 21–27.
- Bakke, B.A., Schreck, C.B., Fasting, R.D., Heron-Imagoe, A.R., Fasting, R., 1987. Changes in plasma-cortisol during stress and smoltification in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *General and Comparative Endocrinology* 59, 406–411.
- Bakke, D., Schjelderup, J., Kroghdal, A., von Krogh, K., Nilsson, M., Winberg, S., Meyer, E., Solerød, F., Högland, E. In press. Changes in regional brain monoaminergic activity and respiratory down-regulation in stress response from dietary supplementation with L-tryptophan in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *British Journal of Nutrition* (<http://dx.doi.org/10.1017/S0007114512004305>) (available in 10/2012).
- Chauloff, F., 1993. Physiological-metabolic interactions between stress hormones and central serotonergic systems. *Brain Research Reviews* 18, 1–32.
- Dewan, T.C., 1994. Serotonin and the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *Life Science* 58, 1683–1694.
- Ebbesson, S.O.E., Smith, J., Co, L., Fitzsimon, L.J.B., 1996. Transport a brainless in neurotransmitter levels during a critical period of neural development in rat brain. *Neuroscience Letters* 202, 329–342.
- Elli, T., Wildig, H.V., Lopez-Olmeda, J., Spence, M.T., Ton, I., Overli, U., Mørnes, L.K., 2012. Cortisol and fish welfare. *Fish Physiology and Biochemistry* 38, 161–178.
- Festjens, J.B., Wiersma, R.J., 1997. Brain serotonin control: physiological regulation by plasma neutral amino acids. *Behavioural Obesity Reviews* 5, 377–380.
- Herman, J.P., Cullum, W.E., 1997. Neuroanatomy of stress: central control of the hypothalamic-pituitary-adrenal/cortisol axis. *Trends in Neurosciences* 20, 78–84.
- Högland, E., Balm, P.H.M., Winberg, S., 2006. Smolt-darkening, a possible social signal in subordinate Atlantic cod (*Gadus morhua*): the regulatory role of brain monoamines and pre-pro-melanocortin-derived peptides. *Journal of Experimental Biology* 209, 1711–1721.
- Högland, E., Balm, P.H.M., Winberg, S., 2002. Stimulatory and inhibitory effects of 5-HT_{1A} receptors on adrenocorticotropic hormone and cortisol secretion in a teleost fish, the Arctic char (*Salvelinus alpinus*). *Neuroscience Letters* 324, 195–198.
- Högland, E., Bakke, M.J., Overli, O., Winberg, S., Nilsson, G.E., 2005. Suppression of aggressive behaviour in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) by L-tryptophan supplementation. *Aquaculture* 249, 325–333.
- Högland, E., Sørensen, C., Bakke, M.J., Nilsson, G.E., Overli, O., 2007. Attenuation of stress-induced aversive behaviour in Atlantic cod (*Gadus morhua*) by pre-treatment with dietary L-tryptophan. *British Journal of Nutrition* 97, 780–789.
- Hsu, J.R., Lu, F.J., Su, H.M., Wang, L.S., Tsai, C.L., Hwang, P.F., 2007. Effect of exogenous tryptophan on carbinolamine, survival and growth in juvenile grouper, *Sympterus omidis*. *Aquaculture* 218, 251–261.
- Hutchison, M.J., Kautz, W., 1990. Effect of stressors on the dynamics of aggressive behaviour of four salmonids during the parr-smolt transformation. *Aquaculture* 88, 169–179.
- Johansen, W.K., Atkinson, J.L., Nelson, J.W., Wynn, R.L., 1996. Effect of dietary tryptophan on plasma and brain tryptophan, brain-serotonin, and brain 5-hydroxytryptophan in rainbow-trout. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 7, 49–54.
- Koprowski, S.J., Clark, A.C., van der Meulen, J., Dekker, A., Kupper, J., Korte, B.J., Soukieru, L.L., 2006. Effects of supplemented L-tryptophan on serotonin, cortisol, intestinal integrity, and behaviour in weaning piglets. *Journal of Animal Science* 94, 963–973.
- Lepage, O., Tostmar, A., Winberg, S., 2002. Elevated dietary intake of L-tryptophan counteracts the stress-induced elevation of plasma cortisol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology* 205, 3676–3687.
- Lepage, O., Wikhaug, M., Pottinger, T.G., Winberg, S., 2001. Time-course of the effect of dietary L-tryptophan on plasma cortisol levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology* 206, 3589–3599.
- Lepage, O., Larsson, E.T., Meyer, E., Winberg, S., 2003a. Tryptophan affects both post-smolt cortisol metabolism production and (meta)regulatory changes in exposed and non-exposed rainbow trout. *Journal of Fish Research Board* 38, 764–773.
- Lepage, O., Larsson, E.T., Meyer, E., Winberg, S., 2003b. Serotonin, but not melatonin, plays a role in shaping dopamine-substrate relationships and aggression in Atlantic trout. *Hormones and Behavior* 46, 231–242.
- Maule, A.G., Schreck, C.B., Kautz, W.L., 1987. Changes in the immune systems of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during the parr-to-smolt transformation and after implantation of cortisol. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 44, 161–166.
- Mozzi, E., Moore, H., BebeBo, T.J., Gray, V., Steele, K., Epasto, E., Gingsich, J.A., Anagnostou, M.S., 2011. Chronic 5-HT transporter blockade reduces DR signaling to dorsal-lateral ganglia dysfunction. *Journal of Neuroscience* 31, 15742–15750.
- Molin, P.P., Winberg, S., Nilsson, G.E., Hara, T.J., Bates, J.G., 1997. Effects of L-tryptophan on brain monoamines during parr-smolt transformation of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Neuroscience Letters* 224, 216–218.
- Ohno, A., Fukuzawa, T., Shibata, M., 2011. High-tryptophan diet reduces extracellular dopamine release via kynurenic acid production in rat striatum. *Journal of Neurochemistry* 118, 896–897.
- Overli, O., Harris, C.A., Winberg, S., 1999. Short-term effects of fights for social dominance and the establishment of dominant-subordinate relationships on brain monoamines and cortisol in rainbow trout. *Brain, Behavior and Evolution* 54, 261–275.
- Pottinger, T.G., Carrick, T.R., 2001. Stress responsiveness affects dominant-subordinate relationships in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Hormones and Behavior* 40, 419–427.
- Quaranta, N.J., Cunniff, J.H., Moore, S.E., 1984. A combination of biochemical indexes of 5-hydroxytryptaminergic neuronal activity following electrical stimulation of the dorsal raphe nucleus. *Journal of Neurochemistry* 47, 956–963.
- Sallnäs, R.M., Graham, A., 1998. Relationship between stress-induced increases in medial prefrontal cortical dopamine and plasma corticosterone levels in rats: role of cerebral laterality. *Neuroscience* 84, 81–81.
- Sammars, C.H., 2001. Mechanisms for such and variable responses. *Brain, Behavior and Evolution* 57, 282–292.
- Sammars, C.H., Winberg, S., 2006. Interactions between the neural regulation of stress and aggression. *Journal of Experimental Biology* 209, 4591–4599.
- Sammars, C.H., Sammons, T.R., Moore, M.C., Koppin, W.J., Woolley, S.R., Reynolds, P.J., Högland, E., Watt, M.J., Greenberg, N., 2003. Temporal patterns of lactic monoamine and plasma corticosterone response during social stress. *Neuroscience* 116, 551–553.
- Winberg, S., Nilsson, G.E., 1999. Roles of brain monoamine neurotransmitters in aggressive behaviour and stress reactions, with particular reference to fish. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Pharmacology, Toxicology & Endocrinology* 101, 597–614.
- Winberg, S., Nilsson, G.E., Hylland, P., Söderström, V., Nilsson, G.E., 1997. Serotonin as a regulator of hypothalamic-pituitary-intestinal activity in teleost fish. *Neuroscience Letters* 230, 113–116.
- Winberg, S., Overli, O., Lepage, O., 2001. Suppression of aggression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by dietary L-tryptophan. *Journal of Experimental Biology* 204, 3867–3876.
- Wolke, C.P.B., Serra, M., Horvath, M.A., Urbano, C.C., 2012. Dietary L-tryptophan alters aggression in juvenile mummichog *Fundulus heteroclitus*. *Fish Physiology and Biochemistry* 38, 819–827.

Elevated dietary intake of L-tryptophan counteracts the stress-induced elevation of plasma cortisol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Olivier Lepage, Olof Totanar and Svante Winberg*

Evolutionary Biology Centre, Department of Comparative Physiology, Uppsala University, Norbyvägen 18A, SE-752 36, Sweden

*Author for correspondence (e-mail: Svante.Winberg@ebc.uu.se)

Accepted 21 August 2002

Summary

Juvenile rainbow trout were isolated in individual compartments and allowed to acclimate for 1 week, during which they were fed commercial trout pellets. The feed was then replaced by pelleted feed supplemented with L-tryptophan (TRP) at two, four or eight times the concentration in the commercial feed. Fish were fed these supplemented feeds daily to satiety for 1 week, after which half of the fish were stressed, by lowering the water level for 2 h, while the remaining fish were left undisturbed. In undisturbed fish, supplementary dietary TRP resulted in slightly elevated plasma cortisol levels. In response to the stress, fish that had been fed control feed showed elevated plasma cortisol levels, but fish fed the TRP-supplemented

feed displayed a significant reduction in this stress-induced elevation of plasma cortisol levels. Plasma and brain TRP levels were elevated in fish fed TRP-supplemented feed. TRP is the precursor of the monoamine neurotransmitter serotonin. Brain serotonergic activity was elevated by stress and also tended to be increased by elevated dietary TRP intake. The central serotonergic system is involved in the control of the hypothalamic–pituitary–interrenal axis, the action of serotonin being to stimulate or inhibit this neuroendocrine axis through different projections.

Key words: Serotonin, brain, fish, feed, amino acids, stress, Salmonidae, rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, aquaculture.

Introduction

The organisation and function of the brain serotonergic system seems to be highly conserved across the vertebrate subphylum (Parent et al., 1984). Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) is involved in the regulation of the hypothalamic–pituitary–adrenocortical (HPA) axis in mammals (Chauliol, 1993; Dinan, 1996) as well as in the control of the hypothalamic–pituitary–interrenal (HPI) axis (the teleostean homologue of the HPA axis) in fish (Winberg and Lepage, 1998; Overli et al., 1999; Högland et al., 2000). In several studies, the ratio of 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA, the major 5-HT metabolite) to 5-HT brain concentrations has been found to correlate with plasma levels of cortisol, suggesting that the action of brain 5-HT on the HPI axis is stimulatory (Overli et al., 2000; Högland et al., 2000; Winberg and Lepage, 1998). Moreover, treatment with 8-OH-DPAT, a selective 5-HT_{1A} receptor agonist, elevates plasma levels of cortisol in cannulated rainbow trout (Winberg et al., 1997). The role of the brain 5-HT system in the control of the HPI axis is, however, not clear. Brain serotonergic pathways in mammals are important when coping with stress, not only by initiating the adrenocortical stress response but also terminating it (Markus et al., 2000b). The brain 5-HT system is not a unitary system and, in mammals, 5-HT pathways terminating in the hypothalamic paraventricular nucleus stimulate HPA axis activity, whereas those terminating in the

hippocampus inhibit it (Jacobson and Snpolsky, 1991; Deakin, 1991; Deakin and Graeff, 1991; Mao and Metzger, 1995; Summers et al., 1998; Markus et al., 2000b).

Serotonin is synthesized from the essential amino acid L-tryptophan (TRP), and the first and rate-limiting step in the biosynthesis of 5-HT is the hydroxylation of TRP to 5-hydroxytryptophan (5-HTP). Since the enzyme tryptophanhydroxylase (TPH), catalysing the hydroxylation of TRP, does not seem to be saturated by TRP *in vivo*, the rate of this reaction appears to be restricted by TRP availability both in mammals (for a review, see Baulieu-Biber, 1993) and in teleost fish (Aktegunde et al., 1998, 2000; Winberg et al., 2001). Elevated dietary intake of TRP has been reported to result in increased brain levels of TRP and elevated rates of 5-HT synthesis and metabolism (Johnston et al., 1990; Aktegunde et al., 1998, 2000; Winberg et al., 2001). In mammals, increased fractional release of 5-HT following elevated dietary intake of TRP has been confirmed using microdialyses and *in vivo* voltametry (for a review, see Baulieu-Biber, 1993).

Serotonin seems to inhibit aggressive behaviour in all vertebrates, and the fact that elevated dietary intake of TRP suppresses aggressive behaviour in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Winberg et al., 2001) suggests that elevated dietary intake of TRP in fish also results in increased synaptic 5-HT release.

The carrier transporting TRP across the blood-brain barrier is non-specific, also transporting other large neutral amino acids (LNAA; i.e. tyrosine, phenylalanine, leucine, isoleucine, valine). Brain levels of TRP will thus not only depend on plasma levels of TRP, but also on plasma levels of other LNAA competing for the same carrier (Beadle-Biber, 1993; Aldeguinde et al., 1998, 2000). However, Aldeguinde et al. (2000) obtained results suggesting that the competition between TRP and other LNAA for uptake into the brain is less important in rainbow trout than in mammals. One reason for this could be that the total plasma pool of TRP is directly available for uptake to the brain, since TRP is largely found in the free state in rainbow trout plasma (Rozas et al., 1990). In mammals, on the other hand, TRP in plasma is primarily bound to albumin, and only the small fraction of free TRP is directly available for uptake into the brain.

The fact that TRP is primarily albumin-bound in blood plasma of mammals spares it from insulin-mediated uptake by muscle, and as a consequence, a meal rich in carbohydrate will increase brain 5-HT synthesis by inducing insulin secretion, which lowers the blood concentration of LNAA other than TRP (Fenstrom, 1985). Markus et al. (2000b) found that a carbohydrate-rich, protein-poor (CR/PP) food diminished the depressive mood and cortisol response to controllable as well as uncontrollable laboratory-induced stress in highly stress-prone human subjects. Assuming that the central 5-HT system is involved, Markus et al. (2000b) hypothesised that the effect of CR/PP food on the stress-induced cortisol response in stress-prone subjects is mediated by a stimulation of the 5-HT pathway connecting the raphe nucleus to the hippocampus, which inhibits HPA activation (Deskin, 1991; Deskin and Greff, 1991).

The aim of the present study was to explore whether a stimulation of the brain 5-HT system by dietary supplementation of TRP affects plasma cortisol concentrations in stressed and non-stressed fish. To this end, isolated juvenile rainbow trout were fed foods containing different levels of TRP for 7 days, after which they were sampled directly or subjected to a standardised stressor.

Acute stress elevates brain TRP concentrations both in mammals (Cuzon et al., 1972; Dunn, 1988) and teleost fish (Winberg and Nilsson 1993a), an effect that at least in mammals appears to be mediated by a stress-induced elevation of sympathetic activity and circulating plasma catecholamines (Dunn and Welch, 1991). As activation of the sympathetic system stimulates lipolysis, resulting in elevated plasma levels of non-esterified fatty acids, competing with TRP for binding to albumin and thus elevating the plasma pool of free TRP available for uptake into the brain (reviewed by Chazotte, 1993). Sympathetic activation may also increase brain TRP uptake by affecting the permeability of the blood-brain barrier (Chazotte, 1993). The mechanisms mediating the stress-induced elevation of brain TRP levels in rainbow trout, where TRP is not transported in the plasma bound to albumin, are not known.

In order to further clarify the effects of stress on TRP uptake

to the brain, plasma and brain levels of LNAA other than TRP were also analysed in the present study.

Materials and methods

Fish

Experimental fish were juvenile (2-year-old) rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum), weighing 98.8 ± 47.9 g (mean \pm s.d., $N=50$). Prior to the experiment, the fish were kept indoors in a 1 m³ holding tank at a density of approximately 0.02 kg l⁻¹ for more than 1 month. The light/dark regime (see below) was continuously and automatically adjusted to the conditions at latitude 51°N. When in the holding tank, fish were hand-fed with commercial trout pellets (Ewos ST40) at 1–2% of the body mass per day.

Experimental protocol

The experiment was performed in eight 750 l glass aquaria, continuously supplied with aerated Uppsala tapwater (0.8 l min⁻¹, 8–10°C). Light (12 h:12 h light:dark) was provided by two 20 W warm white fluorescent tubes placed 100 mm above the water surface. Each aquarium was divided into four individual 65.5 l compartments by removable PVC walls. At the start of the experiment, fish were selected from the holding tank, weighed and transferred to individual, visually isolated, compartments within the experimental aquaria. The fish were kept visually isolated and allowed to acclimate to the experimental environment for 1 week, during which they were hand-fed commercial trout pellets (Ewos ST40) once a day to satiation. Food intake of individual fish was quantified by counting the number of pellets consumed. For quantification of food intake, an individual fish was hand-fed with one pellet at the time until it rejected three pellets. Pellets not consumed were removed after feeding. Following this week of acclimation, commercial feed was exchanged for an experimental feed, supplemented with TRP at a level corresponding to two (2% feed), four (4% feed) or eight (8% feed) times the TRP content of the commercial feed, but otherwise identical to this feed (Table 1). Control fish received feed that was not supplemented with TRP (1% feed). Fish were fed once a day to satiation and individual food intake was quantified (as described above). After receiving TRP-supplemented feed for 1 week, half of the fish in each group were exposed to a standardised stressor by lowering the water level until the dorsal fin of the fish was above the water surface. Following 2 h of exposure to this stressor, fish were killed (see below), and blood and brain tissues collected. Blood samples and brain tissue were also collected from undisturbed fish, fed control feed (1% feed) or feed supplemented with TRP (2%, 4% or 8% feed) and held visually isolated during the experimental period.

Blood and brain tissue sampling

Following stress exposure, the fish were anaesthetised (500 mg l⁻¹ ethyl-m-aminobenzoate methanesulphonate) and blood (approximately 3 ml) was collected from the caudal

Table 1. Concentration of large neutral amino acids in experimental feeds

Feed	Amino acids ($\mu\text{g } 100\text{g}^{-1}$)					
	Tyrosine	Valine	Isoleucine	Leucine	Phenylalanine	Tryptophan
1x	1.44	2.13	1.84	3.30	1.87	0.44
2x	1.41	2.11	1.82	3.27	1.86	0.95
4x	1.39	2.05	1.77	3.19	1.82	1.84
8x	1.40	2.05	1.75	3.17	1.78	3.57

The feeds were produced from the same batch of standard feed (Ewos ST40) but the 2x, 4x and 8x feeds were supplemented with L-tryptophan to a level corresponding to two (2x), four (4x) and eight (8x) times the amount of tryptophan in the non-supplemented standard feed (1x feed).

vasculature, using a syringe pre-treated with heparin. Blood samples were rapidly transferred to Eppendorf tubes and centrifuged at 1500g for 10 min at 4°C. The blood plasma was then separated, divided into samples, frozen on dry ice and stored at -80°C . Following blood sampling, the fish were killed by decapitation, and the brain was rapidly removed (within 2 min) and divided into telencephalon (excluding olfactory bulbs), hypothalamus (excluding the pituitary gland), optic tectum, cerebellum and brain stem (including the medulla and part of the spinal cord). Each brain part was wrapped into aluminium foil, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C .

Assays

The frozen brain samples were homogenised in 0.4 mol l^{-1} ice-cold perchloric acid (PCA) containing 0.2% EDTA and 40 ng ml^{-1} epinine (desoxyepinephrine, the internal standard), using a Potter-Elvehjem homogeniser (optic tectum, cerebellum and brain stem) or an MSE 800 W ultrasonic disintegrator (telencephalon and hypothalamus).

Brain levels of 5-HT and 5-HIAA were quantified using high-performance liquid chromatography (HPLC) with electrochemical detection, as described by Överhøj et al. (1999). Plasma and brain levels of TRP were analysed using the same HPLC system with a mobile phase consisting of 75 mmol l^{-1} sodium phosphate in deionized water containing 15% methanol and brought to pH 3.1, and an oxidation potential of 600 mV (Winberg et al., 2001). Plasma samples used for TRP analysis were deproteinized and extracted in 0.4 mol l^{-1} PCA containing 0.2% EDTA.

The amount of other LNAA was measured using HPLC and fluorimetric detection of the derivative formed between the amine and naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde (NDA), as described by de Mounay et al. (1987). The derivatization consisted of adding 50 μl of brain or plasma extract to 200 μl of borate buffer (0.1 mol l^{-1} , pH 10.0) followed by the addition of 50 μl of sodium cyanide (25 mmol l^{-1}) and 200 μl NDA (10 mmol l^{-1}). After a reaction time of 15 min, the reaction mixture was analyzed by gradient-elution HPLC. The HPLC apparatus consisted of a multiple solvent delivery system (CM 4000, LDC/Milton Roy, Riviera Beach, USA), a refrigerated autoinjector (CMA/2000, Carnegie Medicin, Stockholm, Sweden), a Nucleosil RP-18 column (3 μm particle size, 0.4 cm i.d. x 10 cm length; Duren, Germany), and a JASCO FP-920

fluorescence detector (JASCO Corporation, Tokyo, Japan) set at excitation/emission wavelengths of 420/490 nm. The mobile phase was delivered at 1 ml min^{-1} and consisted of 50 mmol l^{-1} potassium phosphate in deionized water containing 10% tetrahydrofuran pH 6.8 (solvent A) or 55% acetonitrile and 10% methanol pH 6.8 (solvent B). A linear gradient from 100% solvent A/0% solvent B to 40% solvent A/60% solvent B over a 60 min period was used. Samples were analysed by comparison with standard solutions of known concentrations, and corrected for recovery of the internal standard (chlorophenylalanine, 10 mmol l^{-1}) using the HPLC software BOKWIN (FMPS developpements, France).

Cortisol analysis was performed directly on rainbow trout plasma without extraction, using a validated radioimmunoassay (RIA) modified from Olsen et al. (1992), as described by Winberg and Lepage (1998).

Statistics

All data are presented as means \pm S.E.M. Effects of feed and treatment (stress versus non-stress) were examined using two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the least significant difference (LSD) *post-hoc* test. Correlations were tested using Spearman rank correlation coefficients. All statistical analyses were performed using STATISTICA statistical software.

Results

Feed intake

During acclimation to the experimental aquaria, food intake gradually increased to reach a constant level after 7 days (0.988 ± 0.070 of body mass). When switching to experimental feed (control feed (1x feed) as well as feed supplemented with TRP (2x, 4x and 8x feeds)), food intake remained at the same level as observed for standard feed at the end of the acclimation period. There was no difference in food intake between fish receiving control feed and fish fed feed supplemented with 2x, 4x and 8x TRP (Fig. 1).

Blood plasma TRP, LNAA and cortisol levels

Stressing the fish by lowering the water levels in the aquaria had a significant effect on plasma [cortisol] ($F_{1,41}=5.83$, $P=0.0204$): fish subjected to stress showed elevated plasma

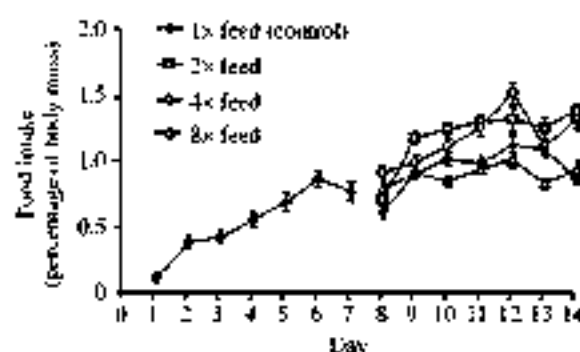


Fig. 1. Food intake, as percentage of body mass, of isolated juvenile rainbow trout after being transferred to observation aquaria. On day 7, the commercial trout feed was exchanged for feeds supplemented with L-tryptophan to a level corresponding to two (2x, open squares), four (4x, open circles), or eight (8x, open triangles) times of that of the non-supplemented control feed (1x, filled triangles). Values are means \pm s.e.m. from 5–7 individuals.

[cortisol] compared to undisturbed fish (Fig. 2). The stressed fish fed control feed displayed significantly higher plasma [cortisol] ($P=0.0002$) than non-stressed controls. There was no significant effect of feeding TRP-feed on plasma cortisol levels but there was a significant interaction between treatment (stress versus non-stress) and feed ($F_{3,41}=3.96$, $P=0.0144$). Basal plasma [cortisol] was elevated after feeding the fish TRP-supplemented feed, and non-stressed fish fed 2x, 4x and 8x TRP-feed showed significantly higher plasma [cortisol] than non-stressed fish fed control feed ($P=0.0416$, $P=0.0288$, $P=0.0071$, respectively) (Fig. 2). By contrast, stressed fish fed 4x TRP-feed displayed significantly lower plasma [cortisol] than stressed fish fed control feed ($P=0.0357$). Interestingly, in fish fed 4x and 8x TRP-feed, stress did not result in any significant elevation of plasma [cortisol] (Fig. 2).

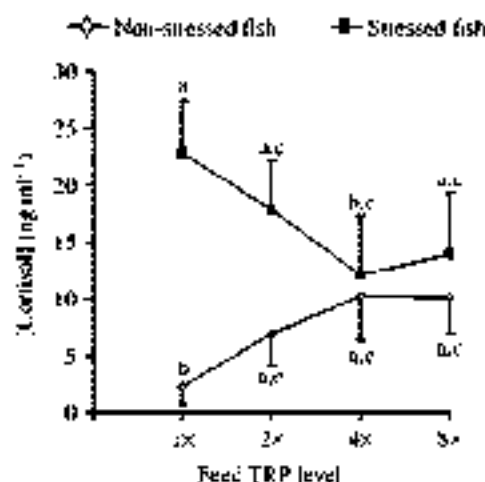


Fig. 2. Plasma levels of cortisol in isolated juvenile rainbow trout fed feeds supplemented with L-tryptophan to a level corresponding to two (2x), four (4x) and eight (8x) times the L-tryptophan content of the non-supplemented control feed (1x). Stressed fish (filled squares) were exposed to a standardized stressor (lowering the water level), whereas non-stressed fish were kept undisturbed (open triangles). Different letters indicate a significant difference at the $P<0.05$ level (LSD *post-hoc* test). Values are means \pm s.e.m. from 5–7 individuals.

Dietary TRP supplementation had an effect on plasma [TRP] ($F_{3,39}=11.21$, $P<0.0001$), plasma [TRP] increasing with increasing feed TRP levels (Table 2). Since elevated dietary TRP caused an increased plasma [TRP] without affecting [LNAAs] in the plasma, feeding the fish TRP-supplemented feed had a significant effect on plasma [TRP]/[LNAAs] ratios ($F_{3,39}=10.24$, $P<0.0001$) (Table 2). Stress had no significant effect on [TRP], [LNAAs] or [TRP]/[LNAAs] in the plasma (Table 2). Stress or dietary TRP did not have significant effects on the plasma concentration of individual LNAAs, other than

Table 2. Effect of dietary L-tryptophan (TRP) and stress on the plasma concentration of TRP and large neutral amino acids (LNAAs), and ratios of TRP to LNAAs concentrations in blood plasma of rainbow trout

Feed	Treatment	Plasma		
		[TRP] (ng ml ⁻¹)	[LNAAs] (ng ml ⁻¹)	[TRP]/[LNAAs]
1x	Non-stressed	0.06 \pm 0.005 ^a	24.44 \pm 3.59 ^a	0.0024 \pm 0.0005 ^a
	Stressed	0.06 \pm 0.03 ^a	24.33 \pm 5.59 ^a	0.0025 \pm 0.0002 ^a
2x	Non-stressed	0.12 \pm 0.20 ^a	21.59 \pm 4.84 ^a	0.0054 \pm 0.0007 ^b
	Stressed	0.09 \pm 0.018 ^b	34.09 \pm 11.34 ^b	0.0027 \pm 0.0012 ^a
4x	Non-stressed	0.44 \pm 0.17 ^b	21.71 \pm 5.39 ^a	0.0202 \pm 0.0032 ^b
	Stressed	0.49 \pm 0.18 ^{ab}	39.59 \pm 21.59 ^b	0.0124 \pm 0.0110 ^b
8x	Non-stressed	0.72 \pm 0.18 ^b	33.98 \pm 14.89 ^b	0.0214 \pm 0.0050 ^b
	Stressed	1.02 \pm 0.28 ^b	19.54 \pm 2.22 ^a	0.0521 \pm 0.0180 ^b

Fish were fed feeds supplemented with TRP to a level corresponding to two (2x), four (4x) and eight (8x) times the TRP content of non-supplemented control feed (1x) for 7 days.

Stressed fish were exposed to a standardized stressor (lowering the water level); controls were undisturbed fish that were kept isolated.

Different superscript letters indicate significant difference at the level of $P<0.05$ (LSD-test).

TRP (i.e. leucine, isoleucine, phenylalanine, tyrosine or valine; data not shown).

Brain [TRP], [LNAAs], [5-HIAA] and [5-HT], and brain [5-HIAA]/[5-HT] ratios

Stress had a significant effect on [TRP] in the optic tectum ($F_{1,9}=7.68$, $P=0.0085$) and brain stem ($F_{1,30}=4.24$, $P=0.0463$), stressed fish showing elevated [TRP] (Fig. 3C,D). Moreover, feeding the fish TRP-supplemented feed had a significant effect on [TRP] in the telencephalon ($F_{1,30}=2.88$, $P=0.0492$), hypothalamus ($F_{1,30}=4.60$, $P=0.0074$) and optic tectum ($F_{1,30}=2.30$, $P=0.0085$) (Fig. 3A-C). TRP supplementation resulted in elevated [TRP] in these brain areas and a similar but non-significant trend ($F_{1,30}=0.268$, $P=0.0605$) was also observed in brain stem (Fig. 3D). Stressed fish fed 4x ($P=0.0245$) and 8x TRP-feed ($P=0.0243$) displayed significantly higher telencephalic [TRP] than stressed fish fed control feed (Fig. 3). Similarly, in the hypothalamus, brain stem and optic tectum [TRP] was significantly higher in stressed fish fed 8x TRP-feed ($P=0.0079$, $P=0.0103$, $P=0.012$, respectively) than in stressed fish fed control feed (Fig. 3B-D). Moreover, in the hypothalamus, undisturbed fish fed 8x TRP-feed showed higher [TRP] than undisturbed fish fed control feed ($P=0.0196$) (Fig. 3B). In optic tectum, stressed fish fed 8x TRP-feed had significantly higher [TRP] than non-stressed fish fed 8x TRP-feed ($P=0.0301$) (Fig. 3C).

Brain [TRP]/[LNAAs] ratios were not significantly affected by stress or dietary TRP in any part of the brain (Table 3). Similarly, there were no significant effects of stress or dietary TRP on brain [LNAAs] (Table 3), or on the concentration of individual LNAAs, other than TRP (i.e. leucine, isoleucine, phenylalanine, tyrosine or valine; data not shown).

Highly significant correlations were found between plasma [TRP] and [TRP] in the telencephalon ($r_s=0.45$, $P=0.0027$), hypothalamus ($r_s=0.52$, $P=0.0006$), brain stem ($r_s=0.44$, $P=0.0033$) and optic tectum ($r_s=0.39$, $P=0.0104$). Similar significant correlations were also observed between plasma [TRP]/[LNAAs] ratios and [TRP] in telencephalon ($r_s=0.71$, $P=0.0016$), hypothalamus ($r_s=0.68$, $P=0.0005$), brain stem ($r_s=0.69$, $P=0.0135$), and optic tectum ($r_s=0.78$, $P=0.0236$).

[5-HT] was not affected by stress or dietary TRP supplementation in any part of the brain (Table 3).

Stress had a significant effect on [5-HIAA] in the telencephalon ($F_{1,17}=16.82$, $P=0.0007$), hypothalamus ($F_{1,30}=16.94$, $P=0.0002$), and brain stem ($F_{1,30}=2.28$, $P=0.0366$), and a similar but non-significant trend was observed in the optic tectum ($F_{2,30}=3.17$, $P=0.0876$) (Table 3). In each of these brain parts, stressed fish displayed elevated [5-HIAA] as compared to undisturbed fish. However, hypothalamic [5-HIAA] levels were significantly increased only in stressed fish fed control feed ($P=0.0425$) (Table 3).

Stress had a significant effect on [5-HIAA]/[5-HT] ratios in

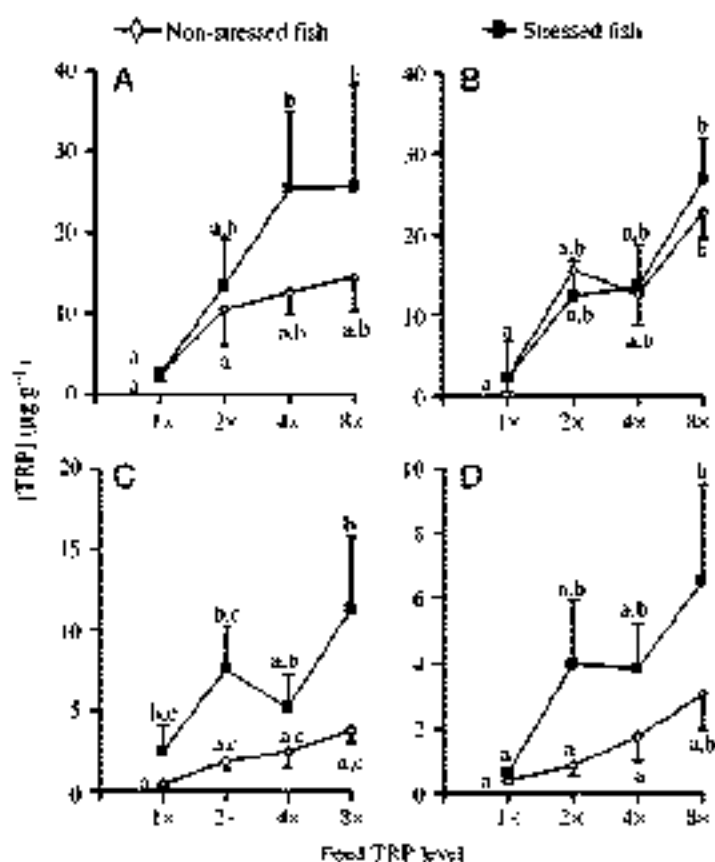


Fig. 3. The amount of L-tryptophan (TRP) in the telencephalon (A), hypothalamus (B), optic tectum (C) and brain stem (D) of isolated juvenile rainbow trout fed feeds supplemented with L-tryptophan to a level corresponding to two (2x), four (4x) and eight (8x) times the L-tryptophan content of the non-supplemented control feed (1x). Stressed fish (filled square) were exposed to a standardised stressor (lowering the water level); non-stressed fish were undisturbed fish kept isolated (open triangle). Different letters indicate a significant difference at the $P < 0.05$ level (LSD *post-hoc* test). Values are means \pm S.E.M. from 5–7 individuals.

the telencephalon ($F_{1,17}=15.67$, $P=0.0004$), hypothalamus ($F_{1,30}=8.85$, $P=0.0049$) and brain stem ($F_{1,30}=1.20$, $P=0.0021$) (Fig. 4A,B,D), but there was no significant effect in the optic tectum (Fig. 4C). In each of these brain parts, stressed fish displayed elevated [5-HIAA]/[5-HT] ratios as compared to undisturbed fish. In the brain stem, stressed fish fed control feed showed an elevation of [5-HIAA]/[5-HT] ratios as compared to undisturbed controls ($P=0.0130$). Telencephalic [5-HIAA]/[5-HT] ratios were significantly elevated in stressed fish fed 2x and 8x TRP-feed compared to undisturbed controls fed 2x and 4x TRP-feed ($P=0.0339$ and $P=0.0096$, respectively). There was no significant effect of elevated dietary TRP levels on the brain [5-HIAA]/[5-HT] ratio, but there was a tendency towards an elevated [5-HIAA]/[5-HT] ratio in all brain areas of fish fed TRP-supplemented feed (Fig. 4).

A correlation was found in stressed fish between [TRP]

Table 3 Effect of dietary L-tryptophan (TRP) and stress on the concentration of large neutral amino-acids (LNAA) and ratios of TRP to LNAA concentrations in the plasma and brain, and concentration of serotonin (5-HT) and its metabolite 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) in the brain of rainbow trout

Feed	Treatment	Telencephalon				Hypothalamus			
		[LNAA] (ng g ⁻¹)	[TRP]/[LNAA]	[5-HIAA] (ng g ⁻¹)	[5-HT] (ng g ⁻¹)	[LNAA] (ng g ⁻¹)	[TRP]/[LNAA]	[5-HIAA] (ng g ⁻¹)	[5-HT] (ng g ⁻¹)
1x	Non-stressed	1.75±0.41 ^a	0.0100±0.0009 ^a	35±19 ^a	1470±420 ^a	1.37±0.30 ^a	0.0110±0.0005 ^a	61±13 ^a	748±84 ^a
	Stressed	2.24±0.39 ^a	0.0014±0.0004 ^a	541±95 ^b	1318±138 ^b	1.91±0.59 ^a	0.0014±0.0004 ^a	174±46 ^b	1008±133 ^b
2x	Non-stressed	2.47±1.09 ^a	0.0060±0.0017 ^a	348±37 ^a	942±81 ^a	1.67±0.54 ^a	0.0160±0.0093 ^a	81±18 ^{a,b}	969±1.7 ^a
	Stressed	1.97±0.42 ^a	0.0120±0.0075 ^a	544±37 ^b	997±99 ^a	2.16±0.71 ^a	0.0120±0.0075 ^a	187±43 ^b	1308±13 ^b
4x	Non-stressed	1.92±0.24 ^a	0.0066±0.0012 ^a	478±65 ^{a,b}	1282±144 ^a	1.31±0.47 ^a	0.0200±0.012 ^a	104±12 ^{a,b}	1064±89 ^a
	Stressed	1.94±0.52 ^a	0.0130±0.0061 ^a	652±40 ^b	1168±118 ^a	1.47±0.24 ^a	0.0120±0.0078 ^a	298±70 ^a	1424±169 ^a
8x	Non-stressed	2.66±0.64 ^a	0.0062±0.0025 ^a	459±32 ^{a,b}	1063±59 ^a	2.84±0.35 ^a	0.0061±0.0026 ^a	181±46 ^{b,c}	1012±160 ^a
	Stressed	1.63±0.19 ^a	0.0131±0.0061 ^a	628±66 ^b	1052±73 ^a	1.72±0.27 ^a	0.0150±0.0064 ^a	233±34 ^{b,c}	1303±2.0 ^a

Feed	Treatment	Brain stem				Optic tectum			
		[LNAA] (ng g ⁻¹)	[TRP]/[LNAA]	[5-HIAA] (ng g ⁻¹)	[5-HT] (ng g ⁻¹)	[LNAA] (ng g ⁻¹)	[TRP]/[LNAA]	[5-HIAA] (ng g ⁻¹)	[5-HT] (ng g ⁻¹)
1x	Non-stressed	0.39±0.09 ^a	0.0100±0.0095 ^a	75±22 ^{a,c}	220±38 ^a	0.23±0.08 ^a	0.0110±0.0095 ^a	66±19 ^a	264±40 ^a
	Stressed	0.46±0.05 ^a	0.0015±0.0004 ^a	125±23 ^{b,c}	262±48 ^a	0.63±0.12 ^a	0.0046±0.0034 ^a	121±20 ^a	349±64 ^a
2x	Non-stressed	0.42±0.11 ^a	0.0036±0.0015 ^a	54±8 ^a	163±19 ^a	0.50±0.23 ^a	0.0052±0.0018 ^a	51±6 ^a	251±35 ^a
	Stressed	0.40±0.08 ^a	0.0140±0.0090 ^a	88±14 ^{a,b}	192±13 ^a	0.50±0.27 ^a	0.0150±0.0082 ^a	36±11 ^a	264±19 ^a
4x	Non-stressed	0.33±0.07 ^a	0.0170±0.0130 ^a	87±12 ^{a,c}	212±19 ^a	0.51±0.10 ^a	0.0052±0.0013 ^a	85±20 ^a	282±39 ^a
	Stressed	0.31±0.05 ^a	0.0180±0.0081 ^a	113±20 ^{a,c}	225±31 ^a	0.54±0.08 ^a	0.0150±0.0078 ^a	92±17 ^a	289±22 ^a
8x	Non-stressed	0.34±0.04 ^a	0.0093±0.0043 ^a	114±29 ^{a,c}	291±73 ^a	0.55±0.05 ^a	0.0078±0.0024 ^a	108±26 ^a	343±80 ^a
	Stressed	0.33±0.06 ^a	0.0150±0.0060 ^a	149±27 ^a	301±50 ^a	0.55±0.07 ^a	0.0220±0.0084 ^a	107±30 ^a	339±68 ^a

Fish were fed feeds supplemented with TRP to a level corresponding to two (2x), four (4x), and eight (8x) times the TRP content of non-supplemented control feed (1x) for 7 days.
 Stressed fish were exposed to a standardised stressor (lowering the water level), whereas controls are undisturbed fish that were kept isolated.
 Different superscript letters indicate significant difference at the *P*-0.05 level (LSD-test).

and [5-HIAA]/[5-HT] only in the telencephalon ($r_s=0.53$, $P=0.0097$).

Discussion

The present study reveals a significant interaction between dietary TRP supplementation and stress, reflecting the attenuation by TRP of the stress-induced elevation of plasma [cortisol]. At the highest levels of TRP supplementation, dietary TRP more-or-less abrogated the increase in plasma [cortisol] induced by stress. However, increased dietary TRP tended to elevate basal levels of plasma cortisol in non-stressed fish. As will be discussed below, these effects of dietary TRP could both be mediated by the brain 5-HT system, TRP being the amino acid precursor of 5-HT. Still, feeding the fish TRP-supplemented feed for 7 days only resulted in a small, not quite significant, elevation of brain [5-HIAA] and [5-HIAA]/[5-HT] ratios. However, in the study by Winberg et al. (2003), the lowest level of dietary supplementation of TRP (8.33 mg TRP g⁻¹ dry feed), which was approximately fourfold higher than the highest dose in the present study, also had only

small effects on brain [5-HIAA] and [5-HIAA]/[5-HT] ratios in fish fed this feed for 7 days, but pronounced effects on aggressive behaviour.

In accordance with previous studies, stress resulted in elevated brain [5-HIAA]/[5-HT] ratios (Winberg and Nilsson, 1993b; Winberg and Lepage, 1998; Overli et al., 1999; Höglund et al., 2000). The central 5-HT system has been suggested to stimulate the HPA axis, and Winberg et al. (1997) showed that treatment with 8-OH-DPAT, a specific 5-HT_{1A} receptor agonist, results in a dose-dependent elevation of plasma [cortisol] in dorsal aorta-cannulated rainbow trout. In mammals, 5-HT terminals make synaptic contact with corticotropin-releasing hormone immunoreactive neurons within the hypothalamic paraventricular nucleus (Lipnitz et al., 1987), and treatment with 5-HT precursors, such as TRP or 5-HTP, as well as 5-HT receptor agonists, has been reported to stimulate HPA axis activity, elevating plasma levels of glucocorticoids (Chaouloff, 1993). Thus, the elevation of plasma [cortisol] in non-stressed fish fed TRP-supplemented feed observed in the present study could well have been mediated by a stimulation of the brain 5-HT system.

In this light, the observation that supplementary dietary TRP attenuated the stress-induced elevation of plasma [cortisol] may seem contradictory. One explanation for this effect could of course be elevated negative feedback as a result of increased basal plasma [cortisol], as indicated by elevated plasma [cortisol] in non-stressed fish receiving TRP-supplemented feed. However, even though significant, the elevation of plasma [cortisol] in non-stressed fish fed TRP-supplemented feed was small, suggesting that other mechanisms are also involved in mediating the effects of TRP on stress responsiveness.

The facilitating effects of 5-HT agents on plasma cortisol concentrations may not be in conflict with the observation that, under acute stress, 5-HT activity could improve ability to cope with stress and contribute to reducing a cortisol response (Markus et al. 2000b; Höglund et al. 2002). The serotonergic system is not a unitary system and different 5-HT pathways seem to be involved in both initiating and terminating the adrenocortical stress response in mammals (Deakin and Grieff, 1991; Grieff et al. 1996). For instance, 5-HT pathways terminating in the hippocampus are believed to inhibit HPA axis activity (Summers et al. 1998; Markus et al. 2000b). Recently, Höglund et al. (2002) reported that treatment with the 5-HT_{1A} agonist, 8-OH-DPAT, elevates plasma [cortisol] in undisturbed Arctic charr *Salvelinus alpinus*, whereas the same drug, if administered in connection with stress, suppresses the stress-induced elevation of plasma [cortisol].

Moreover, treatments elevating plasma [TRP] and/or [TRP]/[LNAA] ratios have been reported to counteract stress-induced elevations of plasma cortisol in mammals (Mornéde and Dantzer, 1979), including humans (Markus et al. 1998, 1999, 2000a,b). For instance, in pigs preloaded with 50–200 mg kg⁻¹ TRP, activation of the HPA axis in response to the experience of an unfamiliar environment, in combination with unavoidable shocks, is decreased (Mornéde and Dantzer, 1979). Moreover, carbohydrate-rich, protein-poor food, which causes an elevation of plasma [TRP]/[LNAA] ratios, prevents the elevation of plasma cortisol induced by uncontrollable (Markus et al. 1998) and controllable stress (Markus et al. 1999) in stress-prone human subjects. Similarly, a diet enriched in α -lactalbumin, a TRP-rich protein, reduces depressive mood and plasma cortisol concentrations in stress-prone subjects under acute stress (Markus et al. 2000a).

In a recent study we showed that dietary supplementation of TRP for 7 days results in an inhibition of aggressive behaviour in rainbow trout, whereas 3 days of TRP supplementation have no effect on aggressive behaviour (Winberg et al. 2001). Since the effect of elevated dietary TRP intake on 5-HT synthesis and release could be expected to be very rapid, other mechanisms are likely to be involved in mediating effects of elevated dietary TRP on aggressive behaviour, and possibly also in mediating the effects of TRP on stress responsiveness, since in the present study the fish were fed TRP-supplemented

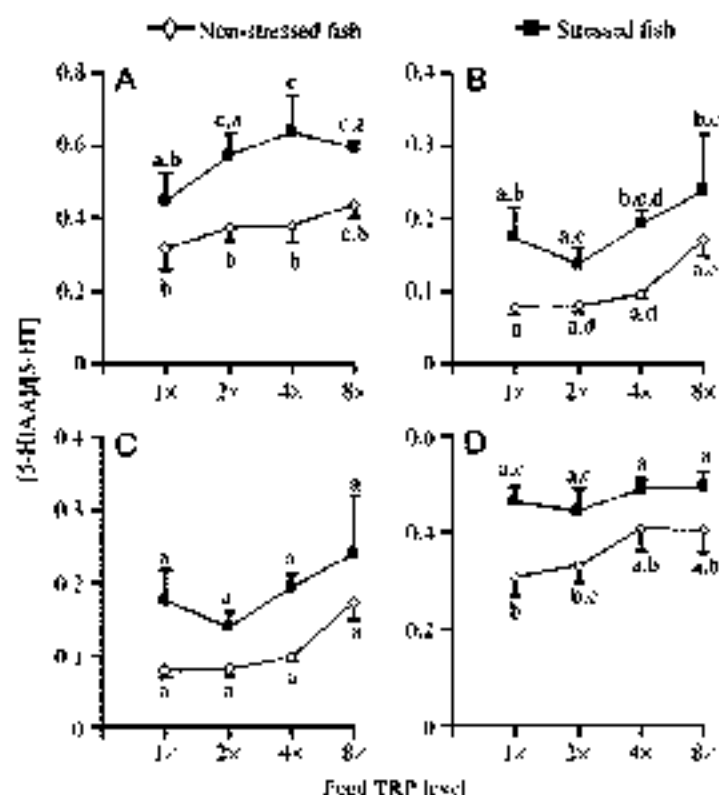


Fig. 4. The [5-HIAA]/[5-HT] ratios in the telencephalon (A), hypothalamus (B), optic tectum (C) and brain stem (D) of isolated juvenile rainbow trout fed feeds supplemented with L-tryptophan to a level corresponding to two (2x), four (4x) and eight (8x) times of that of the non-supplemented control feed (1x). Stressed fish (filled squares) were exposed to a standardized stressor (lowering the water level); non-stressed fish were undisturbed fish kept isolated (open triangles). Different letters indicate a significant difference at the $P < 0.05$ level (LSD *post-hoc* test). Values are means \pm S.E.M. from 5–7 individuals.

feed for 7 days. Interestingly, the anti-depressive effect of specific 5-HT re-uptake inhibitors (SSRI), such as fluoxetine (Prozac), is only evident after long-term treatment (Mongeau et al. 1997). Initially SSRI treatment markedly decreases the firing activity of 5-HT neurones. However, the firing rate of 5-HT neurones recovers if the SSRI treatment continues for 1–3 weeks, and this recovery seems to be associated with a desensitization of 5-HT_{1A} somato-dendritic autoreceptors (Mongeau et al. 1997; Nair et al. 1999). Moreover, long-term SSRI treatment has been found to desensitize presynaptic 5-HT autoreceptors located at nerve terminals, and to increase the baseline level of 5-HT in the hippocampus (Kreiss and Lucki, 1995). Possibly, long-term effects of elevated dietary intake of TRP on stress responsiveness and aggression in rainbow trout are mediated by similar mechanisms, resulting in elevated 5-HT release in areas of the trout brain homologous to the mammalian hippocampus.

According to Northcutt and Davis (1983), the dorsal and ventral parts of the dorsal area of the teleostean telencephalon are a putative homologue of the mammalian hippocampus.

Notably, in the present study, following 7 days of TRP supplementation, a significant correlation between [TRP] and [5-HIAA]/[5-HT] ratios was observed only in the teleost fish, stressed fish.

Serotonin may also suppress HPI axis activity by inhibiting central norepinephrine (NE) activity. In mammals, NE stimulates hypothalamic corticotropin-releasing hormone, which *in vivo* has a stimulatory effect on NE activity (Hoether, 1996), creating a positive feedback loop, which seems to be counterbalanced by an inhibition of the NE system by 5-HT (Aston-Jones et al., 1991; Engberg, 1992). The central NE system has been suggested to stimulate HPI axis activity in teleost fish (Överli et al., 1999; Höglund et al., 2000). Consequently, by elevating brain 5-HT activity, increased dietary intake of TRP may suppress the stress-related activation of the brain NE system, and by that inhibit the stress-induced activation of the HPI axis.

As expected, feeding the fish TRP-supplemented feed resulted in elevated plasma [TRP]. Plasma [TRP]/[LNAA] ratios were also elevated in fish fed TRP-supplemented feed since the amount of other LNAA were similar in the feeds (Table 1). Increasing dietary levels of TRP were also reflected in elevated brain [TRP] and a non-significant trend towards increased brain [TRP]/[LNAA]. Moreover, as reported previously, stress resulted in an elevation of brain [TRP] (Winberg and Nilsson 1993a,b) but had no effect on brain levels of other LNAA, nor did stress affect plasma levels of TRP, other LNAA, or plasma [TRP]/[LNAA]. Thus, since in rainbow trout the TRP plasma pool is not protein-bound (Rozas et al., 1990) and is completely available for uptake to the brain, a stress-mediated effect on the availability of TRP for uptake to the brain could not explain the stress-induced elevation of brain [TRP]. It is more likely that the elevation of brain [TRP] observed in stressed rainbow trout is mediated by stress-induced effects on the blood-brain barrier permeability. In mammals, the increase in brain [TRP] during stress seems to involve the sympathetic nervous system, and is attenuated by the β -adrenergic receptor antagonist, propranolol, but not by the α -adrenoreceptor antagonist phentolamine (Dunn and Welch, 1991). Dunn (1999) showed that treatment with the nitric oxide (NO) synthase inhibitor N-nitro-L-arginine (L-NAME) attenuates the stress-induced elevation of brain [TRP] in mice, suggesting that NO is involved in mediating an elevation of brain [TRP] in response to stress in mammals.

In conclusion, the results of the present study show that dietary supplementation of TRP for 7 days attenuates the stress-induced increase in plasma cortisol levels in juvenile rainbow trout, an effect that is most likely to be mediated by the brain serotonergic system. Supplementing feed with TRP could be a promising strategy in aquaculture management, not only making the fish more stress-resistant, but also decreasing aggressive behaviour, and thus the tendency to develop strong dominance hierarchies, resulting in stress, reduced disease resistance and highly variable growth rates of fish in aquaculture (Winberg et al., 2001).

This study was supported by grants from the Swedish Research Council for Environment, Agricultural Sciences and Spatial Planning (FORMAS), the Carl Trygger Foundation, the FACTAS foundation and Ewos International Ltd.

References

- Aldegunde, M., Garcia, J., Saenz, J. L. and Rozas, G. (1998) Uptake of tryptophan into brain of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Zool.* **282**, 285-289.
- Aldegunde, M., Saenz, J. L. and Rozas, G. (2000) Acute effects of L-tryptophan on tryptophan hydroxylation rate in brain regions (hippocampus and nucleus) of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Zool.* **286**, 131-135.
- Aston-Jones, G., Alkhala, H., Charley, P. and Chaves, G. (1991) Serotonin selectively attenuates glutamate-evoked activation of noradrenergic locus coeruleus neurons. *J. Neurosci.* **11**, 760-769.
- Baulieu-Biber, A. C. (1993) Regulation of serotonin synthesis. *Prog. Brain Res.* **98**, 3-15.
- Chenailoff, E. (1993) Psychopharmacological interactions between stress hormones and central serotonergic systems. *Brain Res. Rev.* **18**, 1-32.
- Curran, G., Joseph, M. H. and Knoff, P. J. (1977) Effects of monoamine oxidase reductase on rat brain tryptophan metabolism. *J. Neurochem.* **19**, 1967-1974.
- de Montigny, P., Stuhargh, J. F., Giroux, R. S., Carban, R. G., Srinivasan, K., Steyer, L. A. and Hébert, T. (1971) Nigralite-J-3-dicarbonyldehydroxylation: A rationally designed antagonist for primary amases. *Anal. Chem.* **59**, 1096-1101.
- Deakin, J. M. F. (1991) Depression and 5-HT. *Int. Clin. Psychopharmacol.* **3**, 23-26.
- Deakin, J. M. F. and Graeff, F. G. (1991) 5-HT mechanisms of defense. *J. Psychopharmacol.* **5**, 305-315.
- Dunn, T. G. (1995) Serotonin: Current understanding and the way forward. *Int. Clin. Psychopharmacol.* **11**, 19-26.
- Dunn, A. J. (1988) Changes in plasma and brain tryptophan and brain serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid after footshock stress. *Life Sci.* **42**, 19-7-1983.
- Dunn, A. J. (1999) Brain catecholaminergic and tryptophan responses to restraint are attenuated by gene oxide synthase inhibition. *Neurochem. Int.* **33**, 551-557.
- Dunn, A. J. and Welch, J. (1991) Stress-induced and endocrine-induced increases in brain tryptophan and serotonin metabolism depend on sympathetic nervous system activity. *J. Neurochem.* **57**, 1615-1622.
- Engberg, G. (1992) Clonidine and 8-OH-DPAT attenuate acetone-induced excitation of central noradrenergic neurons. *J. Neurochem.* **59**, 149-151.
- Ferretton, J. D. (1963) Role of melatonin availability in control of melatonin biosynthesis in brain. *Physiol. Rev.* **60**, 582-546.
- Graeff, F. G., Galmarini, F. S., de Andrade, F. G. C. S. and Deakin, J. M. F. (1996) Role of 5-HT in stress, anxiety and depression. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **54**, 129-141.
- Höglund, E., Rahn, P. H. M. and Winberg, S. (2000) Skin darkening: a potential signal in teleosts and other vertebrates? The regulatory role of brain melatonin and pineal-melatonin-derived peptides. *J. Exp. Biol.* **203**, 1711-1721.
- Höglund, E., Rahn, P. H. M. and Winberg, S. (2001) Stimulatory and inhibitory effects of α -1 β - α receptors on ACTH and cortisol secretion in a teleost fish, the Arctic char (*Salvelinus alpinus*). *Neurosci. Lett.* **314**, 193-196.
- Hoether, G. (1996) The central adaptation syndrome: psychosocial stress as a trigger for adaptive modifications of brain structure and brain function. *Prog. Neurobiol.* **48**, 569-612.
- Jacobson, L. and Supplis, R. (1991) The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrinol. Rev.* **12**, 118-124.
- Johnston, W. L., Atkinson, J. L., Hinton, J. W. and Ware, K. E. (1990) Effect of dietary tryptophan on plasma and brain tryptophan, brain serotonin, and brain 5-hydroxyindoleacetic acid in rainbow trout. *J. Exp. Biol.* **1**, 49-54.
- Kreis, D. S. and Lucki, I. (1995) Effects of acute and repeated administration of antidepressant drugs on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine in rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **274**, 866-876.
- Épösti, Z., Phelis, C. and Paul, M. K. (1981) Synaptic interaction of

- serotonergic axons and corticotropin releasing factor (CRF) synthesizing neurons at the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. A light and electron microscopic immunohistochemical study. *Histochem* **86**, 541-549.
- Mues, M. and Mikkelsen, H. (1995). The serotonin hypothesis of major depression. In *Psychopharmacology: the Currents in research of Progressed* (Ed. F. E. Bloom and D. J. Kupfer), pp. 933-944. New York: Raven Press.
- Markus, C. R., Oikari, E., Panhuyzen, G. J. M., Van der Grinten, J., Alles, M. S., Tuison, A., Westenberg, G. M., Fekkes, D., Koppeschaar, H. P. and de Haan, E. E. H. P. (2000a). The bovine protein solatubulin increases the plasma ratio of tryptophan to the other large neutral amino acids, and in vulnerable subjects raises brain serotonin activity, reduces cortisol concentration, and improves mood under stress. *Am. J. Clin. Nutr.* **71**, 1536-1544.
- Markus, C. R., Panhuyzen, G., Lindman, E. M. and Ruchman, M. (1999). Carbohydrate intake improves cognitive performance of stress-prone individuals under laboratory stress. *Br. J. Nutr.* **82**, 457-467.
- Markus, C. R., Panhuyzen, G., Tuison, A. and Koppeschaar, H. P. (2000b). Effect of food on cortisol and mood in vulnerable subjects under controllable and uncontrollable stress. *Physiol. Behav.* **70**, 333-342.
- Markus, C. R., Panhuyzen, G., Tuison, A., Koppeschaar, H., Fekkes, D. and Peters, M. (1998). Does carbohydrate-rich protein-poor food prevent a deterioration of mood and cognitive performance of stress-prone subjects when subjected to a stressful task? *Appetite* **31**, 49-65.
- Mingos, R., Blier, P. and de Montigny, C. (1997). The serotonergic and noradrenergic systems of the hippocampus, their interactions and the effects of antidepressant treatments. *Brain Res. Rev.* **23**, 145-191.
- Morinade, P. and Danster, R. (1979). Effects of bromine on aggressive behavior in domestic pigs. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **2**, 109-114.
- Norheim, R. G. and Davis, R. E. (1983). Telencephalic organization in ray-horned eel. In *Fish Neurobiology*, Vol. 2: *Brain Stem and Sense Organs* (Ed. R. E. Davis and R. G. Norheim), pp. 203-236. Ann Arbor: University of Michigan Press.
- Nur, D., Horstink, S., Rijk, C., Rijk, A., Sandfort, J., Nash, J. and Argopantou, S. (1999). Mechanisms of action of selective serotonin reuptake inhibitors in the treatment of psychiatric disorders. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **3**, 581-586.
- Olson, V. A., Palko, K. and Rette, O. B. (1992). Cortisol and lactac levels of Atlantic salmon *Salmo salar* developing infectious aemias (ISA). *Dis. Aquat. Org.* **14**, 99-104.
- Ovérli, O., Hareik, C. A. and Winberg, S. (1999). Short-term effects of fights for social dominance and the establishment of dominant-subordinate relationships on brain monoamines and cortisol in rainbow trout. *Brain Behav. Evol.* **54**, 263-275.
- Parent, A., Peters, D. and Dubé, L. (1982). Comparative neuroanatomy of central monoaminergic systems. In *Handbook of Chemical Neuroanatomy* (Ed. A. Björklund and T. Höfelle), pp. 409-439. Amsterdam: Elsevier.
- Rozas, G., Rey, P., André, M. D., Rebelo-da, E., Nogueira, R. and Abba-Gade, A. L. (1990). Distribution of 5-hydroxytryptamine and related compounds in various brain regions of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol. Biochem.* **8**, 501-506.
- Sammes, C. H., Lawson, E. T., Sammes, T. R., Rember, K. J. and Greenberg, N. (1998). Regional and temporal separation of serotonergic activity mediating social stress. *Neurosci.* **87**, 489-496.
- Winberg, S. and Lejpsge, O. (1998). Elevation of brain 5-HT activity, POMC expression and plasma cortisol in socially subordinate rainbow trout. *Am. J. Physiol.* **43**, R645-R654.
- Winberg, S. and Nilsson, G. E. (1992a). Time course of changes in brain serotonergic activity and brain tryptophan levels in dominant and subordinate juvenile Arctic charr. *J. Exp. Biol.* **179**, 183-195.
- Winberg, S. and Nilsson, G. E. (1993a). Role of brain monoamine neurotransmitters in aggressive behaviour and stress, with particular reference to fish. *Comp. Biochem. Physiol.* **C106**, 597-614.
- Winberg, S., Nilsson, A., Eklund, P., Söderström, V. and Nilsson, G. E. (1995). Serotonin as a regulator of hypothalamic-pituitary-ovineal activity in teleost fish. *Neurosci. Lett.* **189**, 113-116.
- Winberg, S., Ovérli, O. and Lejpsge, O. (2001). Suppression of aggression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by dietary tryptophan. *J. Exp. Biol.* **204**, 3667-3686.

Tryptophan affects both gastrointestinal melatonin production and interrenal activity in stressed and nonstressed rainbow trout

Abstract: The present experiments were designed to test the hypothesis that elevated dietary levels of L-tryptophan (Trp) result in elevated plasma levels of melatonin and that this increase in plasma melatonin concentration is caused by elevated melatonin production and secretion by the gastrointestinal-tract (GIT). Feeding juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Trp-supplemented feed for 7 days resulted in elevated daytime plasma levels of melatonin and reduced poststress plasma cortisol concentrations. Nighttime plasma melatonin concentrations were, however, not affected by elevated dietary Trp. Moreover, stress caused a reduction in daytime plasma levels of melatonin in fish fed Trp-supplemented feed, an effect that was counteracted by treatment with an α -receptor antagonist. These results clearly suggest that elevated dietary intake of Trp results in an increase in the GIT production of melatonin in rainbow trout. A suggestion that was further supported by the results from an *in vitro* experiment demonstrating that addition of Trp to the incubation medium stimulates melatonin production and release by incubated rainbow trout GIT. The results from this study led us to suggest a possible mechanism for melatonin in mediating the effects of elevated dietary Trp on poststress plasma cortisol concentrations and aggressive behavior in rainbow trout.

Olivier Lepage¹, Earl T. Larson^{2,4},
Iain Mayer³ and Svante Winberg¹

¹Department of Comparative Physiology, Functional Biology Center, ²Department of Neuroscience, Biomedical Center, Uppsala University, Uppsala, Sweden; ³Department of Fisheries and Marine Biology, University of Bergen, Bergen, Norway; ⁴Department of Biology & Psychology, Northeastern University, Boston, USA

Key words: aquaculture, cortisol, melatonin, serotonin, stress

Address reprint requests to Svante Winberg, Department of Comparative Physiology, Evolutionary Biology Center, Uppsala University, Uppsala, Sweden

E-mail: svante.winberg@ebc.uu.se

Received August 25, 2004,
accepted October 26, 2004

Introduction

The essential amino acid L-tryptophan (Trp) is the precursor of the monoamine neurotransmitter serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) and its availability is a rate determinant of the central 5-HT synthesis [1]. Elevated dietary intake of Trp results in increased brain Trp levels which in turn increases the rate of brain 5-HT biosynthesis in both fishes [2, 3] and mammals [1, 4, 5]. This can have a wide range of implications for control of behavior and endocrine systems like the hypothalamic–pituitary–adrenocortical (HPA) axis.

Previous studies have shown that feeding rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Trp supplemented feed for 7 days results in a suppression of aggressive behavior [6] along with a reduction in the responsiveness of the hypothalamic–pituitary–interrenal (HPI), the teleostean homologue of the mammalian HPA axis, as indicated by lower poststress plasma levels of adrenocorticotropin (ACTH) [7] and cortisol [3, 7] in fish fed Trp-supplemented feed. Similarly, elevated dietary intake of Trp has been reported to suppress aggressive behavior in dogs [8] and feed-restricted male chickens (*Gallus domesticus*) [9], and in humans a carbohydrate rich protein poor diet, which causes an elevation of brain Trp availability, reduces the cortisol response and feelings of depression in subjects with high stress predisposition [10]. These effects of Trp were suggested to occur as a consequence of the elevated brain 5-HT activity although it

is not entirely clear through what mechanisms 5-HT modulates aggressive behavior and stress responsiveness.

Another possibility is that the effects of dietary Trp on aggression and HPI axis reactivity are mediated by melatonin (*N*-acetyl-5-methoxytryptamine). Trp is the precursor of 5-HT, which in turn is the precursor of melatonin. If activities of arylalkylamine-*N*-acetyltransferase (AA-NAT) and hydroxyindole-*O*-methyltransferase (HIOMT), the enzymes responsible for the conversion of 5-HT to melatonin, are sufficiently high, then elevated dietary intake of Trp may result in elevated plasma melatonin levels. The multifunctional hormone melatonin is regarded as a synchronizer of daily rhythms to the external light/dark (L/D) cycle in most vertebrates [11, 12], including salmonid fish [for review, see 13]. However, melatonin has also been reported to affect aggressive behavior and poststress plasma cortisol concentrations. Munro [14] showed that intracranial injections of melatonin suppressed aggressive responsiveness in the cichlid fish *Aequidans pulcher*, and in mammals, melatonin has been reported to exert a glucocorticoid antisecretagogue effect [15–18]. There are a number of factors that can affect melatonin production such as exercise, stress, and steroid hormones [17–18], but pineal melatonin synthesis is regulated first and foremost by light/dark cycles, being inhibited by light and stimulated by darkness.

There is evidence, however, that suggests that the gastrointestinal-tract (GIT) is capable of synthesis and secretion

of melatonin independent of the pineal gland. Buhenik and Pang [19] detected melatonin in all segments of the GIT in various chondrosteuan and teleostean fish species including rainbow trout. Gastrointestinal melatonin production in fishes may not be controlled by light/dark cycles. In mammals, gastrointestinal melatonin production is influenced by different alimentary conditions including Trp intake [20].

The present experiments were designed to test the hypothesis that elevated dietary intake of Trp results in an increase in plasma melatonin concentrations and that the GIT is the source of this Trp-induced elevation of plasma melatonin concentrations. Moreover, we expected stress to reduce daytime plasma melatonin concentrations in fish fed Trp-supplemented feed as melatonin clearance is rapid [21] and stress is known to reduce GIT blood supply through an α -adrenergic mechanism, and by that GIT melatonin secretion. The results of these experiments led us to suggest a possible mechanism for melatonin in mediating the effects of elevated dietary Trp on HPI axis reactivity and aggressive behavior in rainbow trout.

Material and methods

Experimental animals

Juvenile 2-yr-old rainbow trout (O. mykiss), weighing 95 ± 26 g (mean \pm S.D., $n = 64$) were used. Prior to the experiment, fish were kept indoors in a 1 m^3 holding tank, at a rearing density of approximately 0.02 kg/L for more than 1 month. The holding tank was continuously supplied with aerated Uppsala tap water at $9 \text{ }^\circ\text{C}$ and the LD regime was adjusted to correspond with 51°N latitude. Fish were hand-fed with commercial trout pellets (FWOS ST40, EWOS AS, Bergen, Norway) at 1–2% of body mass per day.

Experimental protocol

Fish were kept in eight 250 L glass aquaria continuously supplied with aerated Uppsala tap water at a flow rate of 0.8 L/min, and a temperature of $8 \text{ }^\circ\text{C}$. Light (12 hr:12 hr:light: 06:00–18:00 hr) was provided by a 30-W Lumilux daylight fluorescent tube placed 100 mm above the water surface of each aquarium. Each aquarium was divided into four individual 65 L compartments by removable PVC walls.

Experiment 1: Effect of dietary Trp on plasma melatonin concentrations in stressed and nonstressed fish

This experiment was performed in order to test the hypothesis that elevated dietary intake of Trp results in elevated plasma levels of melatonin and that Trp-induced elevation of plasma melatonin concentrations is counteracted by stress. The experiment was performed in two subsequent rounds, each round comprised of 32 individuals. At the start of the experiment, fish were selected from the holding tank, weighed and transferred to individual compartments within the experimental aquaria. The first

week after transfer to social isolation, fish were hand-fed with commercial feed (FWOS ST40) until satiety or until the fish consumed a number of pellets corresponding to 1.5% of the body mass. Pellets not consumed were removed from the aquarium. At the end of acclimation period, every fish was eating an amount equivalent to 1.5% of their body mass daily. Following this week of acclimation, commercial feed was exchanged for an experimental feed, supplemented with Trp to level 4.57 g/kg, expressed as gram of total Trp per kg of dry feed, corresponding to eight times the Trp content of the commercial feed (0.44 g/kg, expressed as gram of total Trp per kg of dry feed), but otherwise identical to commercial feed. A similar number of fish were fed with a control (CTRL) feed, not supplemented with Trp. Fish were fed once a day to satiety or at maximum of 1.5% of the body mass, for 7 days. At the end of the experimental feeding period, one group ($n = 8$) of the fish fed Trp-supplemented feed and one group ($n = 8$) of the fish, which received CTRL feed, were exposed to a standardized stressor for 2 hr starting at 10:00 hr. The same day, a similar number of fish were exposed to stress starting at 22:00 hr. The stressor consisted of lowering the water level in the aquaria until the dorsal fin of the fish was exposed above the water surface. Following stress, fish were killed (one group at 12:00 hr, one group at 08:00 hr), and blood samples were collected. The remaining fish fed Trp-supplemented feed ($n = 16$) or CTRL feed ($n = 16$) were left undisturbed and served as nonstressed controls, half of them sampled at 12:00 hr, the other half at 08:00 hr, together with fish exposed to the stressor.

Experiment 2: Effects of the α -receptor antagonist phenoxybenzamine on daytime plasma melatonin concentrations in stressed and nonstressed fish

This experiment was performed to test the hypothesis that the stress-induced decline in daytime plasma melatonin concentrations in fish fed Trp-supplemented feed is because of a stress-related reduction in GIT blood supply mediated by an α -adrenergic mechanism. The experiment was performed as experiment 1 except that one group of fish fed Trp-supplemented feed (Trp) and one group of the fish fed control feed (CTRL), received via the feed 2 mg of phenoxybenzamine (Sigma B-019, α -adrenergic receptor antagonist, PB) on day 6 of feeding, the day before stress exposure. The pellets (CTRL and Trp) were soaked in ethanol in which PB was previously dissolved. Ethanol was evaporated away allowing PB to crystallize and coat the pellets. The concentration of PB was 0.2 mg per pellet. Fish were fed at a level of 1.5% body mass, which represented at least 10 pellets for each fish. Fish received 10 pellets with PB, eating a total of 2 mg of PB (c. 20 mg/kg body mass), and some more feed (without PB) in order reach the level of 1.5% body mass. A similar number of fish for each type of feed (Trp or CTRL) did not receive PB prior to stress. Fish were stressed at 10:00 hr only, and following stress exposure, fish were killed at 12:00 hr, and blood samples were collected. A similar number of fish for each group (CTRL, CTRL + PB, Trp, Trp + PB) were kept undisturbed and used as nonstressed controls. This second experiment was also performed in two sub-

quent rounds, each round including 32 individuals. Four individuals for each group (CTRL, CTRL + stress, CTRL + PB, CTRL + PB + stress, Trp, Trp + stress, Trp + PB, Trp + PB + stress).

Experiment 3: Effect of Trp on melatonin production from gastro-intestinal-tract tissue: an *in vitro* study

In order to test the hypothesis that Trp availability is a limiting factor for melatonin synthesis by the GIT, a third experiment was performed. Samples of gastrointestinal tissues (proximal and distal gut) were quickly removed 2 hr after the onset of the photoperiod from decapitated animals. Gut tissues were opened longitudinally and cleared of their contents. Gut tissues were incubated in 24-well culture plates (one complete gut per well) containing 2 mL of culture medium. The culture medium used was RPMI 1640 (Sigma; R81015) supplemented with bicarbonate (2.2 g/L), penicillin (10,062 g/L), streptomycin (4.1 g/L), glutamine (6,292 g/L), and Trp (0, 50 or 100 µg/mL). The temperature was maintained constant at 35°C. One sample of culture medium was taken after 12 hr at 20:00 hr and a second after 24 hr at 08:00 hr. Culture media samples were stored at -80°C until analysis. Following the second sampling of culture media, gut tissues were blotted on paper, weighed, and homogenized in 1 mL of 4% (w/v) ice-cold perchloric acid (PCA) using a Potter Evehjem homogenizer. The homogenate was then centrifuged at 20,000 g for 15 min and 200 µL of the supernatant was mixed with 200 µL of 10% (w/v) sodium bicarbonate solution in order to precipitate PCA. The samples were centrifuged again at 20,000 g for 15 min and the supernatants were collected and stored at -80°C until analysis.

Assays

Plasma Trp concentration was analyzed using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-EC), as described by Overli et al. [22] but with the oxidizing potential set at 600 mV [6].

Cortisol analysis was performed directly on rainbow trout plasma without extraction, using a validated radio-immuno-assay (RIA) modified from Olsen et al. [23], as described by Winberg and Lepage [24]. The intra- and inter-assay coefficient of variance of a pooled plasma sample containing c. 20 ng/mL was 7.1 and 7.1%, respectively.

Plasma levels of melatonin were measured by a direct RIA method as previously described by Mayer [25], based on that of Fraser et al. [26]. Melatonin was measured in duplicate 250 µL plasma samples. The lower limit of detection was 8 pg melatonin/mL plasma. An inhibition curve obtained from a serial dilution (1:2) of salmon plasma collected during darkness showed good parallelism with the standard curve. The intra- and inter-assay coefficient of variance of a pooled plasma sample containing c. 200 ng/mL was 6.9 and 10.4%, respectively.

Statistics

All data are presented as mean ± standard error of the mean (S.E.M.). In experiment 1, effects of feeding Trp-

supplemented feed and stress on plasma cortisol levels, melatonin levels, and Trp levels, were analyzed using a three-way analysis of variance (3-way ANOVA), with feed, treatment (stress versus nonstress) and sampling time as independent variables. Similarly, data from experiment 2 were analyzed using a three-way ANOVA with feed, treatment (stress versus nonstress) and PB treatment as independent variables. Data on melatonin concentrations in the incubation medium from experiment 3 were analyzed using a one-way repeated measure ANOVA whereas a one-way ANOVA was used to analyze data on melatonin levels of GIT. Following ANOVA analysis post hoc differences were tested using the least significance difference (LSD) test. All statistical analyses were performed using STATISTICA 5.1 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA) software.

Results

After transfer to the individual chambers of the experimental aquaria, feed intake increased progressively. When switching to the experimental feed, control feed and Trp supplemented feed, feed intake remained at the same rate as observed for commercial feed and there was no difference in feed intake between fish receiving control feed and feed supplemented with Trp in either experiment 1 or 2.

Exposing the fish to the standardized stressor had a significant effect on plasma cortisol levels ($F_{1,64} = 48.14$; $P < 0.0001$), fish subjected to stress showing elevated plasma cortisol levels as compared with nonstressed fish (Fig. 1A). The effect of stress on plasma cortisol levels was most pronounced in fish sampled at noon whereas fish sampled at midnight after being exposed to the same stressor did not exhibit any significant increase in plasma cortisol levels (Fig. 1A). Moreover, the effect of stress on plasma cortisol levels was reduced in fish fed Trp supplemented feed and in fish fed Trp supplemented feed stress did not result in any significant elevation of plasma cortisol concentrations (Fig. 1A). Feeding the fish Trp supplemented feed had a significant effect on plasma cortisol levels ($F_{1,64} = 6.78$; $P = 0.0043$) and there was also a significant interaction between stress and feed ($F_{1,64} = 32.58$; $P < 0.0001$). In addition to the effects on plasma cortisol levels in stressed fish, feeding the fish Trp supplemented feed resulted in a significant ($P < 0.0001$) elevation of plasma cortisol levels in non-stressed fish (Fig. 1A).

There was no effect of either stress or light/dark cycle on plasma Trp concentrations (Fig. 1B). However, as expected, feeding the fish Trp supplemented feed resulted in a significant effect on plasma Trp levels ($F_{1,64} = 227.56$; $P < 0.0001$), fish fed Trp supplemented feed had significantly higher plasma Trp concentrations than fish fed CTRL feed ($P < 0.0001$) (Fig. 1B). Moreover, as expected, plasma melatonin levels showed a clear circadian rhythm with fish sampled at midnight displaying higher melatonin concentration than fish sampled at noon ($F_{1,64} = 23.94$; $P < 0.0001$) (Fig. 1C). Feeding the fish Trp supplemented feed also had a significant effect on plasma melatonin levels ($F_{1,64} = 7.84$; $P = 0.0069$). Stress, on the contrary, did not have a significant effect on plasma melatonin levels by itself but there was a significant interaction between stress and Trp supplementation ($F_{1,64} = 8.74$; $P = 0.0045$). When

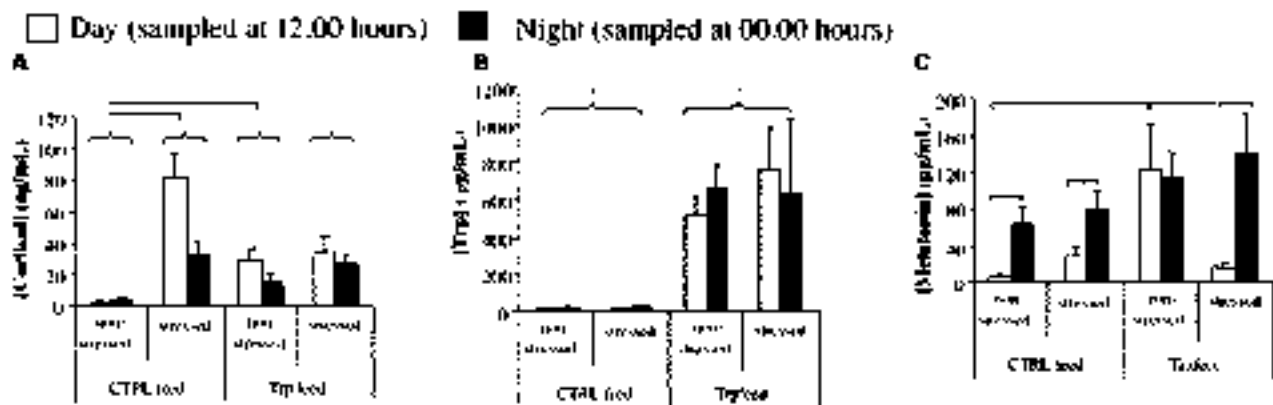


Fig. 1. Plasma levels of cortisol (A), tryptophan (Trp) (B), and melatonin (C) in isolated rainbow trout fed for 7 days with a feed supplemented with α -tryptophan (Trp feed) to a level corresponding to eight times the Trp content of the non-supplemented control feed (CTRL feed). Stressed fish were exposed to a standardized stressor (lowering the water level), whereas nonstressed fish are kept undisturbed. Fish were sampled at 12:00 hr (open bars) and a similar number of fish were sampled at 00:00 hr (black bars). Horizontal lines indicate a significant difference at the level of $P < 0.05$ (LSD post hoc test). Values are mean \pm S.E.M.

sampled at noon, nonstressed fish fed Trp feed had significantly higher plasma melatonin levels than nonstressed fish fed CTRL feed ($P = 0.0124$), an effect not observed in fish sampled at midnight (Fig. 1C). Moreover, in stressed fish sampled at noon there was no difference in plasma melatonin levels between fish fed Trp and CTRL feed (Fig. 1C). In fact, at noon stressed fish fed Trp feed displayed significantly lower plasma melatonin levels than nonstressed fish fed Trp ($P = 0.0001$) (Fig. 1C).

In experiment 2 stress again had an effect on plasma cortisol concentrations ($F_{1,64} = 80.38$; $P < 0.0001$), stressed fish displaying elevated cortisol levels as compared with nonstressed fish ($P < 0.0001$), and as in experiment 1 this effect was counteracted by feeding the fish Trp feed (effect of Trp feed: $F_{1,64} = 6.25$; $P = 0.0153$; interaction feed \times stress: $F_{1,64} = 70.71$; $P < 0.0000$) (Fig. 2A). Treatment with the α -adrenergic receptor antagonist, PB, did not have any effects on plasma levels of cortisol or Trp

(Fig. 2A,B). As in experiment 1 feeding the fish Trp feed resulted in elevated plasma Trp concentrations ($F_{1,64} = 402.71$; $P < 0.0001$) whereas stress did not have any effects on plasma Trp levels (Fig. 2B).

Trp feed had an effect on plasma melatonin levels ($F_{1,64} = 36.01$; $P < 0.0001$), with fish fed Trp feed showing higher plasma melatonin levels than fish fed CTRL feed (Fig. 2C). Stress also resulted in a reduction in plasma melatonin levels of fish fed Trp feed (Fig. 2C), stressed fish fed Trp feed having significantly lower plasma melatonin levels than nonstressed fish fed Trp feed ($P = 0.0002$). Treatment with PB did not affect plasma melatonin concentrations but there was an effect of stress ($F_{1,64} = 4.12$; $P = 0.04700$) and an interaction between PB treatment and stress ($F_{1,64} = 3.39$; $P = 0.0053$). Most importantly, fish that were fed Trp feed and treated with PB did not show any decline in plasma melatonin concentrations in response to stress (Fig. 2C). Stressed PB treated fish fed Trp

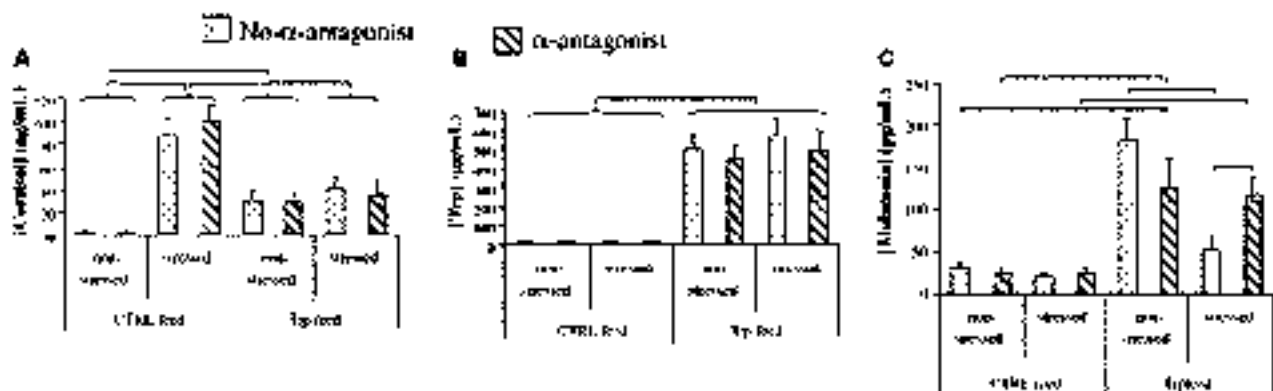


Fig. 2. Plasma levels of cortisol (A), tryptophan (Trp) (B), and melatonin (C) in isolated rainbow trout fed for 7 days with a feed supplemented with α -tryptophan (Trp feed) to a level corresponding to eight times the Trp content of the non-supplemented control feed (CTRL feed). Stressed fish were exposed to a standardized stressor (lowering the water level), whereas nonstressed fish are kept undisturbed. Fish were given α -adrenergic blocker one day before stress exposure (dotted bars) and a similar number of fish were not given α -adrenergic blocker (solid bars). Fish were sampled at 12:00 hr. Horizontal lines indicate a significant difference at the level of $P < 0.05$ (LSD post hoc test). Values are mean \pm S.E.M.

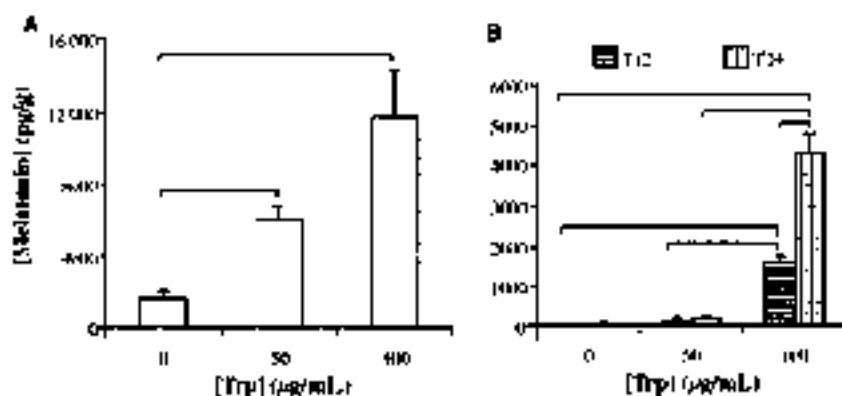


Fig. 3. Levels of melatonin in incubation buffer (A) and gastrointestinal tissue (B). Gastrointestinal tissues were sampled 2 hr after the onset of the light period. Gastrointestinal tissue were incubated in buffer containing 0, 50 or 100 µg/mL of L-tryptophan. Melatonin was analyzed in buffer after 12 hr or 24 hr (12, checkered bars and 24 hr or 24 hr (24, checked bars) and in gastrointestinal tissue after 24 hr of incubation. Horizontal lines indicate a significant difference at the level of $P < 0.05$ (LSD post hoc test). Values are mean \pm S.E.M.

feed showed significantly higher melatonin levels than stressed fish that were fed Trp feed but not treated with PB ($P = 0.0006$). In fish fed CTRL feed, showing low plasma melatonin levels, neither PB nor stress had any effects on plasma melatonin levels (Fig. 2C).

In experiment 3, addition of Trp to the culture medium had a significant effect on the production of melatonin by the GIT ($F_{2,24} = 15.18$; $P < 0.0001$). Melatonin was present in GIT even if the incubation medium was not supplemented with Trp but GIT melatonin tissue concentrations were drastically elevated as the Trp concentrations of the incubation medium increased. GIT incubated in medium supplemented with 50 µg Trp/mL ($P = 0.0006$) and 100 µg Trp/mL ($P < 0.0001$) showed significantly higher tissue melatonin levels than GIT incubated in incubation medium without any supplementary Trp (Fig. 3A). However, there was no significant difference in tissue melatonin concentrations between GIT incubated in medium supplemented with 50 and 100 µg Trp/mL (Fig. 3B).

The melatonin concentration in the incubation medium was also affected by supplementation of Trp ($F_{2,24} = 294.62$; $P < 0.0001$). In incubation medium without supplementary Trp, melatonin concentration was very low after 12 as well as 24 hr incubation of GIT (Fig. 3B). However, melatonin levels increased with Trp content of the incubation medium and melatonin concentrations in incubation medium supplemented with 100 µg Trp/mL were significantly higher than melatonin concentrations in control medium both at 12 ($P < 0.0001$) and 24 h ($P < 0.0001$) of incubation (Fig. 3B).

Discussion

The results of our study show that Trp supplementation via feed results in a pronounced elevation of daytime plasma melatonin levels whereas nighttime levels of melatonin were not affected. Thus, the circadian rhythm of plasma melatonin concentrations was disrupted in fish fed Trp-supplemented feed, plasma melatonin levels being equally high at noon and midnight. Moreover, in response to daytime stress, these individuals showed a decline in melatonin concentrations but nighttime stress resulted in no decline in plasma melatonin levels. Thus, day- and nighttime plasma melatonin levels in rainbow trout appear to be regulated either by different mechanisms, or by

mechanisms set to distinctly different sensitivities during day and night.

Previous studies suggest that a high proportion of melatonin produced by pineal cells is secreted during the night in response to darkness while the enterochromaffin cells of the GIT are a major source of low daytime levels of melatonin. Bubník and Pang [19] detected melatonin in all segments of the GIT in chondrosteian and teleostean fish, including rainbow trout. Moreover, it is interesting that, similar to birds [27] and mammals [28, 29], GIT levels of melatonin reported by Bubník and Pang [19] were higher than the reported plasma levels. In accordance with these results, our study shows that GIT of rainbow trout contains high levels of melatonin.

Gastrointestinal melatonin content in mammals is influenced by different alimentary conditions such as Trp intake [20]. Trp administration increases blood melatonin concentrations in pinealectomized rats [20, 30], an effect which was not observed if the hepatic vein was ligated [20]. Thus, melatonin which is probably synthesized by enterochromaffin cells of the intestinal mucosa appears to enter the blood circulation via the hepatic portal vein [30, 31]. In our study, plasma Trp concentrations were drastically increased via Trp supplemented feed, suggesting elevated GIT uptake of Trp in these individuals. Thus, elevated dietary intake of Trp is likely to increase the synthesis of melatonin in the GIT of rainbow trout, resulting in elevated plasma melatonin levels, at least during the light period when the GIT appears to be the main site of melatonin production. This suggestion is clearly supported by the results from the *in vitro* incubation study. These results show that melatonin is produced by the GIT, and that Trp supplementation of the incubation medium increases the production as well as the secretion of melatonin by the rainbow trout GIT. This suggests the presence in the GIT of the enzymes necessary for the synthesis of 5-HT and melatonin, and that Trp availability is a limiting factor for the rate of GIT melatonin synthesis. Moreover, the fact that melatonin concentrations in the Trp supplemented incubation medium, as well as melatonin concentrations in the GIT incubated in this medium, continued to increase over time clearly suggests that melatonin is not an inhibitory factor for its own synthesis in the GIT.

The gastrointestinal tissue is likely to be the main source of melatonin during the light period whereas the pineal

gland, which is directly or indirectly photoreceptive, depending on species, synthesizes melatonin in response to darkness. In our experiment, nighttime levels of melatonin in fish fed Trp supplemented feed were not higher than day levels. Thus, either the GIT melatonin production is decreased during the night, or high plasma levels of melatonin in the fish fed Trp-supplemented feed had a negative feedback effect on pineal melatonin synthesis. The latter is supported by Yáñez and Meisá [32] who reported that melatonin itself may regulate its own synthesis in the pineal organ in rainbow trout. They observed that melatonin release by rainbow trout pineal glands was lower in static organ cultures than in superfusion cultures. This suggests a feedback mechanism where melatonin inhibits its own synthesis [18]. In birds, it also was shown that exogenous melatonin exert a feedback inhibition upon its synthesizing enzymes, HIOMT and AANAT [33]. The mechanism by which melatonin may affect its own synthesis in the trout pineal organ remains to be elucidated. Consequently, during the night, melatonin produced by the GIT may inhibit the synthesis of melatonin in the pineal gland and melatonin plasma levels do not increase.

A potent α -adrenergic vasoconstriction mechanism of GIT blood vessels has been recognized in several teleost species [34–37] as well as in other vertebrates [38]. The clearance of melatonin is rapid and in humans, the half-life of circulating melatonin is only about 20 min [21]. In our study fish were subjected to stress for 2 hr. Thus, a stress-induced decline of GIT blood flow along with rapid catabolism of melatonin could well explain the decline in daytime plasma melatonin levels which was observed in stressed fish fed Trp supplemented feed. This is supported by the fact that treatment with the α -receptor antagonist, PB, abolished the effect of stress on daytime plasma melatonin concentrations in fish fed Trp supplemented feed. Imminz et al. [39] have shown that vasoconstriction activity of adrenaline on canine gastrointestinal vasculature is blocked by PB. In stressed fish, PB would prevent vasoconstriction of gastrointestinal vasculature and blood would still reach the GIT at normal flow, allowing the GIT to supply the blood with melatonin.

As reported previously [3, 7], feeding rainbow trout Trp supplemented feed for 7 days results in a decrease in post-stress plasma cortisol levels along with an elevation of basal plasma cortisol levels. In mammals, melatonin has been suggested to counteract stress-induced elevations of glucocorticoids, by acting at the level of the hypothalamus [17] and/or by an antisercretagogue effect directly on the adrenals [18]. The standardized stressor used in our study resulted in the largest increase in plasma cortisol levels when administered during the daytime. At night when the fish displayed high plasma melatonin levels the increase in plasma cortisol levels induced by the stressor was much smaller. Similarly, fish fed Trp supplemented feed displayed elevated daytime plasma melatonin levels and showed reduced daytime HPI axis reactivity. Thus, fish with high plasma melatonin levels respond to stress with a smaller increase in plasma cortisol levels than fish with low plasma melatonin levels. Similarly, Konakelieva et al. [40] showed that melatonin treated rats displayed a lower cortisol response to stress,

suggesting that chronic melatonin administration may dampen the endocrine response to stress. Larson et al. [41] showed that socially stressed fish have higher nighttime melatonin levels and no elevation of cortisol levels compared to nonstressed fish. Consequently, it could not be excluded that the reduced HPI axis reactivity of fish fed Trp supplemented feed is related to elevated plasma melatonin levels in these fish. Torres-Fanfar et al. [42] reported that melatonin suppresses ACTH stimulated cortisol release from adrenal glands of capuchin monkeys (*Cebus pallidus*). Moreover, in this species it was confirmed that melatonin-1 (m1) receptors were expressed in the adrenal cortex, and that the suppressive effect of melatonin on cortisol secretion was mediated by activation of these receptors [43]. Still it has to be acknowledged that the coupling between melatonin and glucocorticoids secretion has been questioned and Hajak et al. [44] found no evidence for an effect of melatonin on plasma glucocorticoids levels in humans or rats.

The effects of elevated dietary intake of Trp on HPI axis reactivity could also be mediated by the brain 5-HT system as this neurotransmitter system appear involved in stress coping, having both an initiating and terminating effect on the adrenocortical stress response [45]. It appears that the inhibitory effect of 5-HT on the HPA/HPI axis is most obvious under stressful conditions, whereas during non-stressful conditions, the stimulatory effect of 5-HT on CRH release may predominate [46].

In conclusion, the results from this study show that elevated dietary intake of Trp results in a pronounced increase in daytime plasma melatonin concentrations in rainbow trout. Moreover, it appears clear that this effect is mediated by elevated melatonin synthesis and release by the GIT. Fish fed Trp supplemented feed show reduced HPI axis reactivity, an effect, which could be mediated by the brain 5-HT system. However, as melatonin has been suggested to have glucocorticoid antisercretagogue effects in mammals, it could not be excluded as a factor mediating the effects of dietary Trp on HPI axis reactivity in rainbow trout.

Acknowledgments

This study was supported by grants from the Swedish Research Council for Environment, Agricultural Sciences and Spatial Planning (FORMAS), the Carl Trygger Foundation, the FACTAS foundation and Ewos International Ltd.

References

1. BOUILLÉ-BISER MC. Regulation of serotonin synthesis. *Prog Biophys Mol Bio* 1993; 60:1–15.
2. JENSEN WL, ARKESHS D, HENRY JW et al. Effect of dietary tryptophan on plasma and brain tryptophan, brain serotonin, and brain 5-hydroxyindoleacetic acid in rainbow trout. *J Nat Biocem* 1990; 1:49–54.
3. LEVON O, TORSTAN O, WESLING S. Elevated dietary L-tryptophan counteracts the stress-induced elevation of plasma cortisol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol* 2002; 205:3679–3687.

4. FERINSTRÖM JD. Role of precursor availability in control of melatonin biosynthesis in brain. *Physiol Rev* 1983; 60:484-516.
5. FERINSTRÖM JD, WILDMAN RJ. Brain serotonin content: regulation by plasma neutral amino acids. *Science* 1972; 178:414-416.
6. WILDMAN RJ, OVERLI O, LEPAGE O. Suppression of aggression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by dietary L-tryptophan. *J Exp Biol* 2001; 204:3467-3474.
7. LEPAGE O, VÉLEZ LM, POTTINGER TG et al. Time-course of the effect of dietary L-tryptophan on plasma cortisol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol* 2003; 206:3589-3599.
8. DENARON JG, DODMAN NH, SEWSTER L et al. Effect of dietary protein content and tryptophan supplementation on dominance aggression, territorial aggression, and hyperactivity in dogs. *J Am Vet Med* 2000; 217:504-508.
9. SIEGA MM, KUGZEL WJ, MENCHE JA. A technique for cannulating estrone traps and sampling cerebrospinal fluid from socially housed birds. *Poultry Sci* 1994; 73:556-563.
10. MACKENZIE CR, GAYLOR B, PASCHENYEN GM et al. The binding protein α -lactalbumin increases the plasma ratio of tryptophan to the other large neutral amino acids, and in eubiotic subjects raises brain serotonin activity, reduces cortisol concentration, and improves mood under stress. *Am J Clin Nutr* 2000; 71:1536-1544.
11. CASSIDY VM. Melatonin's role in vertebrate circadian rhythms. *Chronobiol Int* 1998; 15:457-473.
12. CARRON J. Cellular circadian clocks in the pineal. *Prog Neurobiol* 1999; 58:121-162.
13. FERRERIN P, MORIN H. The pineal organ of teleost fishes. *Rev Fish Biol* 1997; 7:199-244.
14. MURRO AD. Effects of melatonin, serotonin, and melatonin on aggression in isolated cichlid *Sphaeramia orbiter*. *J Pineal Res* 1988; 3:253-262.
15. XU F, LI JC, MA SC et al. Effects of melatonin on hypothalamic gamma-aminobutyric acid, aspartic acid, glutamic acid, beta-endorphin and serotonin levels in mice. *Biol Signals* 1995; 4:225-231.
16. RAO NYA, RAZA B, PRASAD JK et al. Melatonin decreases glucocorticoid blood concentration in the rat and palm squirrel, acting directly on the adrenal gland. *Biomed Res* 2001; 22:115-117.
17. CARDINALI DP, VAGAS MI, KELLER SARRIENTO MI et al. Neuroendocrine integrative mechanisms in mammalian pineal gland: effects of steroid and adrenohypophysial hormones on melatonin synthesis in vivo. *J Steroid Biochem* 1987; 27:565-571.
18. BÉGGAY V, FALGÓN J, THIBAUT C et al. Pineal photoreceptor cells in culture: fine structure, and light-dark control of cyclic nucleotides levels and melatonin secretion. *J Neuroendocrinology* 1992; 4:641-651.
19. BERNIS GA, PASC SF. Melatonin levels in the gastrointestinal tissues of fish, amphibians, and reptile. *Gen Comp Endocrin* 1997; 102:415-419.
20. HETHER G, BRUGLER B, REINER A et al. Effect of tryptophan administration on circulating melatonin levels in chicks and rats: evidence for stimulation of melatonin synthesis and release in the gastrointestinal tract. *Life Sci* 1992; 51:945-953.
21. WILDMAN RJ, WILDMAN E, O'HELIRO R et al. Studies of the 24 hours rhythm of melatonin in man. *J Transm Suppl* 1978; 13:525-377.
22. OVERLI O, HARRIS CA, WENBERG S. Short-term effects of lights for social dominance and the establishment of dominant-subordinate relationships on brain monoamines and cortisol in rainbow trout. *Brain Behav Evol* 1999; 54:262-275.
23. OGPIN YA, FALK R, REED OD. Cortisol and lactate levels of Atlantic salmon, *Salmo salar*, developing infectious anaemia (ISA). *Dis Aquat Org* 1992; 14:99-104.
24. WILDMAN RJ, LINDSEY G. Elevation of brain 5-HT activity, POMC expression, and plasma cortisol in socially subordinate rainbow trout. *Am J Physiol* 1998; 43:645-651.
25. MAYER J. Effect of long-term pinealectomy on growth and pyroglutamic nitrogen in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquat Living Res* 2000; 13:171-184.
26. FRASER S, COWEN P, FRANKLIN M et al. Direct radioimmunoassay for melatonin in plasma. *J Clin Chem* 1983; 29:396-397.
27. VAKKURI O, RINTAMAKI H, LEPPÄLÖTTÖ J. Presence of immunoreactive melatonin in different tissue of the pigeon (*Columba livia*). *Gen Comp Endocrinol* 1985; 68:69-75.
28. BERNIS GA, BROWN GM, GILES LJ. Immunohistochemical localization of melatonin in the digestive system of the rat. *Experientia* 1977; 33:662-663.
29. HILTON G. Contribution of extrapineal sites of melatonin synthesis to circulating melatonin levels in higher vertebrates. *Experientia* 1992; 49:665-670.
30. YAGA K, REITER RJ, REHMANI BA. Tryptophan loading increases daytime serum melatonin levels in intact and pinealectomized rats. *Life Sci* 1993; 51:945-953.
31. KROKALIN NT, KRYZHEVA IM, TOKSHEVA VS. Melatonin may be synthesized in enterochromaffin cells. *Nature* 1975; 225:344-345.
32. YONGE J, MESSA H. Secretion of methoxyindoles from trout pineal organs *in vitro*: indication for a paracrine melatonin feedback. *Neurochim Int* 1993; 27:195-200.
33. WIKARYN N, PRINCECK JP. Melatonin inhibition of pineal enzymes in *Columba*. *gen Comp Neuroendocrinology* 1975; 19:184.
34. AXELSSON M, DUNNE W-R, FARRER SP et al. Regulation of cardiac output and gut blood flow in the sea roach, *Rhinichthys mirabilis*. *Fish Physiol Biochem* 1989; 6:315-321.
35. AXELSSON M, FRIESTEDT R. Effects of exercise, hypoxia and feeding on the gastrointestinal blood flow in the Atlantic cod *Gadus morhua*. *J Exp Biol* 1994; 158:181-190.
36. HOLMSTEDT S, AXELSSON M, GARNELL AP. The effect of catecholamines, substance P and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on blood flow in the gut in the dogfish, *Squalus acanthias*. *J Exp Biol* 1992; 168:161-175.
37. AXELSSON M, THORAKOSEN H, NUSSEN S. Gastrointestinal blood flow in the red fish Lord, *Melanoplites leucomelanopterus*: long-term effects of feeding and autonomic control. *J Comp Physiol B* 2000; 170:145-152.
38. AXELSSON M, FRIESTEDT R, GRÖN D et al. Effects of drug, feeding and drugs on the gastrointestinal blood flow in the crocodile, *Crocodylus porosus*. *Acta Physiol Scand* 1991; 142:509-516.
39. ISHINE WF, OUYERAN GH, CHAMBERLAIN GA. Vasomotricity of adrenergic innervation covering the canine gastrointestinal tract. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1964; 248:75-87.
40. KANAKYRENA R, MIREY Y, ACHILLEU GEX et al. Chronic melatonin treatment and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat: attenuation of the secretory response to stress and effects on hypothalamic neuropeptide content and release. *Behav Brain Res* 1997; 89:587-596.

41. LARSON ET, WINDERG S, MAYER I et al. Social stress affects circulating melatonin levels in rainbow trout. *Gen Comp Endocrinol* 2004; **136**:322-327.
42. TORRES-FARRAN C, RIVERO HG, ROSAS GARCIA P et al. Melatonin receptor in the pituitary adrenal gland: inhibition of adrenocorticotropin-stimulated cortisol production by melatonin. *J Clin Endocrinol Metabol* 2005; **89**:450-458.
43. MURTON T, SHIMADA N, KAZAKI H-W et al. Melatonin mediates the light-induced sympathoadrenomedullary and vagal suppression with participation of the suprachiasmatic nucleus in mice. *J Physiol* 2003; **547**:117-132.
44. HJØR G, RØDENBECK A, EHRENTJED HD et al. No evidence for a physiological coupling between melatonin and glucocorticoids. *Psychopharmacology* 1997; **133**:313-322.
45. MARKIN CR, PANNHUYSEN G, TRITEN A et al. Effects of food on cortisol and mood in vulnerable subjects under circadian and uncontrollable stress. *Physiol Behav* 2000; **70**:333-342.
46. HIGGINS B, BARR PJM, WOODS S. Stimulatory effects of 5-HT_{1A} receptors on adrenocorticotropic hormone and cortisol secretion in a teleost fish, the Atlantic halibut (*Halibius alpinus*). *Neurosci Lett* 2002; **324**:193-196.

In the matter of:

European Patent No. 3197290B1
In the name of Europharma AS

-and-

Opposition by Cargill, Incorporated (O1)
Biomar Group AS (O2) Nutreco IP Assets B.V. (O3)

Fourth Declaration of Dr. William Harris

1. INTRODUCTION

I have previously provided two declarations in the matter of EP3197290B1, dated the 29th October 2020 and 14th April 2021 brought before the Opposition Division. I understand that in the present proceedings, my previous declaration is numbered D44 and D70, respectively. A third declaration, dated 3rd December 2021, was to my understanding filed with the grounds of appeal of the proprietor.

In preparation of the fourth declaration, I have been asked to comment upon documents relied upon by Nutreco and Cargill filed in support of said opponent's novelty attack. In preparation of this report, I have been provided copies of the following documents:

Grounds of appeal of Cargill, Incorporated (Cargill in the following), dated 20th December 2021, with enclosures

Grounds of appeal of Biomar Group AS (Biomar in the following), dated 17th December 2021, with enclosures

Grounds of appeal of Nutreco IP Assets B.V. (Nutreco in the following), dated, dated 20th December 2021, with enclosures

Opposition Division's decision dated 18th August 2021

Luzzana et al (1994), Aquaculture International, 2, pp. 239 – 248 (D76OP3)

Berrill et al., (2004) Aquaculture, 242, 513 – 528 (D78OP3ENG)

English translation of an excerpt of text book "Fiskeoppdrett med framtid" (1986) (D78OP3ENG)

Copy of data set from freshwater phase of Atlantic salmon smoltification trial performed by AquaBioTech Malta sponsored by STIM.

In addition, in order to address papers relied upon by Nutreco's and Cargill's, in their statement of reasons for the appeal, I find the following documents to be of relevance:

Sikorski, Z and I Kolodziejska (1986) The composition and properties of squid meat. Food Chemistry 20:213-224.

Jhaveri, SN, PA Karakoltsidis, J Montecarvo Jr and Constantidides. (1984) Chemical composition and protein quality of some southern New England marine species. J. Food Sci. 49:110-113.

Ozden, O. and N Erkan (2011) A preliminary study of amino acid and mineral profiles of important and estimable 21 seafood species. Brit. Food Journal 113:457-469.

Mollah, S, AD Pris, SK Johnson, AB Gwizdala and RS Houk (2000) Identification of metal cations, metal complexes, and anions by electrospray mass spectrometry in the negative ion mode. Anal. Chem. 72:985-991.

Silva, MS, V Sele, JJ Sloth, P Araujo and H Amlund (2019) Speciation of zinc in fish feed by size exclusion chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry – using fractional factorial design for method optimization and mild extraction conditions. J. Chromatography B 1104:262-268.

Moore, L.J., Somamoto, T., Lie, K.K., Dijkstra, J.M., Hordvik, I. 2005. Characterization of salmon and trout CD8 α and CD8 β . Molecular Immunology 42:1225-1234.

Nilsen, TO, Ebbesson, LOE, Madsen, SS, McCormick, SD, Adersson, E, Björsson, BTh, Prunet, P, Stefansson, SO. 2007. Differential expression of gill Na⁺, K⁺-ATPase α - and β -subunits, Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ cotransporter and CFTR anion channel in juvenile anadromous and landlocked Atlantic salmon *Salmo salar*. The Journal of Experimental Biology 210:2885-2896

Striberny, A. et al. (2021) More than one way to smoltify a salmon? Effects of dietary and light treatment on smolt development and seawater growth performance in Atlantic salmon. Aquaculture 532: 736044.

McCormick, SD, AM Regish, AK Christensen and BT Björnsson (2013) Differential regulation of sodium-potassium pump isoforms during smolt development and seawater exposure of Atlantic salmon. J. Exp. Biol. 216:1142-1151.

2. NUTRECO'S STATEMENTS OF GROUNDS FOR APPEAL

2.1 Nutreco has provided a Declaration of Mr. Greg Deacon.

RESPONSE: The experiments performed by MariCal for patent WO'0182 used small fish (25 gm Table I) and (15gm Table 19). We did not utilize any of Moore Clark's Select 6+6 Smoltification Diets as their pellet sizes (smallest 2.0 mm) were too large for the fish used in our experiments. Thus, the compositional analysis provided in Mr. Deacon's declaration is not referable to the experimental diets that we utilized.

2.2 Nutreco arguing that the D40 feed is suitable for feeding Salmonidae

Page 12 of Nutreco's Grounds of Appeal text states that the D40 feed (mud crab feed) is suitable for feeding Salmonidae. To support their claim, Nutreco has provided several new references in addition to

an expanded explanation particularly with regard to the low lipid content (8.78%) of crab feed as compared to commercial pelleted salmonid smoltification feeds.

RESPONSE: Several issues summarized below are highly problematic in concluding the D40 feed could be used as a smoltification feed for Salmonidae.

2.2.1 Berrill et al. (2004) – D77OP3

Nutreco's appeal states that D77OP3 shows that dietary lipid does not have a significant effect on growth and the decision of undergo smoltification in salmon parr.

RESPONSE: These data results and experimental design do not provide conclusive evidence for this statement.

Atlantic salmon parr were fed diets containing either low (12.5% lipid) or high (25% lipid) for 98 days under continuous light exposure after which they were fed the alternative or same diet under natural photoperiod conditions. Differences in the growth of these fish were assessed together with the ratios of fish that entered the upper mode group (UMG) associated with ideal size-dependent smoltification vs. lower mode group (LMG) that is associated with reduced or absent smoltification. To assess the smoltification of fish in the UMG, the authors performed a limited number of gill Na⁺K⁺ATPase activity measurements. The authors did not assess the LMG smoltification gill Na⁺K⁺ATPase activity status.

Table I of D77OP3 provides the composition of the low and high lipid crumble and pelleted experimental diets used in the study. It is noteworthy that these two experimental diets are significantly different in ingredients other than just lipid content. Among these differences present in both the crumble and pelleted diets are: 1) 17% soybean meal in low lipid diet vs. 0% in high lipid diet; 2) 65-67% fishmeal in high lipid diet vs. 50% in low lipid diet and 3) 9-10% rapeseed meal in the low lipid diet vs. 0% in the high lipid diets. Since plant-based proteins are known to have significant antinutritional effects, it is likely that the inclusion of such-based ingredients in only one diet complicates the interpretation of these data.

While the authors observed no overall differences in growth (Figure 2) or condition factor (Figure 3) between fish fed either 12.5% vs. 25% lipid diets, they did note a significant difference between the ratio of the fish present in the UMG vs LMG in the 12.5% lipid diet vs. the ratio of UMG/LMG obtained by fish fed the 25% lipid diet (see Figure 6). Fish that were fed the low lipid 12.5% diet displayed increased numbers of fish in the LMG (~40%) vs. UMG (~60%) as compared to the UMG (70%) /LMG (30%) ratio for fish fed the higher lipid 25% feed. Based on the authors' criteria of size dependent smoltification, a reduced number of fish achieved an UMG status that is necessary for good smoltification. In short, the low lipid diet reduced the number of fish that entered the UMG for smoltification.

Only a limited number (n=3) of gill Na⁺K⁺ATPase measurements were performed only on UMG fish from each test group at each sampling point (Figure 5). The reason that the authors did not perform of gill Na⁺K⁺ATPase measurements on the LMG is that these fish were regarded as not having achieved satisfactory smolt status. The authors described a "blunting" of gill Na⁺K⁺ATPase activity in the UMG 12.5/12.5 group in the final sample that was not statistically significant. This reduction in Na⁺K⁺ATPase activity is usually associated with a loss of smolt status as the fish leave the "smolt window".

2.2.2. Luzzana et al. (1994) – D76OP3

RESPONSE: The D76OP3 rainbow trout dietary study was performed on fish that averaged 214.7 gm that were reared in freshwater prior to and for the duration of the study. These trout are much larger than a normal size that would undergo smoltification and the process of smoltification in these fish were not studied using any standard parameters. The fact that such larger trout can grow (albeit more slowly) on aquafeeds containing a lower fat content (8.4%) and a reduced essential fatty acid content is not directly relevant to the question regarding whether such diets are suitable for growth and proper smoltification of salmonids including Atlantic salmon.

2.2.3 Fiskeoppdrett med fremtid – Fish Farming with Future 1986 -D78OP3ENG

RESPONSE: This D78OP3 citation is quite old (1986) and makes a general statement about the lipid content of fish feed without reference to specific requirements of juvenile salmonids undergoing smoltification vs. the same fish species at other life stages and sizes during their commercial grow out. The reference's statement of concerns relating to a higher fat content of feeds being associated with diseases and other difficulties stems from problems with preventing feed lipids from becoming oxidized prior to feeding that was a technical problem at the time this article was written. This technical issue has been addressed and no longer is the problem as it was in the past, as was also the situation at the priority date.

2.2.4 Nutreco comments on logic regarding lack of novelty for Claim #1 over D40:

RESPONSE: The statements contained in my earlier declaration (D70) regarding D40 were quite specific in their reference to D40 feed "would not be suitable for diets that could be fed to either Atlantic salmon parr or smolt". In the next paragraph, I stated that "Feeding of Atlantic salmon (parr or smolt) the Leopoldo diets would likely result in significantly reduced growth caused by too low levels of fat and energy. Reduced growth during the freshwater phase would be expected to negatively affect these fish both when parr go through the smoltification process as well as their survival after transfer to seawater.....". The data provided by D77OP3 supports this claim since fewer fish achieve the UMG category enabling them to go through smoltification. Nutreco's statements regarding D77OP3 as "suitable for feeding to salmonids" is different and much broader than a feed suitable for smoltification.

3. CARGILL'S STATEMENTS OF GROUNDS FOR APPEAL

On page 16, Cargill alleges that the claims of the Main Request lack novelty over WO 02/30182 A1.

Inter alia, Cargill refers to Claim 18 of '0182 (D2) which by the means of language and wording allows for more than one PVCR modulator. Cargill furthermore refers to that D2 mentions several PVCR modulators on pages 15 line 26 to page 17 line 5.

RESPONSE – While the claims of D2 do describe the possible inclusion of one or more PVCR modulators included in the feed, Claim 18 of D2 makes no reference to the Ca²⁺ and/or Mg²⁺ contents of the feed, moreover there is no mention of the particular amounts of these ions that are contained in such feeds. The composition of minerals in the test feeds disclosed in D2 are not provided. In fact, the experimental data shown in Table 1 page 44 of D2 provided evidence that addition of PVCR modulators in the form of Ca²⁺ and Mg²⁺ in the diet of the fish maintained in standard hatchery rearing water actually reduced not

increased the survival of Atlantic salmon after their transfer to seawater. In further work that is summarized in Table 19 of Example 7 of D2, an effort was undertaken to increase the survival of smaller fish after their transfer to seawater via the use of a diet containing a combination of NaCl together the amino acid, L-Tryptophan where such fish are reared in water containing 3mM Ca²⁺ and 1mM Mg²⁺. No benefit was observed upon the addition of MgCl₂ to this D2 process.

Cargill has described on page 17 and as part of its Exhibits to its appeal, calculations using the calcium content of squid to estimate its contribution to a diet outlined in D2. For their calculations, they include a citation from www.nutritionvalue.org as published literature source. This reference states that squid possesses a calcium content of 320 mg/Kg or 0.32 gm/kg. On this basis, Cargill concludes that the total base diet comprises 0.096 gm/kg calcium.

RESPONSE: It is known that the calcium content of squid obtained from various sources is not a fixed value but can vary significantly depending on harvest locations, seasonality, etc. The table below summarizes data from three different peer-reviewed published sources that report values for calcium content ranging from 0.1 – 1.09 gm/kg (See References). Several of the reported calcium values provide an estimate of the calcium contribution from squid at < 0.036 gm/kg at 30% inclusion. Regardless of the specific calcium content of these reported numbers, it is evident that it is not possible to accurately estimate the calcium contribution of squid without direct measurement of its calcium content. Taken together with uncertainty about the calcium content of other ingredients (Corey Aquafeeds Flounder Diet), it is not possible for me to provide an accurate estimate of the Ca²⁺ content of this D2 diet containing squid.

Reference Source	Reported Value	Calcium contribution at 30% of the Diet	
		gm/kg	gm/kg
Sikorski 1986	10-109 mg/100gm	0.1-1.09	0.03 - 0.327
Jhaveri 1994	11.69 mg/100gm	0.117	0.0351
Ozden 2011	125.43 - 546.4 mg/kg	0.125 - 0.546	0.0375 - 0.1638

Cargill further notes that D2 discloses other PVCR modulators that can be added to a base diet.

RESPONSE: While D2 does disclose a series of PVCR modulators that may be incorporated into a base diet, all of these additions were listed with the intent that such PVCR modulators be used in D2 diets in conjunction with PVCR modulators that are included at specific concentrations in the rearing water of the fish.

Cargill states that Table 19 entry 6 of Example 18 of D2 contains data from an experimental arm of a study where fish were fed a base diet containing a combination of NaCl, Tryptophan with or without addition of 2% MgCl₂. According to Cargill, the diet containing a combination of NaCl, Tryptophan and MgCl₂ produced a reduction in fish mortality after SW transfer to SW, so Table 19 entry 6 provides subject matter that patent EP'290 is not novel over D2.

RESPONSE: Table 19 entry 6 of Example 17 (designation of #18 likely misprint by Cargill) of D2 contains data where fish were fed a base diet containing a combination of NaCl, Tryptophan with (#6) or without (#3) addition of 2% MgCl₂ and fish were maintained in rearing water containing 3mM Ca²⁺ and 1mM Mg²⁺ for an interval of 2 weeks prior to seawater transfer. Thus, the cited D2 Table 19 experiment was performed under conditions where PVCr modulators were present in the rearing water and the feed. On the basis of these Table 19 data, the co-inventors and I concluded that “Inclusion of another PVCr agonist (MgCl₂) together with tryptophan does not improve the seawater survival when compared to tryptophan alone.” This experimental condition is very different than the method described in EP’290.

In an experiment summarized in Table I of D2, addition of Ca²⁺ and Mg²⁺ to the feed in the absence of the same ions in the rearing water produced an increase not reduction in fish mortalities after their transfer to seawater.

Furthermore, it is noted that experiments described in example 17 do not state which of the feeds disclosed in example 8 that are used in the test feeds. Thus, the skilled person cannot calculate the level of calcium in test feed 6. Even if he knew which of the test feeds that are used, he would still not know whether the mineral level of the test feeds, as he would not know what type of squid that were used, nor know the level of mineral in the flounder diet, nor know the level of minerals in the Moore Clark feed.

4. COMMENTS FOR GROUNDS OF APPEAL OF BIOMAR

On page 22 of their appeal document, Biomar’s argues that there is no evidence of any improvement over WO’0182 (D2) due to the fact that there is no true comparison between the feed and method disclosed therein and the SuperSmolt FeedOnly technology disclosed in EP’290.

RESPONSE – Development of the SuperSmolt feed-only disclosed in EP’290 is a major improvement as compared to the SuperSmolt process described in ‘0182 (D2). The ability to incorporate all PVCr modulators into the feed (EP’290) vs. the original process (WO’0182 A1) is significant from both a commercial and biological perspective. This improvement significantly reduced the cost and labor required to perform the SuperSmolt process. For example, in an actual (and typical) small scale tank-based SuperSmolt commercial deployment performed in 2004 using the ‘0182 process, Atlantic salmon parr (55gm) were being reared in large tanks (70 m³ or 70,000 liters/each) supplied by new (make up) freshwater at a rate of 1,200 liters/minute. Thus, this production tank had a turnover rate of its water every hour. In order to supply the appropriate PVCr modulators to the tank rearing water, a slurry of CaCl₂ and MgCl₂ was added twice per day. In order to further reduce the additions of these salts, the water volume of the tank was reduced temporarily before each addition and fish were supplied with extra oxygen. The actual use of salts for the ‘0182 SuperSmolt treatment was 120 kg of CaCl₂ and 60kg of MgCl₂ per tank per day. For a 20-day ‘0182 SuperSmolt treatment, this single production tank required 2.4 metric tons of CaCl₂ and 1.2 metric tons of MgCl₂.

Despite these considerable costs and added labor, the method described in WO’0182 A1 was selected by the co-inventors and me for commercial deployment for the following reasons:

- Data shown in Example 3 of WO’0182 A1 shows that PVCr proteins are present on cells on the external surface of fish (gills, skin, etc.). This raised concerns that a feed-only process might result in lack of modulation of external PVCrs that were bathed by rearing water and likely result in a

possible disruption of the physiological state of fish by modulation of internal PVCRCs only by a feed only process.

- In the year 2000, commercial fish farming hatcheries possessed a wide range of mineral contents in their source rearing water. Furthermore, hatcheries employed various additions of chemicals to the rearing water for treatments unrelated to smoltification. The MariCal's '0182 SuperSmolt team had two concerns regarding this fact. The first concern was that these variations in rearing water PVCRC ionic content might be a major contributor to the great variation in the quality of the smolt produced by the salmon farming industry at that time. The second concern for MariCal was that the SuperSmolt process might be altered by such variations in hatchery water ion content and therefore be unreliable as to the extent or duration of time necessary to achieve optimal results.
- Experimental data shown in Table 1 page 44 of WO'0182 A1 provided evidence that addition of PVCRC modulators in the form of Ca^{2+} and Mg^{2+} in the diet of the fish without any additions of PVCRC modulators to the rearing water actually reduced not increased the survival of Atlantic salmon after their transfer to seawater. Moreover, addition of Ca^{2+} and Mg^{2+} to the rearing freshwater without the addition of these same PVCRC modulators to control feed increased the survival of fish after their transfer to seawater. The addition of dietary NaCl further improved post seawater transfer survival. This process was then called APS Process I. These experiments were repeated multiple times with similar outcomes.

In an effort designed to further reduce the size of juvenile salmon or trout that could be successfully transferred to seawater, the co-inventors tested other dietary additions and changes in the concentrations of PVCRC modulators in the rearing water present in the APS Process I method to gain such improvements. The motivation underlying these experiments was that a possible modification of the APS process I that would allow further expansion of FW hatchery throughput of fish by reducing the size of smolts that could be successfully transferred to seawater. These experiments are summarized in Table 19 of Example 17 of WO'0182 A1 and were performed on small (15gm) juvenile Atlantic salmon. The experimental arms of #2-6 in Table 19 are performed with 3mM Ca^{2+} and 1mM Mg^{2+} present in the rearing water. This experiment utilized a reduction in the concentration of rearing water PVCRC modulators vs. APS Process I with resulting savings in salts etc. (see above). Experimental arm #1 is a control without addition of any PVCRC modulators in the rearing water. Experimental arm #2 uses the same feed addition (NaCl only) and achieved a 50% reduction in the number of mortalities after seawater transfer vs Control. Experimental arms #3-6 were designed with the intent of determining whether further reductions in mortalities could be obtained by the addition of dietary PVCRC modulators such as specific amino acids (TRP, HIS or TYR) as well as one combination of TRP + 2% MgCl_2 (Arm #6). Having obtained benefit from inclusion of dietary TRP and no further improvement with added MgCl_2 , the data in experimental arm #3 was the foundation of the APS Process II. Thus, the experimental design of the work described in Table 19 of WO'0182 was never intended to determine whether a feed only application could be developed but rather whether dietary PVCRC modulators could be added together with reductions in PVCRC modulators (Ca^{2+} and Mg^{2+}) to further improve the basic APS I process. These steps were distinct from any steps designed to create a feed only SuperSmolt Process as described in EP'290. Nowhere in WO'0182 is it

suggested that adding Ca^{2+} to the feed would have any benefits to the smoltification process. The experimental data of WO'0182 is clear in that calcium should be added to the rearing water.

Page 26, Section 7.2 Sufficiency: BioMar asserts that the feed described in EP'290 claim 1 could not be made by a skilled person since the claimed feed consists of ions of Ca^{2+} , Mg^{2+} and Na^+ that are provided both by additions to the basic feed as salts but also such ions are also provided via various other ingredients like fishmeal. Without the ability to measure these ions in the feed (for which there is no recipe) a skilled person would not be able to reproducibly make the feed.

RESPONSE: A skilled person could reproducibly make the feed described in EP'290 despite its complexity. Quantitation of the amounts of ions provided as salts such as CaCl_2 , MgCl_2 and NaCl is straightforward due to their high degree of water solubility. Such analytical methods are widely available using commercial laboratory sources. The total elemental content of a feed such as its calcium, magnesium or sodium content are also routinely performed on feedstuffs using commercial laboratory methods such as flame photometric or sample digestion followed by chemical analyses. To quantify the variety of Ca^{2+} , Mg^{2+} or Na^+ ions where each are present in various states including complexed with specific anions like Cl^- where such ions for Ca^{2+} include CaCl_2 as well as CaCl^+ in a complex mixture like a feed, the use of mass spectrometry analysis is suitable method. It has been demonstrated that various ionic states of alkaline earth metals and other divalent metals such as Ca^{2+} in the form of chloride and other salts and Mg^{2+} in the form of chloride and other salts can be identified quantitatively in complex mixtures by mass spectrometry (Mollah, et al. 2000). These methods have been applied previously to fish feeds such as those for Atlantic salmon to determine the speciation of Zn^{2+} by coupling size exclusion chromatography with mass spectrometry measurements (Silva et al. 2019). Since Ca^{2+} and Mg^{2+} are also divalent metals the same techniques can be applied to quantify the amount of these divalent cations as specific salts (e.g. chlorides) within fish feeds.

5. REVIEW AND EVALUATION OF FRESHWATER PHASE OF ATLANTIC SALMON SMOLTIFICATION TRIAL WITH VARIOUS EXPERIMENTAL FEEDS PERFORMED BY AQUABIOTECH MALTA SPONSORED BY STIM AS.

Overview: I was requested to review data obtained from a smoltification trial performed on juvenile Atlantic salmon using four test diets during an interval of 29 days in freshwater (FW). These test diets were designed to evaluate contributions and/or effects of various components of the SuperSmolt Feed-Only (SSFO) diet that is used commercially by the salmon farming industry.

Description of Data Set for Review: A combination of performance and biological analyses were obtained from juvenile Atlantic salmon reared in a commercial hatchery as part of a smoltification trial performed in an aquatic laboratory using a tank-based partial RAS system as described below. Data was collected from fish for multiple analyses.

Materials and Methods:

Fish: Atlantic salmon parr (Stofnfiskur strain) were obtained in November 2021 from Landcatch Natural Selection Inverkerry hatchery Scotland where they were reared outdoors in the presence of ambient light. These fish were assessed for their smolt status using smolt scoring, K factor and health (Figure 1). As part of their health assessment, it was noted that these fish were in good health but exhibited external fin and opercular damage (51-85% showed external signs). After grading where an average wt. of 13.3

gm was obtained, salmon were transported without incident for trial testing to AquaBioTech Group’s aquatic laboratory in Malta via trucks equipped with tanks without supplemental lighting.

Smoltification Index and K Factor (n=27)

	Lateral Silver Colour	Parr Marks	Fin Edges Dark coloration	K Factor
Average	3.74	3.11	3.63	1.22
S.D.	0.45	0.42	0.56	0.1



Figure 1: Pre-trial average visual smolt scores (right) and appearance (left) of juvenile Atlantic salmon. See text for details.

Aquatic Laboratory Description: During the pre-trial and trial intervals, experimental groups of salmon were maintained in replicate tank units supplied with freshwater (RAS). Environmental parameters (photoperiod, water temperature, etc.) were maintained within specified ranges as summarized below. The fish and water quality were monitored daily according to good animal management practices. Fish density did not exceed 50 kg/m³. Fish mortality was closely monitored and dead fish were removed promptly from the system. Surface treatments performed on fish as described below according to well established protocols.

Temperature	12.5 ± 1.0 °C (heater set on 12)
Lux	450 Continuous
Flow	1.5 exchanges/hour
Source	Underground reservoir/Municipal water
RAS/Flow-through	RAS
Disinfection	Ozone and UV
Salinity	0-2 ppt
Alkalinity	3 times per week
Ca ²⁺	0,38-0,94mM/L (15-37.5ppm)
Na ⁺	15,2-18,1mM/L (350-416ppm)
pH	7.0 ± 0.5 (continuous)
O ₂	85-110% saturation in efflux water (daily)
CO ₂	<15ppm(daily) efflux water, every tank
TAN	<2.0 (daily)
Nitrate	70-250 (daily)
Nitrite	<5.0 (daily)
Turbidity	2 times per week

Test Feeds: The composition of four experimental feeds used in this trial are shown in Table II and were formulated for 44-46% protein and 21% lipid content. The Base feed was used as a control whereas the

three other feeds were designed to test the contribution(s) of specific components of the SuperSmolt Feed Only feed. Thus, the performance of fish receiving either the Base feed containing only SSFO salts (CaCl₂, MgCl₂ & NaCl) termed Base+SSFO salts or only added L-Tryptophan (TRP) termed Base+Tryptophan was compared to a complete SSFO diet that included both additions of SSFO salts together with Tryptophan (SSFO Complete).

Methods:

Performance Parameters – The performance of fish groups fed one of four test diets was monitored in the standard way with particular emphasis on determination of initial and final biomass numbers so as to determine both growth (specific growth rate – SGR) and feed conversion ratio (FCR) for each test group. Mortalities were promptly identified, recorded and removed from tanks and included in FCR calculations (FCR economic).

Table II: Composition of four test extruded feeds used in trial.

<u>Ingredient (%)</u>	<u>Base Feed</u>	<u>SSFO Complete</u>	<u>Base +SSFO Salts</u>	<u>Base + Tryptophan</u>
Fishmeal - LT	40.96	41.26	41.26	40.96
Krill Meal	3.2	3.18	3.18	3.2
Vital Wheat Gluten	5.77	8.23	8.23	5.77
Soy Protein Concentrate	10.59	8.13	8.13	10.59
Wheat	17.6	11	11	17.6
Fish Oil (14-18% EPA+DHA)	8	8	8	8
Rape Seed Oil	10.85	10.93	10.93	10.85
Vitamin Premix	0.5	0.5	0.5	0.5
CaCl ₂ (98%) (added)	0	0.78	0.78	0
MgCl ₂ (47%) (added)	0	0.53	0.53	0
NaCl	0	4.81	4.81	0
MCP (22.7%)	2.5	2.62	2.62	2.51
Carophyll pink (10%)	0.03	0.033	0.033	0.03
Tryptophan (added)	0	0.406	0	0.406

Sampling – For lethal sampling, fish were euthanized, measured for length and weight, blood was collected in heparinized tubes via the dorsal vein and gill arches dissected and removed for Na⁺K⁺ATPase and/or qPCR testing.

Visual Smolt Index – As part of sampling, fish were assessed for smolt status using 3 criteria (lateral line color; parr marks & fin edge dark coloration) by grading each parameter using a scoring system of (1-4) where parr =1 and smolt = 4.

Seawater Challenge Testing (SWC) – SWC testing was performed in the standard manner by transferring fish to full strength SW (35ppt) and maintained for an interval of 72 hours before blood sampling was performed to determine plasma chloride concentrations. In some SWC groups, gills of fish were also processed for qPCR Na⁺K⁺ATPase analyses (see below).

Plasma Chloride Quantitation - Plasma from salmon was analysed for chloride using Sherwood 926S instrument, with duplicate measurements for each sample. Instrument is calibrated prior to analysis, using 100 mmol/L Cl⁻ standard. A total of 20 µl of sample was added for each measurement.

Feeding – Feeding behavior was observed and recorded using the following scoring scale.

The following metrics will be determined daily throughout the experiment:

- Feeding behavior score
 - 0 = no feed was consumed, and fish show no interest in feeding;
 - 1 = 25% of the feed was consumed; fish showed little interest in feed;
 - 2 = 50% of the feed was consumed; fish showed a moderate interest in feeding;
 - 3 = 75% of the feed was consumed; fish showed moderate interest in feeding; fed below water surface;
 - 4 = 100% of the feed was consumed; fish fed aggressively; some fish broke the water surface during feeding.

Gill Na⁺K⁺ATPase activity testing – was performed by Eurofins and expressed as µmolADP/hr)/mg protein activity.

qPCR analyses – Quantitative PCR (qPCR) was performed by BiovivoTech AS (Bergen Norway) using standard methodology on gill tissue samples where the expression of alpha 1a and alpha 1b isoforms of Na⁺K⁺ATPase were quantified with well characterized PCR primers (Nilsen et al. 2007) using either duplex qPCR methodology or monoplex methodology where alpha 1a or 1b expression is benchmarked against elongation factor (Moore 2005). For such studies, gill tissue was harvested and placed in RNAlater until lab qPCR analyses.

Statistical Analysis – Data sets were tested for statistical significance using either T testing or Kruskal Wallis programs.

Experimental Design – Figure 2 shows a trial design outline. After transport, fish were acclimated in aquatic laboratory tanks for an interval of 21 days before initiation of the trial during which they were fed the commercial diet provided in their home hatchery. Fish were distributed in 3 tanks/test diet (n=90 fish/tank) before the start of the trial and selected fish removed from each of these tanks at designated intervals as shown in the timeline.

	<u>Pre-Trial</u>	<u>Sample 1</u>	<u>Sample 2</u>	<u>Sample 3</u>	<u>Sample 4</u>
SAMPLING DATE (Days)	-21	0	6	21	29
Commercial Feed	■				
Test Feeds		■	■	■	■
Smolt Scoring & K factor		X	X		X
Seawater Challenge	X	X	X	X	X
Gill Na⁺K⁺ATPase Test		X	X	X	X
Gill qPCR Testing		X	X	X	X

Figure 2: Schematic diagram of trial experimental plan for testing a total of 4 experimental diets described above.

Fish were assessed by SWC at 28 and 21 days before start of the trial that began immediately after Sample1. At the start of the trial (Day 0) fish were switched to individual test feeds and maintained for 29 days. During this interval, fish were sampled an additional total of 3 times (Samples 2-4)- Figure 2.

Results and Discussion:

General characteristics, feeding, survival, growth and FCR of fish fed each of the four test diets – Table III shows changes in the length, weight and K factor that occurred during the trial. The average K factor of these salmon at their original hatchery before transport was 1.22 (see Figure 1). It is notable that the average K values of all 4 groups of test fish were reduced the trial’s midpoint (k=0.92-0.99) as compared to the time zero average K value (1.02). This reduction occurred despite good growth in all fish receiving test diets and may have been the result of fish transitioning on to individual test diets as well as secondary effects of external Saprolegnia infections (see below). However, it is interesting that K values at the end of the trial for salmon fed either the Base control diet or complete SSFO + TRP test diet were greater vs. K value at the trial start. Table IV provides a summary of quantitation of daily feeding rates for trial fish. All four test diets were consumed at equal rates by their respective test groups. It is noteworthy that feeding was reduced slightly (only 3-4 days) in fish receiving Base+SSFO Salts and Base+TRP diets without change in the rates of the other two test groups.

Fish were assessed for smolt status using standard smoltification index measurements described in **Methods**. The overall smolt score for fish at trial’s inception was 3.49±0.55 (n=27). This value did not change significantly during the trial as overall smolt scores for all test groups were 3.48-3.56 (n=60).

Table III: Summary of body weights, lengths and condition factors (K) of fish fed one of four test diets for a total of 29 days and were evaluated at the beginning, middle and end of the trial.

	<u>Trial Start (No Exp. Feeds)</u>			<u>Mid-Trial Feeds</u>			<u>End of Trial Feeds</u>		
	<u>Wt.</u>	<u>Length</u>	<u>K</u>	<u>Wt.</u>	<u>Length</u>	<u>K</u>	<u>Wt.</u>	<u>Length</u>	<u>K</u>
Base Diet - Control									
Average	22.05	12.90	1.02	27.90	14.18	0.97 *	33.4	14.5	1.09 *
S.D.	3.25	0.67	0.06	4.73	0.80	0.05	6.33	0.97	0.07
N	72			25			25		
SSFO + TRP									
Average				28.72	14.22	0.99 *	31.44	14.41	1.05 *
S.D.				4.65	0.87	0.05	4.13	0.60	0.08
N				25			25		
Base Diet + SSFO Salts Only									
Average				27.68	14.08	0.99 *	32.60	14.64	1.03
S.D.				2.95	0.59	0.05	5.49	0.93	0.06
N				25			24		
Base Diet + TRP									
Average				25.34	14.04	0.92 *	33.38	14.79	1.02
S.D.				2.99	0.53	0.06	5.26	0.74	0.04
N				25			25		

* K VALUES - Significant vs. Trial Start Value

Table IV: Quantitative assessment of feeding rates for salmon fed one of four different test diets.

	BASE	SSFO+TRP	BASE + SSFO SALTS	BASE + TRP
Av. Feeding Rate	3.48	3.46	3.45	3.43
SD	0.58	0.58	0.58	0.56

Table V compares the average body weights of fish (n=60 from each test diet group) at the beginning (n=60) and end (n=60) of the trial interval. All fish grew well and achieved a 54-56% increase in their respective average body weights. Table VI and Figure 3 show SGR and FCR values achieved by salmon fed each of the four test diets. There were no significant differences in either growth or feed conversion efficiency between the test groups.

Table VII compares the mortality rates displayed by each of the four test groups during the 29-day trial. All groups experienced significant problems with Saprolegnia fungal infections that may have been exacerbated by the fin damage present in the commercial hatchery where they were reared (see **Materials – Fish**). The Saprolegnia infections were confirmed by veterinarian assessments and treated by standard anti-fungal treatments with peracetic acid. The mortalities for all groups occurred in the slow accumulation of low daily numbers of mortalities throughout the trial.

Table V: Summary of initial and final average body weights for salmon fed one of four different test diets for 29 days.

	BASE	SSFO+TRP	BASE + SSFO SALTS	BASE + TRP
Average Initial Wt.	25.60	25.55	24.69	24.85
SEM	0.91	0.83	0.37	0.65
Average Final Wt.	39.47	39.42	38.56	38.72
SEM	0.91	0.83	0.37	0.65
% (Final Wt./Initial Wt.)	154.2%	154.3%	156.2%	155.8%
# of Tanks	3	3	3	3

Table VI: Summary of specific growth rates (SGR) and feed conversion ratios (FCR) achieved by fish fed one of four different test diets.

	BASE	SSFO+TRP	BASE + SSFO SALTS	BASE + TRP
Specific Growth Rate (SGR)	1.70	1.71	1.77	1.81
SEM	0.08	0.09	0.05	0.03
Feed Conversion Ratio (FCR)	0.84	0.80	0.78	0.75
SEM	0.08	0.13	0.11	0.01

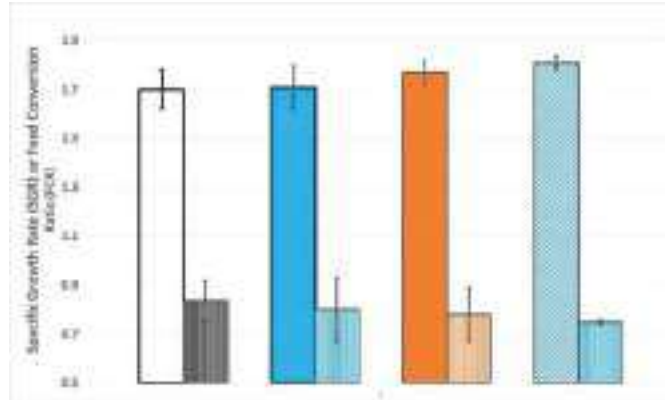


Figure 3: Graph of data shown in Table VI including both SGR and FCR values achieved by fish receiving one of four different test diets during the trial.

Table VII: Comparison of total mortalities displayed by each of the four test groups during the trial.

	BASE	SSFO+TRP	BASE + SSFO SALTS	BASE + TRP
Average Mortality*	14.8%	12.2%	13.7%	19.0%
SEM	0.7%	3.6%	3.2%	3.0%

*Saprolegnia Fungus

Seawater Challenge Data Analyses (Sampling 1-4) - In order to quantify the osmoregulatory capabilities of salmon receiving one of the four test diets, representative fish were selected from each trial tank at various points and subjected to a standard SWC test at 35ppt SW for a duration of 72 hours. Fish were not fed 9 hours before SWC test was performed. A total of 4 samplings (Sampling 1-4) were performed as part of the trial as well as two initial SWC tests at -28 and -21 days before the trial where only mortalities and plasma Cl⁻ values were obtained.

The two pre-trial SWC tests performed at -28 and -21 days were each composed of monitoring SW mortalities and plasma Cl⁻ measurements. A total of 26/30 fish survived the first SWC test (-28 days) where survivors averaged a plasma Cl⁻ value of 164.3±14 (n=21). A second SWC test (-21 days) composed of 53 fish yielded a similar average plasma Cl⁻ value (167.8±13.8; n=53) where the average plasma Cl⁻ values for these same fish in FW was 119.3±3.5 (n=27). Taken together, these pre-trial SWC data indicate that these juvenile salmon at this time were not osmo-competent.

SWC Tests for Trial Sampling 1, 2, 3 and 4 – A total of 4 SWC tests were performed during the trial where the first (Sample 1) was performed on fish pooled from all test tanks while the Sample 2-4 tests were performed on selected fish from each of 4 test diets. The SWC performed as part of sample 2 and sample 3 testing were comprised of a total of 15 FW fish and 5 SW fish were assayed from each diet. For sample 4 testing and analysis, a total of 5 FW fish and 10 SWC fish were sampled from each diet.

Since the sample size is limited (n=5) for sample 2 and sample 3 SWC tests, analysis of these data from Sampling 1-4 was performed using a combination of scatter point analyses and assignment of specific SWC Cl⁻ value categories was utilized as described below.

Analysis of Sample 1 – Pooled fish at start of trial - Table VIII shows Sample 1 data obtained from 99 fish (27 FW and 72 SW) at initiation of the trial. There was 100% survival of 72 fish subjected to SW exposure where 4 surviving fish appeared to be moribund at the time of blood sampling.

Table VIII: Summary of Sample 1 SWC Data and Plasma Cl⁻ Values After 72 hr. of SW.

Sample 1 Testing of Pooled Fish

	FW	SW -72 hr.
Average	119	135.5
SD.	3.5	10.8
N	27	72

Sample 1 Individual Fish SWC Cl⁻ Values

<u>Plasma Cl⁻ Range</u>	<u>N</u>	<u>% of Total</u>
119-128	20	28%
129-134	22	31%
>135	30	42%
Total	72	

These data contained in Table VIII as well as in figures 4 and 5 show that ~40% of the salmon displayed plasma Cl⁻ values >135 mM/L with many fish >145 mM (Figure 4). These data suggest that many of these juvenile salmon had not fully acquired the ability to hypo-osmoregulate as part of smoltification.

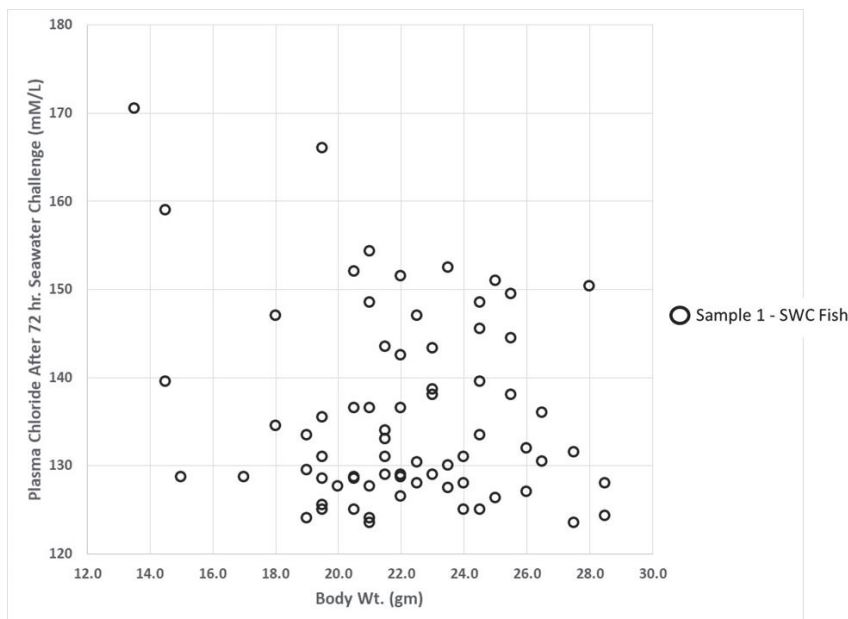


Figure 4: Scattergram of plasma Cl⁻ Values from 72 SWC Sample 1 salmon. Note the Y axis scale from 120 – 180 mM/L. See text for details.

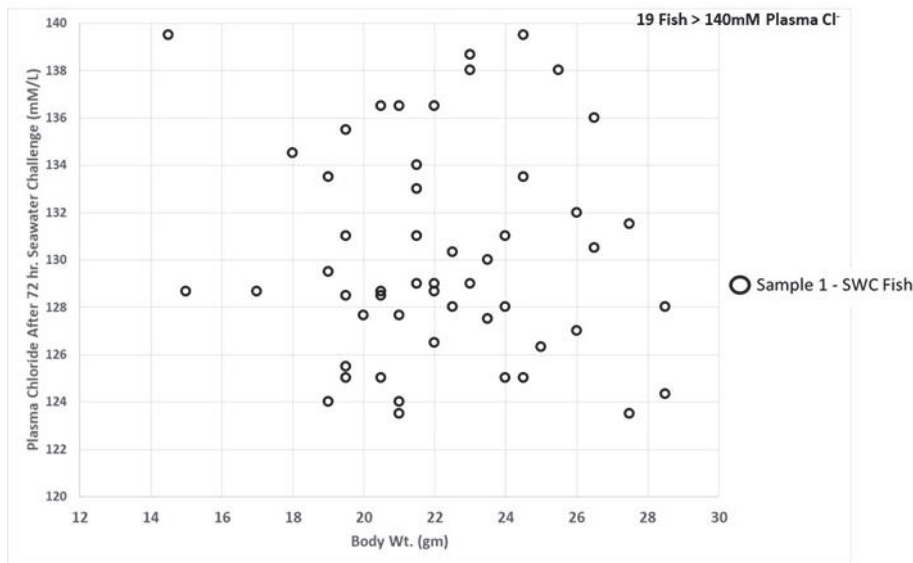


Figure 5: Scattergram of plasma Cl⁻ values of 123-140mM from 72 SWC Sample 1 salmon. Note that the 19 fish displaying plasma Cl⁻ values >140mM/L are listed at the upper right of the graph. See Figure 4 and text for details.

In order to analyze the variations in SWC plasma Cl⁻ values for fish collected in Samples 1-4, Cl⁻ values were divided into categories shown in Table VIII. Incremental increases of 9 mM/L (119 to 128mM/L), 6 mM/L (128-134mM/L) and a third category consisting of values greater than 134 mM/L were selected to chart the development of osmoregulatory capabilities in these trial fish.

Figure 6 shows plasma Cl⁻ values for Samples 1, 2, 3 and 4 after SWC in fish being fed one of the four test group diets. The distribution of SWC plasma Cl⁻ values in fish receiving the control Base diet changed from the beginning to end of the trial. At the start of the trial (-28 and -21 days), all fish displayed values >135 mM/L. At the end of the trial, SWC Cl⁻ values were distributed amongst the 3 categories. A similar pattern of changes in SWC Cl⁻ values was observed for fish receiving Base + SSFO salts and Base + Trp diets. By contrast, SWC Cl⁻ values for fish receiving the complete SSFO + TRP diet displayed 90% of its values in the lowest range of Cl⁻ values (119-128 mM/L) and no fish in the > 135 mM/L category by the end of the trial (Sample 4).

Plasma Cl ⁻ Range	Sample 1												
	Pooled	Base Diet			SSFO+TRP			BASE+TRP			BASE+SSFO SALTS		
	Sample	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 2	Sample 3	Sample 4
119-128	% of Total	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
119-128	28	0	60	30	0	80	90	0	40	70	0	40	40
129-134	31	0	40	40	40	0	10	60	20	20	60	0	50
>135	42	100	0	30	60	20	0	40	40	10	40	60	10

Figure 6: Comparisons of SWC Cl⁻ values from trial fish sampled at various points in the trial. Data are expressed as % of fish displaying plasma Cl⁻ values within each of three categories. Sample 1 pooled (n=72), Sample 2 (n=5/each diet), Sample 3 (n=5/each diet) and Sample 4 (n=10/each diet).

SWC plasma Cl⁻ data obtained in fish at the end of the 29-day trial are shown graphically in Figure 7. Note the distribution of plasma Cl⁻ values for the fish receiving the SSFO+TRP test diet (filled blue circles) as

compared to fish receiving either Base diet (open circles) or test diets containing only the SSFO salts (filled yellow triangles) or the amino acid tryptophan alone (red open squares).

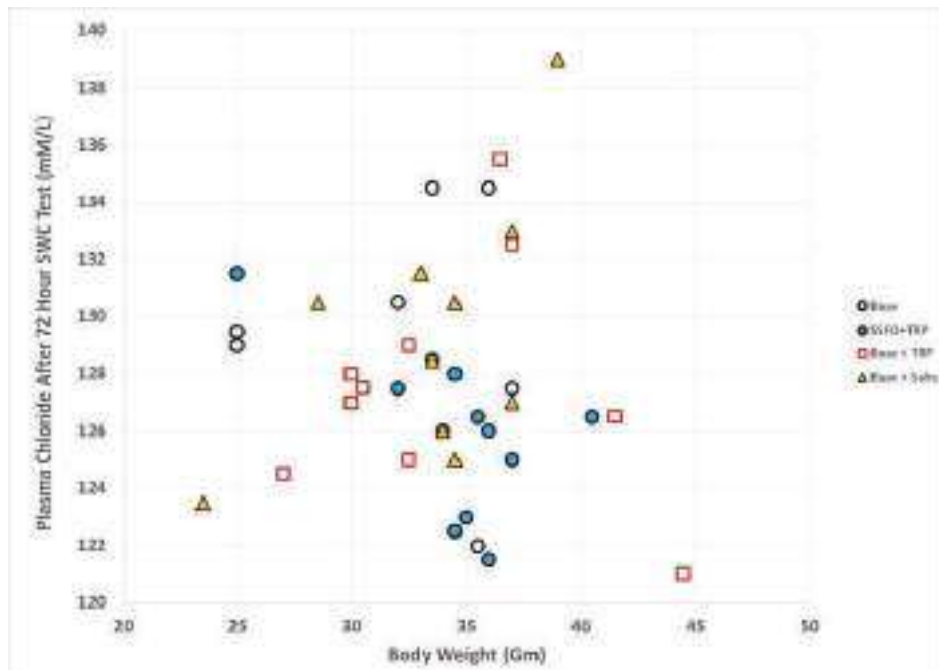


Figure 7: Distribution of SWC plasma Cl⁻ values of fish at the end of the 29-day trial.

Gill Na⁺K⁺ATPase Activity – At sampling points S1-S4, gill Na⁺K⁺ATPase activity was measured using standard commercial laboratory methods. These data are shown in Table IX for each of the test diet groups as well as a sample of fish pooled from all tanks prior to feeding each of the test groups (S1). Note that all four test groups of fish increased their gill Na⁺K⁺ATPase activity by ~2 fold during the trial from a baseline value of 9.4±3.2 at S1. These data are consistent with a combination of SWC testing (see above) and gene expression data (see below) showing that all four test groups of fish underwent smoltification. Significant increases in gill Na⁺K⁺ATPase activities were observed in S2-S4 samples of fish receiving the SSFO+TRP and Base+SSFO salts only diets as compared to values achieved by fish fed the Base Diet. By contrast, fish fed Base Diet + TRP displayed no significant increase in gill Na⁺K⁺ATPase activity as compared to Base Diet alone. The average gill Na⁺K⁺ATPase activity for SSFO+TRP value remained increased in fish in Sample 4 as compared to that possessed by fish fed Base diet but only a limited number of fish (n=5-6) were tested within each group.

Table IX: Summary of gill Na⁺K⁺ATPase activity from Atlantic salmon in trial. Activity expressed as μmolADP/hr/mg protein.

		(Pooled Fish)			
		Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
BASE	Average	9.4	14.1	17.9	17.8
	S.D.	3.2	3.4	6.3	3.7
	N	14	15	19	5
SSFO + TRP	Average		17.6*	20.8*	26.6*
	S.D.		6.5	4.8	6.8
	N		15	17	6
BASE + TRP	Average		15.4	17.2	15.6
	S.D.		3.6	5.3	1.9
	N		15	15	5
BASE+SS SALTS	Average		17.7*	23.2*	24.5
	S.D.		3.2	5.9	8.1
	N		14	15	5

* P<0.05 vs. Base Diet

Figure 8 compares the individual gill Na⁺K⁺ATPase values for fish in each test group in Sample 3 vs. values for fish at the beginning of the trial (Sample 1). These data show the increases in gill Na⁺K⁺ATPase values that occurred over the first 21 days of the trial. Gill Na⁺K⁺ATPase increased to the highest activities in multiple fish fed either the SSFO+TRP or Base + SSFO salts only diets and these values were greater than corresponding increases in Na⁺K⁺ATPase values achieved by fish fed the Base diet despite the fact that these fish possessed similar body weights.

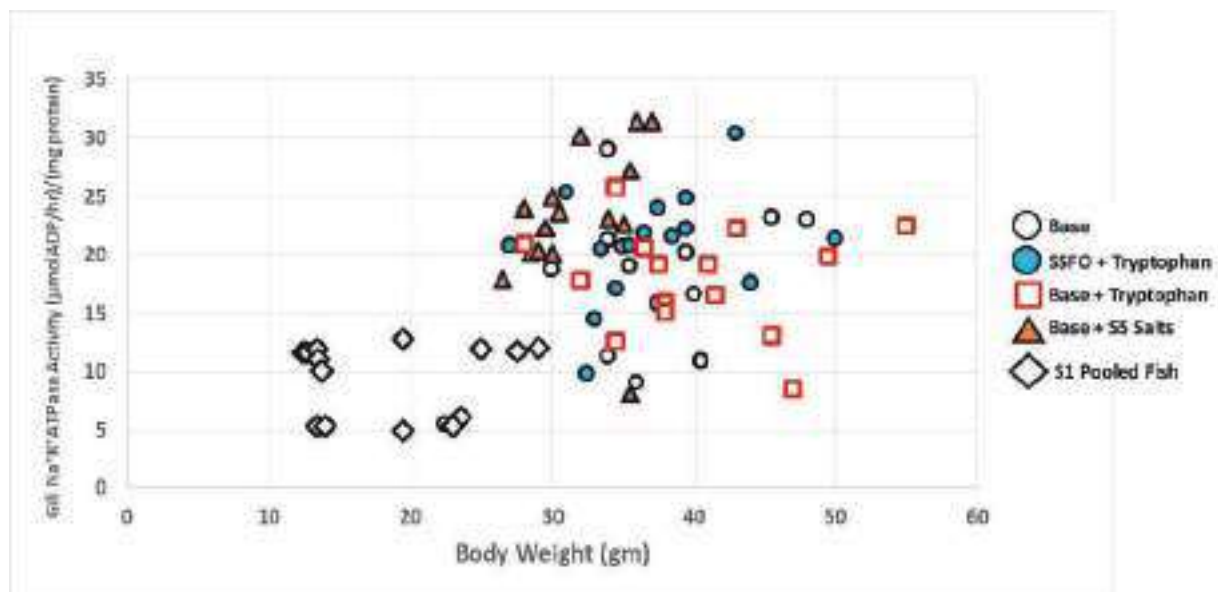


Figure 8: Comparison of gill Na⁺K⁺ATPase activities achieved by salmon fed various test diets at Sample 3 vs. values obtained from fish at the inception of the trial (Sample 1). See text and Table IX for details.

Na⁺K⁺ATPase alpha 1a and 1b gene expression data analyses of gill samples from trial fish - To further quantify the osmoregulatory capabilities of salmon receiving one of four test diets, gills were dissected from fish in each test diet group during Sampling 1-4 and subjected to qPCR analyses. Table X shows qPCR data obtained from fish in each test group that have been normalized to values obtained for pooled Sample 1 fish prior to the initiation of the trial. This method has been used in multiple published reports of smoltification including those testing SSFO (Striberny, et al. 2021). At the end of the FW trial (Sample 4), data was obtained for fish in each test group as well in fish that had been assayed using SWC testing (see Figure 7 above). These data are shown graphically in Figures 9-12 below.

Table X: Summary of normalized qPCR data obtained from gills of fish receiving one of four test diets that were sampled at intervals during the 29-day trial.

PRE-TRIAL Sample 1 (n=27) Alpha 1a Alpha 1b 1 1	TEST DIET	<u>Alpha 1a Expression Normalized Abundance</u>				<u>Alpha 1b Expression Normalized Abundance</u>				
		Sample 2	Sample 3	Sample 4 FW	Sample 4 SW	Sample 2	Sample 3	Sample 4 FW	Sample 4 SW	
		<u>Alpha 1a</u>	<u>Alpha 1a</u>	<u>Alpha 1a</u>	<u>Alpha 1a</u>	<u>Alpha 1b</u>	<u>Alpha 1b</u>	<u>Alpha 1b</u>	<u>Alpha 1b</u>	
Normalized For ΔCq and Expressed as Value Compared to Sample 1 Normalized ΔCq Value.	BASE	Average	0.67	0.67	0.77	0.29	0.96	0.84	0.87	0.94
		S.D.	0.22	0.41	0.21	0.29	0.17	0.20	0.11	0.11
	SSFO + TRP	Average	0.67	0.43	0.59	0.13	1.04	0.92	0.77	1.01
		S.D.	0.30	0.34	0.18	0.08	0.13	0.20	0.09	0.21
	BASE+ TRP	Average	0.93	0.62	0.36	0.20	0.93	0.91	0.64	0.82
		S.D.	0.36	0.34	0.30	0.14	0.16	0.18	0.38	0.30
	SSFO -SALTS ONLY	Average	0.55	0.50	0.81	0.11	0.91	0.92	0.95	0.98
		S.D.	0.31	0.23	0.36	0.08	0.15	0.11	0.22	0.11

Figure 9 shows data for expression of alpha a of gill Na⁺K⁺ATPase in fish from samples 2 and 3. It has been noted by multiple reports (Nilsen et. al. 2007; Striberny et. al. 2021) that during smoltification there are reductions in gill alpha 1a gene expression that occur over several months. By contrast, McCormick et. al. (2013) showed that reductions in alpha 1a protein occur after smolt have encountered SW exposure. Thus, it is noteworthy that in this study alpha 1a expression declined in all test groups vs. Sample 1 over the relative short interval of 25-29 days. Fish receiving the SSFO + TRP diet achieved the lowest value at 25 days (Sample 3) in the trial. The average alpha 1a values for fish receiving SSFO + TRP diet was significantly different vs. values achieved by fish receiving Base + TRP diet in Sample 2 and different from both fish receiving either Base or Base + TRP diets in Sample 3. Interestingly, there was also a significant increase in alpha 1a expression in fish receiving the Base + TRP diet vs. Base (Control) diet in Sample 2. Thereafter, the alpha 1a values for fish fed Base + TRP declined in Samples 3 and 4 (both FW and SW) similar to the decreases observed for other diets.

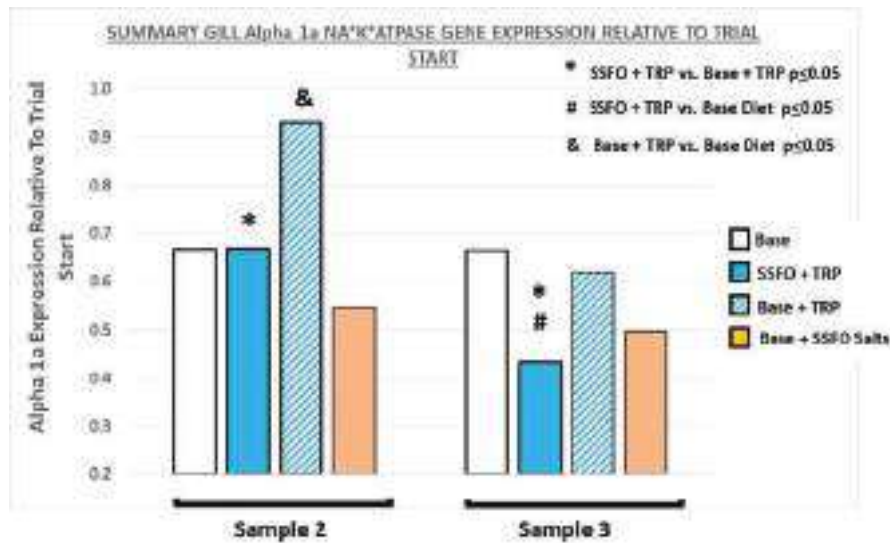


Figure 9: Summary of expression of Na⁺K⁺ATPase alpha 1a in trial fish from samples 2 and 3.

In fish obtained in Sample 3, alpha 1a values for fish receiving SSFO+TRP diet had declined further and were significantly different from both fish receiving the Base diet alone or the test diet containing Base + TRP.

Figure 10 shows the expression of the alpha 1b isoform in these same fish. In previous reports (Nilsen et al. 2007; Striberny et al. 2021), it has been noted that there is a modest increase in gill alpha 1b gene expression during Atlantic salmon smoltification. In this trial, fish receiving SSFO+TRP test diet displayed a significant increase in alpha 1b expression in both Samples 2 and 3 relative to the value observed for fish fed the Base diet. The alpha 1b expression was also significantly different vs. values obtained from fish fed a test diet containing Base + TRP in Sample 2.

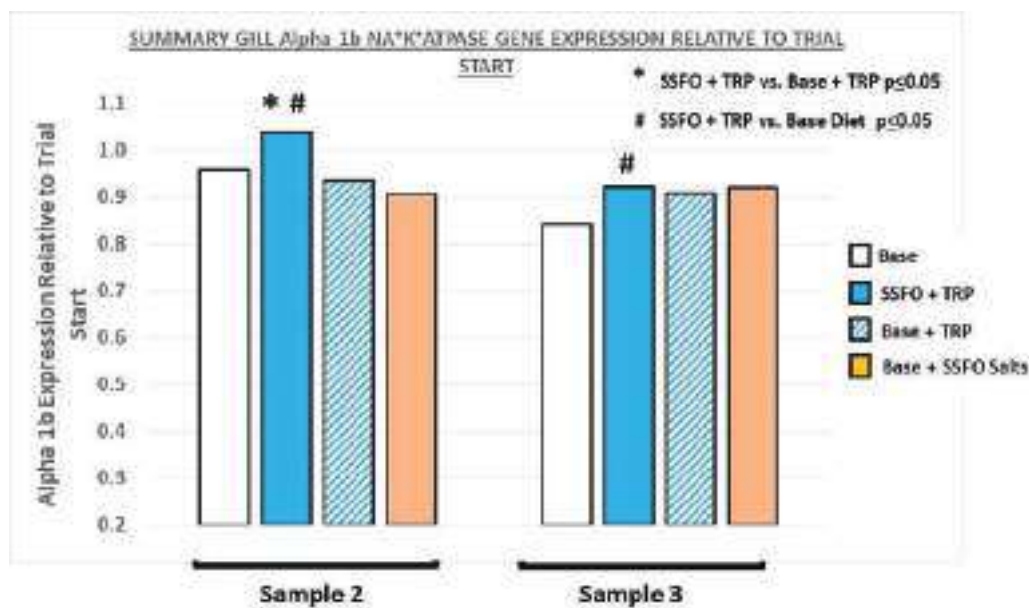


Figure 10: Summary of expression of Na⁺K⁺ATPase alpha 1b in trial fish from samples 2 and 3.

It has been noted by previous reports (Nilsen et. al. 2007; McCormick, et. al. 2013) that there is a simultaneous decrease in gill alpha 1a gene and protein expression and modest increase in alpha 1b gene and protein expression after transfer of Atlantic salmon to SW. Trial data obtained from Sample 4 fish for each of the test groups in FW and after 72 hr. of SWC are shown in Figures 11 and 12. These data show that fish receiving each of the four different test diets displayed a reduction in gill alpha 1a expression and corresponding increases in alpha 1b expression.

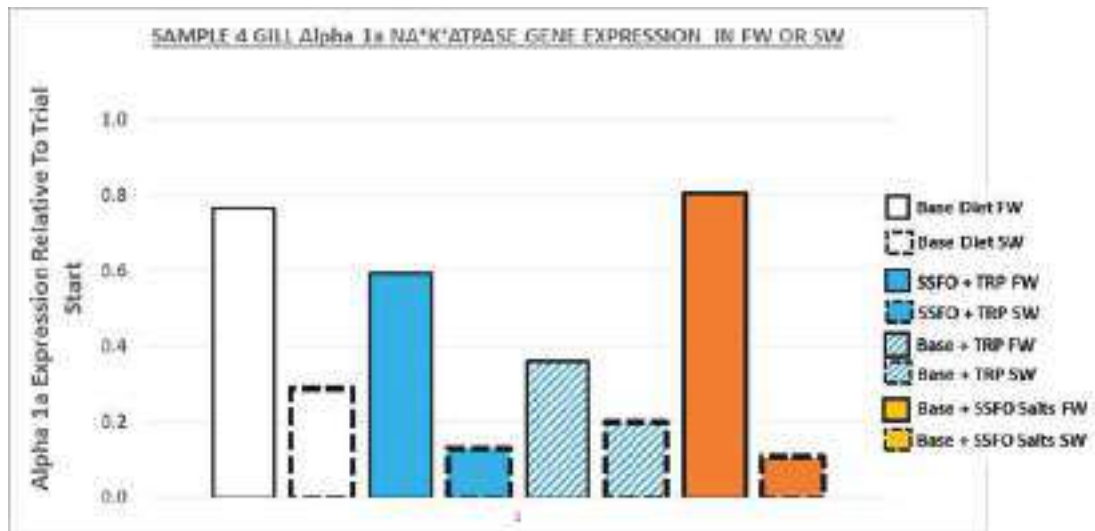


Figure 11: Summary of expression of Na⁺K⁺ATPase alpha 1a in trial fish at the end of the trial (Sample 4) in FW (solid border) and after 72 hr. SWC testing (dashed border).

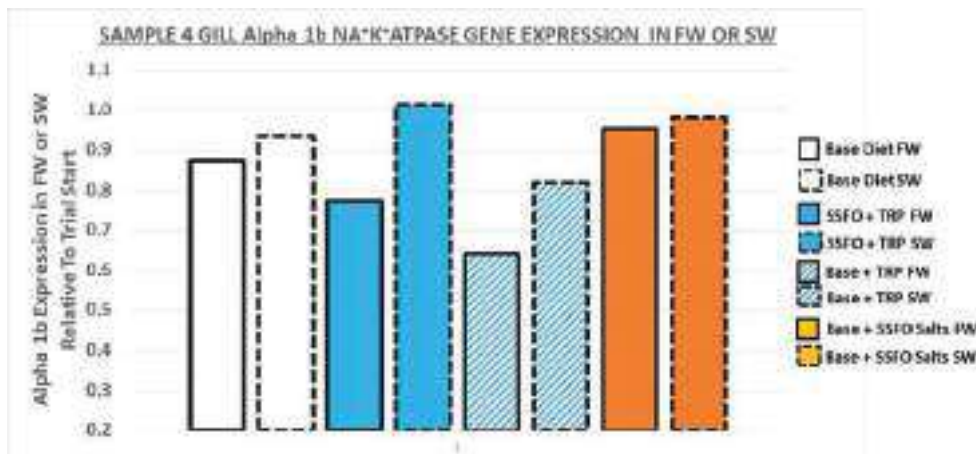


Figure 12: Summary of expression of Na⁺K⁺ATPase alpha 1b in trial fish at the end of the trial (Sample 4) in FW (solid border) and after 72 hr. SWC testing (dashed border).

Observations and Conclusions:

1. Data provided by this report indicate that the juvenile Atlantic salmon obtained from a commercial hatchery and used for this trial underwent smoltification during the trial period. This

includes fish that received the Base (Control) diet. Evidence supporting this conclusion includes: 1) elevated SWC plasma Cl⁻ values for fish prior to the initiation of the trial and reduction during the trial; 2) increases in gill Na⁺K⁺ATPase activities in trial fish and 3) corresponding changes in Na⁺K⁺ATPase gene expression

2. There was good growth and feed conversion in fish from all four test diets during the trial. There was elevated mortality amongst all groups due to Saprolegnia fungal infections that were treated using standard methods. The K factor of trial fish may have been influenced by these fungal infections in addition to the significant distance they were transported before the trial.
3. A combination of SWC plasma Cl⁻ testing, gill Na⁺K⁺ATPase activity and gill qPCR Na⁺K⁺ATPase gene expression data show that salmon receiving the test diet containing all components of the commercial SSFO diet (SSFO salts together with TRP) displayed values that are distinct from fish receiving either Base diet + SSFO salts only or Base + TRP only. These data suggest that the combination of SSFO components (SSFO salts in combination with amino acid L-TRP) are required to achieve optimal smoltification performance results.

In this regard, fish that displayed a combination of lowest plasma Cl⁻ values after SWC testing together with significant increases in gill Na⁺K⁺ATPase activity combined with reductions in gill alpha 1a and increases in alpha 1b at the end of the trial received the test diet containing SSFO salts + TRP. These data are consistent with the findings observed by Striberny, et. al (2021) and disclosed in EP290.

4. Fish receiving the test diet containing Base + TRP displayed differences in SWC plasma Cl⁻ values as well as differences in qPCR gene expression patterns as compared to fish receiving the Base diet. There was no significant effect observed for dietary L-TRP on changes in gill Na⁺K⁺ATPase activity. Taken together, these data support a role for L-TRP in modulating changes in gill Na⁺K⁺ATPase gene expression as well as the development of hypo-osmoregulation in Atlantic salmon.

Sioux Falls, South Dakota, USA



H. William Harris, M.D. PhD.

In the matter of:

European Patent No. 3197290B1

In the name of

Euopharma AS

-and-

Opposition by Cargill, Incorporated (O1)

Biomar Group AS (O2)

Nutreco IP Assets B.V. (O3)

Declaration of Jesse Trushenski

1. Background and Mandate

1.1 The facts below are written from my knowledge, except where stated otherwise.

I have a Bachelor of Science (BS) degree from Western Washington University and a Doctor of Philosophy (PhD) from Southern Illinois University Carbondale. My PhD work related to fish nutrition and physiology, and the title of the dissertation was «Evaluation of Natural Source Vitamin E, *RRR*- α -Tocopheryl Acetate, as an Alternative Micronutrient Source and Nutraceutical for Sunshine Bass *Morone chrysops* x *M. saxatilis* Culture». Today, I hold a position as Chief Science Officer and Vice President of Animal Welfare for Riverence Holdings LLC. Riverence Holdings is the parent company for a group of privately-owned aquaculture companies based in Washington and Idaho, USA. These companies include Riverence Provisions LLC and Riverence Farms LLC (Rainbow Trout and Steelhead farms and processing operations) and Riverence Brood LLC (Rainbow Trout, Atlantic Salmon, and Coho Salmon genetics). Prior to joining the Riverence group, I was employed as the Fish Pathologist Supervisor for the Idaho Department of Fish and Game (state government natural resource management agency; 2015-2017). Prior to that, I was a faculty member at Southern Illinois University Carbondale (public university; tenure-track Assistant Professor, 2008-2013; tenured Associate Professor 2013-2015). I have extensive experience in developing and executing research in various sub-disciplines of fisheries and aquaculture, particularly fish nutrition. I have authored more than 170 technical publications, essays, industry articles, and book chapters, and authored more than 265 presentations at professional meetings. During my academic career, sixteen Master of Science (MS) and PhD students matriculated under my advisement as their major professor. I have considerable experience evaluating experimental designs and scientific manuscripts, having provided editorial service to the North American Journal of Aquaculture, Fisheries, Lipids, and the Journal of Animal Science. I have served as a reviewer for numerous other journals, have served as a grant proposal reviewer for funding programs sponsored by the US Department of Agriculture and the US National Oceanic and Atmospheric Administration. I have fulfilled numerous leadership roles within the fisheries and aquaculture communities, chairing or serving on multiple advisory panels and other committees addressing fisheries and aquaculture research and policy in the USA. I am also a Past-President (2018-2019) and Fellow of the American Fisheries Society, the world's oldest and largest professional organization of fisheries professionals (7500+ members). For additional details regarding my professional bona fides, please see my enclosed CV.

1.2. My role as Riverence's Chief Science Officer includes cultivation of mutually beneficial research and development activities with the company's collaborators. To this end, I have facilitated various

collaborations between Riverence and STIM since 2018. My engagement with STIM was formalized in 2020, I was given the title of Lead, R&D North America, and approximately 50% of my time has been dedicated to STIM-related work since that time.

1.3. I have been retained by European Patent Attorney Kim Livgard at Onsagers AS to provide this expert report in the EP opposition proceedings concerning EP3197290B1 (in the following EP'290).

I have been asked to comment upon the composition of test feed 6 of WO02/30182 in light of documents cited by the opponents to this proceeding. I have also been asked to consider the composition of the feed disclosed in Leopoldo et al. and whether that feed is suitable as a feed for salmonids. Finally, I have been asked to comment upon the report entitled «Optimised growth study, Feeding trial with Atlantic salmon (*Salmo salar*)» (2021) by Nofima, which I understand was filed with the grounds of appeal of the opponent Biomar in the appeal proceedings with the Board of Appeal.

I attended court of appeal proceedings regarding the validated EP'290 in Norway as an expert witness. Although I did not attend the original proceedings, I have reviewed key documents from this case as part of my preparation for the associated appeal proceedings. As such, I am familiar with the above-mentioned documents from said court proceedings.

To inform my preparation of this report, I have been provided copies of the following documents:

Grounds of appeal of Cargill, Incorporated, dated 20th December 2021, with exhibits

Grounds of appeal of Biomar Group AS, dated 17th December 2021, with exhibits

Grounds of appeal of Nutreco IP Assets B.V. dated, dated 20th December 2021, with exhibits

Opposition Division's decision dated 18th August 2021

Tacon and DeSilva, 1983, *Aquaculture* 31, pp. 11-20,

Leopoldo et al., 2010, *Aquaculture*, 310, pp. 84-90

Espe and Lied, 1994, *Comp. Biochem., Physiol.*, 107A:1, pp. 249-254

In addition, I have relied my opinion on the following documents/resources:

Berrill, I.K., M.J.R. Porter, and N.R. Bromage. 2006. The effects of daily ration on growth and smoltification in 0+ and 1+ Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. *Aquaculture* 257:470-481.

Catacutan, M.R. 2002. Growth and body composition of juvenile Mud Crab, *Scylla serrata*, fed different dietary protein and lipid levels and protein to energy ratios. *Aquaculture* 208:113-123.

Catacutan, M.R., G.E. Pagador, and S. Teshima. 2001. Effect of dietary protein and lipid levels and protein to energy ratios on growth, survival and body composition of the mangrove red snapper, *Lutjanus argentimaculatus* (Forsskal 1775). *Aquaculture Research* 32:811-818.

Integrated Taxonomic Information System. Available at: <https://www.itis.gov/>

NRC (National Research Council of the National Academies). 2011. *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*. The National Academies Press, Washington, DC.

Santoso, J., Y. Ishizuka, and Y. Yoshie-Stark. 2013. Characteristics of divalent minerals extracted from liver of Japanese common squid *Todarodes pacificus* under various experimental conditions. *Fisheries Science* 79:293-301.

Sheridan, M.A. 1989. Alteration in lipid metabolism accompanying smoltification and seawater adaptation of salmonid fish. *Aquaculture* 82:191-203.

Sikorski, Z.E., and I. Kolodziejska. 1986. The composition and properties of squid meat. *Food Chemistry* 20:213-224.

Aas, T.S., T. Ytrestøyl, and T. Åsgård. 2019. Utilization of feed resources in the production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway: an update for 2016. *Aquaculture Reports* 15:100216

Tacon, A.G.J., M. Metian, and M.R. Hasan. 2009. Feed ingredients and fertilizers for farmed aquatic animals, sources and composition. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper* 540. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Tacon, A.G.J., M.R. Hasan, and M. Metian. 2011. Demand and supply of feed ingredients for farmed fish and crustaceans. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper* 564. FAO, Rome

US Department of Agriculture (USDA) FoodData Central database. Available at:
<https://fdc.nal.usda.gov/download-datasets.html>

2. Test feed disclosed in WO02/30182

2.1 Composition of test feed 6 in light of www.nutritionvalue.org

I have been asked to comment upon the skilled persons understanding of the content of the test feed disclosed in WO02/30182 (which I been told is numbered D2 in the EP proceedings), in particular test feed No. 6 of Example 17, cf. table 19. I understand that it is argued in the EPO proceedings, that WO'182, referring to test feed No. 6 is covered by the pending claims of the EPO proceedings. The arguing is e.g. based on example 8, page 91 of D2 and a document available on www.nutritionvalue.org. Specifically, the opponent Cargill has stated in their Grounds of Appeal in reference to the test diets described in example 8 that, "Squid as used for preparing the base diet inherently comprises about 0.32 g/kg Ca as evidenced by the enclosed nutritional information." However, the information provided in the enclosure is not necessarily relevant to estimating the mineral composition of the test diets. The enclosure is a report on the nutritional facts associated with a food category, "Squid, raw", available from nutritionvalue.org. This report states that the calcium content of this food category is 320 mg Ca/1000 g squid, or 0.32 g/kg.

As noted on the nutritionvalue.org website (see Frequently Asked Questions, <https://www.nutritionvalue.org/contact.php>), the data they report is reproduced from the US Department of Agriculture (USDA) FoodData Central database (<https://fdc.nal.usda.gov/download-datasets.html>). The "Squid, raw" profile is derived from two identical, synonymous records in FoodData Central: "Squid, raw" (FDC ID 1099087) and "Mollusks, squid, mixed species, raw" (FDC ID 174223). The FoodData Central website indicates these two records are synonymous by listing FDC 174223 as the sole "Ingredient" in FDC ID 1099087.

The nutritionvalue.org website appears to reproduce the data associated with the aforementioned FoodData Central records accurately. However, further exploration of the FoodData Central metadata reveals that the data reported for FDC IC 174223 (and, in turn, FDC 1099087 and

nutritionvalue.org) is associated with a “cuttlefish” sample representing the taxonomic groupings “Loligoidae and Ommastrephidae” analyzed in 1987. The precise nature of this sample is unclear. The classification “Loligoidae” no longer appears to be in use in cephalopod taxonomy; it appears to have been replaced by “Loliginidae”, members of the Order Teuthida, Suborder Myopsina. The Ommastrephidae are also members of the Order Teuthida, but the Suborder Oegopsina. However, cuttlefishes belong to the Order Sepiida. Name changes and reclassifications are common occurrences in taxonomy (particularly since the advent and application of molecular techniques), so it is possible that the original descriptions of “Loligoidae and Ommastrephidae” and “cuttlefish” were not inconsistent at the time of the analysis (i.e., 1987). Today, these terms do not provide a cohesive description of the analyzed sample.

Given that taxonomy is known to change over time, it seems best to focus on the term “cuttlefish”, as this common name is widely recognized and consistently applied to a specific grouping of organisms that are distinct from the organisms referred to as “squid”. Cuttlefish possess a larger, mineralized internal skeletal element (the ‘cuttlebone’), whereas squid possess a smaller, flexible internal skeletal element (the ‘pen’). Presumably, the cuttlefish associated with the FoodData Central profile were analyzed without its cuttlebone or viscera as these are generally not consumed by humans, but this is not explicitly stated; it is unclear whether the squid used in example 8 were used with their pens and viscera intact. Given that cuttlebones are commonly used as mineral supplements (particularly as a source of Ca) and the viscera of squid is also a source of divalent minerals, this is an important source of variation that confounds estimation of Ca levels in the example 8 test diets based on data generated for cuttlefish sample 35 years ago. Moreover, it is known that the composition of marine organisms (including squid) varies among species, season, and geography. Sikorski and Kolodziejska (1986) address this point, as well as the dearth of information available regarding the mineral content of squid in their article: “The available published information on the composition of the minerals and vitamins in squid meat is very limited. As the results are highly influenced by the seasonal and biological factors, as well as by the handling of the samples, they must be regarded only as a rough estimate of values that can be expected in squid edible parts.” Regarding Ca, these authors reported more than 10-fold variation in mixed species of squid (10 to 109 mg/100 g or 0.1 to 1.09 g/kg), and levels that are much lower than the cuttlefish levels reported in the FoodData Central database.

Given that the composition of the squid referenced in example 8 is not known, the available compositional information produced by the opponents is based on an analysis of a distinctly different, albeit incompletely characterized marine cephalopod, and the composition of marine cephalopods is known to vary widely, one cannot estimate the composition of the example 8 test diets with precision or certainty. Indeed, extrapolation of the FoodData Central cuttlefish data to the example 8 test diets is a misleading overreach beyond the available information and the associated estimates of dietary mineral levels presented by the opposition cannot be considered accurate. Taken together, it is clear that the skilled person would not be able to infer the composition of the example 8 test diets with precision, nor would they be able to directly and unambiguously derive the EP’290 invention from the available information.

2.2 Test feed 6 in light of Moore-Clark’s Selected 6+6 Freshwater Extruded Smolt Feed (1992)

I have furthermore been provided with a copy of a declaration by Mr. Greg Deacon, including an annex representing information about a fish feed (“Moore-Clark’s Selected 6+6 Freshwater Extruded Smolt Feed”) dated back in 1992, numbered as D75OP3 by Nutreco. Said documents are known to

me from the court of appeal proceedings in Norway. I see that in the appeal proceedings with the EPO in respect to EP'290, this document is filed by Nutreco, and it has been indicated that based upon the information of the feed of said annex 2, it can be concluded that test feed disclosed in example 17 of WO'182 comprises from 0.036 -36.110 g/kg Ca²⁺.

The sources of variation regarding levels of Ca²⁺ outlined above regarding squid (i.e., uncertainty regarding the nature of the raw material or ingredient; taxonomic, seasonal, and geographic variation in composition; variation associated with processing/handling that may have occurred) also apply to the ingredients present in the Moore-Clark feed. The information provided for the Moore-Clark feed indicates that the calcium content was 2.4%. I do not have any reason to doubt this is an accurate representation of this feed as produced in 1992 (i.e., the time of analysis), but it is irresponsible to suggest that this analysis also accurately represents the composition of Moore-Clark feed available nearly a decade later in 2000. The formulation of the 1992 Moore-Clark feed is not disclosed, and the source/nature of its ingredients are not known. Therefore, it is not possible to estimate individual contributions of the various ingredients listed to the total calcium content of 2.4%. It is also not possible to compare the 1992 recipe to the 2000 recipe for Moore-Clark feed, though these recipes undoubtedly differed with respect to ingredients and sources, inclusion rates, and so forth. Mr. Deacon largely ascribes his assertions regarding calcium content to the fish meal included in these feeds. Although fish meal prices were approximately US\$500/MT in 1992 and in 2000, prices had gone as high as US\$750/MT during the intervening years. Other ingredient prices also fluctuated over this time period, e.g., wheat prices ranged from roughly \$2.75 to \$6.75/bushel. Feed manufacturers take ingredient markets into consideration and adjust their recipes accordingly. It is unreasonable to think that the recipe and composition of the 1992 feed would be the same as the 2000 feed, but without full disclosure of the recipes and the ingredient sources, it would not be possible to estimate nutrient levels in either feed with much precision. Salmonids do not have a dietary calcium requirement nor has dietary calcium toxicity been demonstrated in salmonids. As such, there is no nutritional justification for feed manufacturers to control dietary Ca to ensure levels in the finished feed are within specified minima or maxima. Thus, there is little evidence that the Ca levels of the 1992 Moore-Clark feed align with the Ca levels of the 2000 feed. Given that the skilled person would not be able to make any precise estimates regarding the Ca content or Ca²⁺ levels provided by the Moore-Clark feed at the priority date of the opposed patent (or indeed at any other time), they would not be able to directly and unambiguously derive the EP'290 invention from the test diets described in example 17.

2.3 Test feed No. 6 in light of Tacon and DeSilva (1983)

I have furthermore been provided with a copy of a paper by Tacon and DeSilva, 1983, *Aquaculture* 31, pp. 11-20 (to my understanding, D68 of EPO proceedings). I understand that it is furthermore argued by Nutreco that the paper by Tacon and DeSilva support that test feed 6 of example 17 of WO'182 comprise calcium within the range specified in the pending claims of EP'290.

As noted above regarding Mr. Deacon's statements and estimation of mineral composition of the Moore-Clark feeds, there is too much uncertainty regarding the feeds analyzed by Tacon and DeSilva to support the use of their data in estimating the composition of the test diets described in example 17. The nature of the sampling strategy (e.g., how many feed types per category and samples per feed), the associated recipes (e.g., ingredients and inclusion levels), sourcing of the ingredients (e.g., origin and grade of fish meal and other ingredients), and so forth are unknown, and it is impossible to assess differences between the analyzed feeds and those described in example 17.

Tacon and DeSilva's survey included a total of 38 feeds sourced from manufacturers in the United Kingdom were analyzed, though it is not clear how many feeds or samples were represented within each of the trout or salmon feed categories. Regarding salmonid feeds, the survey evaluated starter, fingerling, and grower feeds intended for salmon and starter, fingerling, grower, and broodstock feeds intended for trout. Ca content of the salmon feeds ranged from 14.02-22.02 g/kg, and the trout feeds varied from 18.14 to 22.09 g/kg. The variability in dietary mineral levels was known and recognized by Tacon and DeSilva: "Large differences in the mineral composition, particularly the trace elements Fe, Zn, Cu, Mn, Co, and Pb, exist within the between the different feed categories tested." Thus, Tacon and DeSilva themselves are indicating that their results are not necessarily representative of all salmonid feeds contemporary to their survey. Their results are certainly not appropriate to extrapolate to feeds manufactured nearly two decades later, by different manufacturers, in a different continent.

3. The feed disclosed in Leopoldo et al., 2010

Furthermore, I have been asked to comment upon Leopoldo et al., 2010, which I understand is numbered as D40 in the EPO proceedings, in particular the test feed disclosed therein. I have also been provided with a copy of the ground of appeal of Nutreco IP Assets B.V. and the exhibits numbered D76OP3 – D78OP3E therein. I understand that Nutreco argues that the feed disclosed in Leopoldo et al., 2010, is suitable for feeding salmonids.

Leopoldo et al., 2010, describes an experiment conducted to determine the effect of dietary L-Trp supplementation on the survival, growth, and behavior of juvenile Mud Crab *Scylla serrata*. Lacking expertise in patent law and the policies and procedures of the EPO, I cannot comment on whether Leopoldo et al. meets the relevant standards for consideration in these proceedings. However, I can attest unequivocally that, as a practical matter, a fish nutritionist would not look to this article as a source of information regarding the proper formulation of feeds for salmonids. A fish nutritionist with specific interests in L-Trp or its possible effects on animal behavior might come across Leopoldo et al. in conducting a literature search related to these topics. However, they would not consider direct translation of the described feeds to experimental or practical use in salmonid nutrition, as fish and crustacean nutritionists recognize these groups of aquatic animals has having distinct feeding habits, bauplans, and needs with respect to essential nutrients, physical attributes of feed, and so forth. Indeed, most references address the nutritional demands of fish or crustaceans, not both, because of the major differences in nutritional biology between these groups of organisms. However, the differences in the nutritional physiology as well as practical feeding of fish vs. crustaceans are noted in cross-discipline syntheses of aquaculture nutrition, such as the well-known textbook Nutrient Requirements of Fish and Shrimp (NRC 2011).

Many of the ingredients used in the feeds described by Leopoldo et al. are also used in salmonid feeds, but it is incorrect to infer from this that the Leopoldo et al. feeds are appropriate for feeding salmonids. Indeed, ingredients like fish meal, squid meal, wheat derivatives, and so forth are commonly used in feeds produced for all of the 400+ finfish and crustacean species cultured throughout the world. It is how these ingredients are combined to satisfy the nutritional demands and tolerances of the intended species that is relevant. The nutrient requirements are not known for all salmonids, but one can examine the reported requirements of Atlantic Salmon and Rainbow Trout

as representative salmonid species. Juvenile Rainbow Trout and/or Atlantic Salmon reportedly¹ require a minimum of 19.7 MJ/kg digestible energy, 370-380 g/kg digestible protein, and 160-280 g/kg lipid, perform best with a DP/DE ratio of 19 g/MJ. The Leopoldo et al. feeds reportedly provide 17.5-17.7 MJ/kg total energy (not all of which is digestible), 445-460 g/kg protein (not all of which is digestible), 88-95 g/kg lipid, a P/E ratio of 25-26 g/MJ. As such, the energy and lipid contents are clearly limiting, and the digestible protein levels may be a limiting factor also. It is difficult to accurately estimate dietary levels of other nutrients based on the information provided in Leopoldo et al. and the known variability of feed ingredients. However, it is possible that other nutrients may be present in insufficient or excessive amounts for salmonids.

Although Mud Crabs are an increasingly common cultured species, there has been very little work done to quantitatively determine the nutritional requirements and tolerances of this species. In the 2000s, it appears that efforts to develop prepared feeds for Mud Crab (as a replacement for feeding them trash fish or other similar feedstocks) were in the early stages. When nutrient requirements are unknown, as is often the case for emerging aquaculture species, culturists may try available feeds that were developed for other species. Assuming the emerging species accepts the feed and survives, one can use it as a sort of benchmark for further refinement and development of a feed specifically intended for the emerging species. In the case of Leopoldo et al., it appears that these feeds are a derivation of formulations previously tested by one of the coauthors in an experiment to evaluate different protein and lipid levels in feeds for Mud Crab (Catacutan 2002). The Catacutan 2002 formulations also appear to be derivations, as they are very similar to those used by this author and colleagues in another investigation of protein and lipid levels in feeds for Mangrove Red Snapper (Catacutan et al. 2001). Each of these experiments involves a range of test diets, the composition of which I have summarized in the following table:

Ingredient	Catacutan et al. 2001	Catacutan 2002	Leopoldo et al. 2010
Fish meal	33-47	26.5-40.5	40
Squid meal	6.6-9.1	5.0-8.0	8
<i>Acetes</i> sp. (whole shrimp)	4.1-6.0	6.0-9.0	5
Defatted soybean meal	6.5-9.0	8.8-13.3	12
Bread flour	6.4-8.0	10.0-13.5	16.96
Cod liver oil	0.5-7.3	0.6-8.2	3
Dextrin	9.6-12.8	0	0
Celufil (inert cellulose filler)	0-23.7	0.5-25.9	0
Wheat pollard	0	0	5
Rice bran	0	0	0.82-1.50
L-Trp	0	0	0-0.68
Common ingredients*	4.8	12.1-12.2	8.54
Protein (%)	34.7-50.3	34.3-51.8	44.57-45.97
Lipid (%)	5.4-11.8	4.4-11.6	8.78-9.49
*Analogous inclusions of vitamin and mineral premixes, binders, soy lecithin, etc.			

^{1 1} Although NRC (2011) reports slightly lower “typical” digestible energy and protein contents of Atlantic Salmon and Rainbow Trout feeds, these requirements “do not include any surpluses” to provide an adequate margin of safety and are an average of reported literature values for various life stages. More precise nutrient requirements reported for juvenile life stages of salmonids (e.g., the International Aquaculture Feed Formulation Database) report minimum dietary requirements for digestible energy, protein, and lipid for juvenile Rainbow Trout and Atlantic Salmon as reported in the text.

Other than the few ingredients used to achieve the specific hypothesis-testing goals of these experiments (e.g., L-Trp, celufil, dextrin), the feeds described by Catacutan 2002, Catacutan et al. 2001, and Leopoldo et al. 2010 are extraordinarily similar. Moreover, the proximate composition and ingredient inclusion rates used by Leopoldo et al. align with the findings and recommendations of Catacutan 2002 and Catacutan et al. 2001. The Leopoldo et al. 2010 feeds were clearly based on feeds developed for Mangrove Red Snapper, a warmwater marine species. Not only are the feeds described by Leopoldo et al. 2001 not appropriate for salmonids, they were clearly based on feeds intended to satisfy the demand of a finfish (and subsequently, a crustacean) with strikingly different biology, bauplans, and nutritional demands.

I am aware that Nutreco has presented information from a 1986 text, Fiskeoppdrett med Fremtid (D78OP3E), arguing that 8% was considered a maximum amount of lipid in salmonid diets. Indeed, the English translation of the referenced text states that “Earlier, it was common to set an upper limit of 8% fat in dry feed for fish”. Although I do not have access to the full text, the translated text clearly states that higher fat feeds (dry or moisture) increase growth and yield positive results. The 8% “upper limit” is clearly not related to the biological demands of salmonids, but issues in historical feed manufacturing practices, i.e., the inability to successfully incorporate high levels of lipid in a dry pelleted (i.e., not extruded) feed resulting in fat losses and poor pellet texture (the “other difficulties” referenced in D78OP3E) and little-to-no access to the necessary antioxidant stabilizers and proper feed storage infrastructure to prevent rancidity in higher fat feeds (i.e., the cause of the “diseases” referred to in D78OP3E). Issues in feed manufacturing and storage have no bearing on the nutritional demands of salmonids and what dietary ingredients/nutrient levels are considered optimal or suitable for salmonids.

I am aware that Nutreco has presented the work of Luzzana et al. (1994; D76OP3) and argues the growth of Rainbow Trout fed a diet containing 8.4% lipid in this experiment as indicative that such low lipid levels are suitable for feeding salmonids. This trial compared the performance of fish fed pelleted diets containing 8.4% or 11.1% lipid or an extruded diet containing 20.7% lipid. At the start of the feeding trial, the fish were ~215 g. At this size, fish would be fed grower-type diets. The feeding trial lasted 110 days, or nearly 16 weeks. Over this period of time, fish fed the 8.4% lipid feed nearly doubled in size—this is very modest growth for a feeding trial of this duration. Additionally, fish fed the 8.4% lipid feed had significantly lower weight after evisceration and an elevated hepatosomatic index (HSI). The latter two responses are indicative of a nutrient imbalance or deficiency. It is possible for fish to continue to grow, i.e., to accumulate mass, when fed an improper feed. However, the weight that is gained is not lean growth, but the accumulation of excess energy visceral fat depots and hepatic glycogen deposits. When fish are fed an improper diet, they are lacking or one or more nutrients to support lean growth. Normal growth cannot proceed until the limiting nutrient is available. Any other nutrients that would otherwise be used to support lean growth are effectively in surplus until growth is fully supported by the full complement of necessary nutrients. Consequently, the fish will convert these surplus nutrients into fat or glycogen and deposit them as stored energy. Weight is still being gained, but it is gained in the form of fat and glycogen stores which can eventually lead to health problems for the fish. The fact that Rainbow Trout fed the 8.4% lipid diet had increased visceral mass (i.e., reduced weight after evisceration) and elevated HSI values indicates that the diet was not properly balanced and was lacking in at least one nutrient.

Regarding the statement Nutreco has presented from NRC (2011; D27a) regarding the inability to define an optimum level of dietary lipid for any species, only a partial quote is provided. The full

sentence reads, “Although an ‘optimum’ level of dietary lipid cannot be truly defined for any species, there is a range within which dietary lipid should be supplied.” The second clause of this sentence, omitted in Nutreco’s Grounds of Appeal, is clearly where the emphasis should be placed. It is true that lipids are provided as a source of essential fatty acids and these required nutrients must be supplied in adequate amounts, lipid is also incorporated in the diet as a source of energy, for which there is also dietary requirement. As described in the same passage of the NRC textbook, the energy requirement can be met by various combinations of macronutrients (i.e., protein, lipid, and carbohydrate). However, catabolism of dietary protein to satisfy energy requirements is not economically or environmentally desirable. For many carnivorous species, including salmonids, carbohydrates are not digested or metabolized well. Thus, while it is not strictly necessary to use lipids as an energy source in salmonid feeds per se, by default, lipids are the only macronutrient source that is practically useful for addressing the energy requirements of carnivorous fish. Regardless of whether the feeds described by Leopoldo et al. contain adequate lipid to satisfy the essential fatty acid requirements of salmonids, they do not contain sufficient energy (provided by lipid or other macronutrients) to satisfy the requirements of salmonids. The dietary energy requirement for juvenile salmonids (e.g., Rainbow Trout and Atlantic salmon, 50-250 g in size) is roughly 19.7 MJ/kg of *digestible* energy; the Leopoldo et al. feeds contain, at most, 17.74 MJ/kg of *gross* energy, not all of which is available to the fish. Thus, while the Leopoldo et al. feeds are deficient with respect to the amount of lipid that is suitable for feeding juvenile salmonids, regardless of lipid content, the diets are inadequate in terms of satisfying the minimum energy requirements of these fish.

It should be noted that Nutreco’s position that “lipid level does not have a significant effect on growth and the decision to undergo smoltification in salmon parr” is not supported by the referenced work of Berrill et al. (2004; D770P3) or well-understood principles of growth and metabolism in fish. It is without question that any animal’s growth is a function, in part, of its digestible energy intake. Given that dietary lipid is the most important source of digestible energy in salmonid feeds (see previous paragraph), it is obvious that dietary lipid content *does* have a significant effect on fish growth. Indeed, many published works including Luzzana et al. (1994), NRC (2011), Fiskeoppdrett med Fremtid (1986) referenced by Nutreco demonstrate that salmonid growth is clearly improved by increasing dietary lipid levels to 20-30% or greater. Regarding successful completion of developmental/physiological transformations, NRC states, “...higher dietary levels [of lipid] may be necessary to satisfy obligatory lipid deposition required to successfully fulfill or realized certain physiological stages often associated with reproduction (migration/spawning)”.

Although Berrill et al. (2004) conclude that dietary lipid levels of 12.5% or 25% did not affect growth, it should be noted that the feeds they evaluated differed ways other than lipid level alone. Specifically, the 25% lipid feed contained 65-67% fish meal vs. 50% in the 12.5% feed. Further, the low-fat feeds contained 26-27% soybean meal and rapeseed meal, ingredients known to contain various antinutritional factors and to have reduced digestibility in salmonids; these plant ingredients were absent in the 25% lipid feed. Although the authors state that both feeds were offered at the manufacturer’s recommended rate, it is not clear what these rates were or whether the rates were the same for both feeds. In short, Berrill et al.’s 12.5% vs. 25% lipid experiment is flawed by improperly formulated feeds and incompletely disclosed methods that confound the experimental design and hypothesis testing. However, these authors did demonstrate (in the 2004 publication and Berrill et al. 2006) that energy intake influences smoltification. Specifically, smolts consuming a reduced, i.e., consuming less digestible energy, grew less, did not become competent smolts, and exhibited reduced survival and osmoregulatory competency after transfer to seawater. It is well known that energy demands are high during smoltification and this is generally associated with an

increase in lipid catabolism (Sheridan 1989). Whether smoltification feeds provide energy primarily in the form of lipid (as is typical) or other macronutrients, successful smoltification depends on adequate energy intake. As noted before, the Leopoldo et al. feeds do not satisfy the minimum energy requirements of juvenile salmonids and are not suitable as smoltification diets.

4. Nofima report

The Nofima report («Optimised growth study, Feeding trial with Atlantic salmon (*Salmo salar*)», Breiland et al., hereafter referred to as Nofima 2021) describes an experiment conducted at the behest of BioMar AS to investigate the effect of “...different feeds containing salt additives or/and the amino acid tryptophan on the smoltification and seawater (SW) preadaptation of juvenile salmon” (page 3, Nofima 2021). Groups of juvenile fish (3 replicates per feed treatment) were fed one of four assigned test diets for 36 days in FW (“Standard FW”), after which a portion of the fish in each tank were transferred to SW (“Standard SW”) and monitored for 39 days. The remaining fish were maintained in FW and fed the assigned diets for an additional 39 days (“Delayed FW”) prior to SW transfer (“Delayed SW”) and subsequent monitoring for 44 days. Fish were sampled at various points throughout the experiment to assess growth and smoltification parameters.

The four test diets evaluated in the experiment were as follows (page 9, Nofima 2021):

- A practical feed for juvenile salmon (“Ctrl”)
- A practical feed for juvenile salmon to which 6% feed salt had been added (“mNa”)
- A practical feed for juvenile salmon to which 6% feed salt and 0.3% L-Trp had been added (“NaTr”)
- A practical feed for juvenile salmon to which 5.5% feed salt and 0.5% calcium chloride had been added (“NaCa”).

The report states a series of hypotheses to be tested (page 6, Nofima 2021). Although these hypotheses are not presented in the classical fashion of null and alternative hypotheses, they indicate that the investigators intended to compare the effect(s) of dietary additions of NaCl, NaCl and free L-Trp, or NaCl and Ca²⁺ on the growth and smoltification of juvenile salmon.

Although not described in Nofima 2021, I am aware from the court of appeal proceedings regarding the validated EP’290 that the opponent Biomar engaged Nofima to conduct this trial with the purpose of investigating whether the addition of Ca²⁺ or free L-Trp to Biomar’s current Intro Tuning feed formulation (represented by the mNa feed) had any effect. I am also aware that the opponent Biomar has presented the report as evidence that the addition of Ca²⁺ or free L-Trp to the current Intro Tuning feed formulation has no effect and there is no functional difference between the current Intro Tuning feed (which does not include either additive) and SSFO (which includes both additives, as well as additional Mg²⁺) regarding smoltification of juvenile salmon. This conclusion is not supported by the findings described in Nofima 2021. The design and conduct of the Nofima 2021 experiment are fundamentally flawed, and one cannot draw any conclusions from the information presented in the report regarding the stated hypotheses or the effect(s) of the test diets, Intro Tuning, or SSFO.

There is a lack of cohesion between the Nofima 2021 test diet formulations that undermines the experimental design and invalidate comparisons between fish fed the test diets. There are major, unjustified formulation differences among the mNa, NaTr, and NaCa diets and between these diets and the Ctrl diet that are unrelated to the hypotheses to be tested (page 9, Nofima 2021). In fish

nutrition research, it is important to formulate test diets to be as similar as possible given the question at hand. Understanding that test ingredients usually vary in their composition, it is necessary to modify the basal formulation (i.e., levels of the non-test ingredients) to accommodate these differences and produce finished feeds that are comparable and meet the nutrient requirements of the intended species. For example, assume typical feeds contain an ingredient “X” that contains 60% protein and there is a new ingredient “Y” containing 80% protein that is being evaluated as a substitute for X. If researchers wish to test the response of fish fed diets in which Y is used to replace X, the rest of the feed ingredients will have to be adjusted to ensure the finished test diets provide the same protein content. If the other ingredients are not adjusted accordingly, Y diets will contain much more protein than X diets and these ‘apples to oranges’ differences will confound the interpretation of results. However, with careful balancing of the basal formulation, test diets containing different levels of X and Y, but equal amounts of protein, can be produced and ‘apples to apples’ comparisons can be made. In this simple example, we have only considered balancing total protein levels; in reality, one must consider other essential nutrients and energy levels, ingredient digestibility, etc., to produce test diets that will support apples to apples comparisons relative to the suitability of the test ingredients.

In Nofima 2021, all of the test diets were formulated to provide the same amount of protein and energy, which is appropriate. The addition of 5.5 or 6% feed salt to the Ctrl formulation would cause a dilution of protein and energy levels, so the basal formulation of the mNa, NaTr, and NaCa must be modified to ensure that the other ingredients make up for the protein and energy that is displaced by the feed salt. Thus, the mNa, NaTr, and NaCa will have to deviate from the Ctrl formulation in some respects. However, it is not appropriate to add or remove ingredients from the recipe entirely, as is the case in Nofima 2021: the Ctrl formulation includes 8% sunflower meal, but this ingredient does not appear in any of the other test diets. For the most direct comparisons between the feeds, all ingredients should be present at least at some level in each feed. The investigators would have been justified in reducing the sunflower meal somewhat to accommodate higher inclusions of more protein-dense ingredients, but removing sunflower meal from the mNa, NaTr, and NaCa formulations entirely is inappropriate. Other ingredient inclusions vary in ways that do not appear to be wholly justified by the need to accommodate inclusion of the test ingredient(s), such as:

- Soy protein concentrate (“Soya SPC”): 5.3% in the Ctrl diet vs. 2.0 to 4.0% in the other test diets
- Wheat gluten: 8% in the Ctrl diet vs. 11.7 to 14.6% in the other test diets
- Maize gluten: 5.5% in the Ctrl diet vs. 3.2 to 7.6% in the other test diets
- Mono-calcium phosphate: 3.7% in the Ctrl diet vs. 3.3 to 3.9% in the other test diets
- Vitamins, minerals and additives: 2.3 in the Ctrl diet vs. 2.0 to 2.1 in the other test diets

In addition to the presence/absence of sunflower meal and the other aforementioned differences between the Ctrl diet and the other test diets, there are other significant variances in the formulations that are not justified by accommodation of the test ingredient(s). The mNa, NaTr, and NaCa feeds all include 6% feed salt or feed salt and calcium chloride—all of these diets must accommodate the inclusion of 6% test ingredient(s) containing no protein, energy, or other essential nutrients. Whereas the basal formulations of these diets can be expected to vary somewhat from that of the Ctrl diet (albeit not to the extent described above), there is no reason for them to differ from each other. The basal formulations for the mNa, NaTr, and NaCa diets should be identical. However, ingredient levels vary substantially among these test diets:

- Soy protein concentrate inclusion varies from 2.0 to 4.0%

- Wheat gluten varies from 11.7 to 14.6%
- Maize gluten varies from 3.2 to 7.6%
- Fish oil varies from 11.7 to 11.8%
- Rapeseed oil varies from 5.0 to 5.1%
- Mono-calcium phosphate varies from 3.3 to 3.9%
- Vitamins, minerals, and additives” category varies from 2.0 to 2.1%

Again, there is little justification for why the inclusion of these materials should differ for the Ctrl diet and no justification for why inclusions should vary among the mNa, NaTr, and NaCa feeds. The latter variance in vitamins, minerals and additives is particularly troubling, since it refers to various ingredients that are not defined in the report. There is no description of vitamins and minerals added to the diets, and the description of the additives (“amino acids, antioxidants, and technical additives”; page 9, Nofima 2021) is vague and mostly uninformative. Given the known effects of various amino acids (besides L-Trp) on PVCs and other dietary constituents on fish growth and smoltification, the unjustified variances in micronutrient inclusion rates and the incomplete disclosure of this category of ingredients are of serious concern. Although one must be sensitive to disclosures of proprietary formulation details, the absence of relevant details regarding feed composition is unusual for a study of this kind.

Setting aside matters of feed formulation, there is also the very significant issue that the fish enrolled in Nofima 2021 were smoltified at the start of the trial. One week prior to the start of feeding the test diets (T0), the fish were evaluated, and the average smolt index value was determined to be 2.6 (page 16, Nofima 2021). According to the smolt index scoring rubric, scores of 1 are associated with parr or presmolts, scores of 4 are associated with post-smolts; a score of 3 is the accepted benchmark for considering a fish a smolt. Thus, an average score of 2.6 indicates that smoltification was well underway, if not complete, in a substantial number of the fish evaluated at T0. One week later (after 1 week of feeding the test diets, T1), the fish were evaluated again and the average smolt index values were 3.6 or higher in all test groups (page 16, Nofima 2021). Thus, the smolt index scores indicate that most, if not all, of these fish were smolts after just one week on the test diets, which isn’t enough time for any of the formulations to have had an effect, particularly the Ctrl group which has been given no smoltification signal. Although smolt index is an informative and commonly used metric for assessing smoltification status, it is recommended to couple this metric with one or more additional indicators of smoltification to ensure the assessment is robust and accurate. In the case of the Nofima 2021 trial, plasma chloride data also indicate the fish were smoltified at the start of the experiment. Specifically, plasma chloride values following SW challenge indicate that fish were quite competent in dealing with increased salinity as early as T0 (page 17, Nofima 2021). Indeed, the elevated plasma chloride values were only observed among SW challenged fish at the FW10 sampling point, indicating that while the fish maintained in FW has smoltified early in the trial, they eventually desmoltified at the end of the Delayed FW period. Thus, both the smoltification index and plasma chloride data indicate most if not all fish, including the Ctrl group given no smoltification signal, we smoltified before the test diets were applied in Nofima 2021.

In sum, the Nofima 2021 experiment is invalidated by the errors in feed formulation and experimental design coupled with the fact that the fish were already smoltifying at the beginning of the experiment. As such, one cannot draw any meaningful inferences from the results reported therein.

5. Study design of Striberny et al. vs EP’290

I have been asked to comment upon the study design of Striberny et al., which I have been told is numbered D61 in the EPO proceedings, in comparison with the study design of the trials presented in EP'290. I notice that Nutreco in their statement of grounds of appeal, page 29, seems to be of the opinion that the skilled person would not rely upon the findings in the EP'290, referring to that more data is provided in the later study by Striberny et al.

The stated purpose of the experiment described in Striberny et al. was to, "...compare PST [parr-smolt transformation] in dietary and light stimulated PST, separately and in combination, in small (\approx 40 g) and large (\approx 130 g) pre-smolts, and their performance after SW [seawater] transfer". The experimental design is strong in that it includes replicate groups of fish exposed to photoperiod manipulation (i.e., a 'winter signal', "SP-LL control"), a diet consistent with the invention described in EP'290 ("LL-LL + diet"), or both photoperiod and dietary stimulation of smoltification ("SP-LL + diet"). The experimental design is further strengthened by the presence of a true negative control, i.e., a group of fish exposed to neither photoperiod manipulation nor smoltification feed ("LL-LL control"). Unfortunately, the experiment involves minimum replication at the tank level (i.e., 2 tanks per treatment combination/fish size during FW phase, 1 tank per treatment combination during SW phase), though this is partially addressed by the relatively large number of fish per tank supporting reasonable numbers of individuals sampled according to a frequent sampling scheme.

The smoltification feed evaluated by Striberny et al. includes all elements of the EP'290 invention (i.e., Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺, Cl⁻, and L-Trp within the specified ranges) and the two feeds used in the experiment ("Control" and "Salt") have the same moisture, protein, and fat content, and the recipes are much more consistent than those evaluated in Nofima 2021. Expectedly, levels of some ingredients vary in order to accommodate the macronutrient dilution associated with incorporation of 6% NaCl, 0.75% CaCl₂, and 0.25 MgCl₂ (e.g., wheat, wheat gluten, sunflower meal). However, all of the ingredients are present in both feeds and it is clear that effort has been made to harmonize the inclusion rates to the extent possible while maintaining isoproteic/isolipidic composition.


Unlike the Nofima 2021 experiment, the fish used in the Striberny et al. experiment had not smoltified at the start of the trial. As the authors note, "parr marks were visible in all fish" at the start of the experiment in February, before application of the photoperiod and/or dietary smoltification treatments. In March, after completion of the photoperiod manipulation/winter signal but before implementation of the dietary treatments, small fish exhibited silvering scores of 2 (winter signal fish) or 3 (fish exposed to continuous light). All large fish exhibited a silvering score of 3 in March. It is known that fish size/age influences smoltification and thus the more advanced smoltification index status of the larger fish is perhaps unsurprising. However, plasma osmolality concentrations were elevated following SW challenge of both small and large fish in February and March. This indicates that whereas silvering scores suggested that smoltification was underway in the large fish in March, these fish were unable to properly osmoregulate in SW and therefore had not attained one of the key attributes of smolts. As noted previously, a robust assessment of smoltification will incorporate more than one metric of smoltification and not rely exclusively on smoltification index.

For these reasons—the experimental design was complete, the smoltification diet tested was fully compliant with the requirements of the invention described in EP'290, and fish were not smoltified at the start of the experiment—I consider the results reported in Striberny et al. to be considerably more relevant and compelling to the present proceedings compared with the Nofima 2021. However, the authors' conclusion that, in comparison with photoperiod manipulation/winter signal, the EP'290 feed yielded a smolt with equal appetite and growth performance after SW transfer is supported by the results presented. It should be noted, however, that the growth results are

somewhat confounded by the fact that the feeding regimen for all groups followed that of the fish exposed to a winter signal, regardless of their assigned photoperiod. In other words, none of the groups were fed when any individual group was in darkness. Fish exposed to continuous light could have been fed around the clock and would have achieved a growth advantage over the winter signal groups as a result—indeed, the ability to feed continuously is one of the advantages of non-photoperiod-based methods of inducing smoltification. Given the experimental design of Striberny et al, the use of identical feeding regimens across all treatment groups is understandable; nonetheless, this likely resulted in an underestimate of the growth potential of the smolts from the LL-LL +diet group.

Despite the strengths of the Striberny et al. paper, I believe it is important to note that it is largely confirmatory. Though it is, in some ways, more robust than some of the trials disclosed in EP'290, it primarily affirms the effects of a smoltification feed prepared according to the teachings of EP'290. The information disclosed in EP'290 provides clear guidance for the skilled person to develop a successful smoltification feed based solely on the information contained therein.

25 May 2022, Bozeman, Montana, USA

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Jesse Trushenski". The signature is written in a cursive style with a long horizontal stroke extending to the right.

Jesse Trushenski

In the matter of:

European Patent No. 3197290B1

**In the name of
Europharma AS**

-and-

**Opposition by Cargill, Incorporated (O1)
Biomar Group AS (O2) Nutreco IP
Assets B.V. (O3)**

Declaration of Richard Tomassen

Background and Mandate

1. The facts below are written from my knowledge, except where stated otherwise.

I have a Bachelor of Science from Ålesund University College from 2008, and holds today a position customer advisor at Artec Aqua AS. I enclose herewith a copy of my curriculum vitae.

As seen from the enclosed CV, I have been directly involved in implementation of the SuperSmolt technology disclosed in WO02/30182 as well as the SuperSmolt FeedOnly technology disclosed in EP 3 197 290, including the transfer of over 300 million smolts from freshwater to seawater. Among the companies that I have contributed with smoltification services are MOWI, SalMar, Lerøy and Cermaq and others (a total of almost 100 different hatcheries)

My contribution has consisted of reviewing the plant's environmental data (water parameters), making production plans and protocols for the respective smolt groups, conducting sampling and health control before smoltification and analysing sampling data through the smoltification to identify the correct time for transfer from freshwater to seawater. Analyses performed on the different fish groups have varied between traditional gill ATPase enzyme activity, chloride measurements in freshwater and seawater (traditional seawater challenge test) and gill RTPCR ATPase tests (alpha 1A and Alpha 1B). I have always used these analyses together with the development of the smolt index, growth data, condition factor, behaviour from the fish groups. In addition, basic water parameters such as O₂, CO₂, pH and temperature are always monitored.

Most of my experience has come through the induction of smoltification by SuperSmolt Original (i.e. the method disclosed in WO02/30182) and SuperSmolt FeedOnly, but have also followed several million Atlantic salmon that have been smoltified with traditional photo manipulation. I have worked with plants with various types of hatching facilities, including recirculating aquaculture systems (RAS), throughput and hybrid hatcheries.

2. I have been retained by European Patent Attorney Kim Livgaard at Onsagers AS to provide this expert report in the EP opposition proceedings concerning EP3197290B1 (in the following EP'290).

In particular, I have been asked to provide my comments to the report entitled "Optimised growth study, Feeding trial with Atlantic salmon (*Salmo salar*)" by Wofima, which I understand was filed with the grounds of appeal of the opponent Biomar Group AS in the appeal proceedings with the Board of Appeal.

I attended as an expert witness in court proceedings regarding the validated EP290 in Norway, both in the first instance court as well as in the appeal proceedings in Norway.

3. In preparation of this report, I have been provided copies of the following documents:

Copy of grounds of appeal of Cargill, Incorporated, dated 20th December 2021, with enclosures

Copy of grounds of appeal of Biomar Group AS, dated 17th December 2021, with enclosures

Copy of grounds of appeal of Nutreco dated, dated 20th December 2021, with enclosures

Copy of Opposition Division's decision dated 18th August 2021

In addition, I have relied upon the following document:

Sigurd O. Stefansson et al. (2007), "Molecular mechanisms of continuous light inhibition of Atlantic salmon parr – smolt transformation", *Aquaculture*, vol. 273, pp. 235_245

Nofima-report

4. In the Norwegian Court proceeding, Biomar filed a report by Nofima, entitled "Optimised growth study. Feeding trial with Atlantic salmon (*Salmo salar*)", dated 8th December 2021. I understand that the same report was filed with Biomar's grounds of appeal, as PV32.

The aim of the trial was to investigate the effect of three different feeds containing salt additives or / and the amino acid tryptophan on the smoltification and seawater (SW) preadaptation of juvenile salmon. Atlantic salmon was put through a smolt protocol in freshwater (FW) involving continuous light and feeds intended to induce smoltification 3 different test diets were given to Atlantic salmon in fresh water in the last 5 to 11 weeks before transfer to seawater. The experiment also had a control group that received a feed that was to correspond to a commercial growth feed for smolt.

Initially, this experiment intended to test if different diets could induce smoltification in Atlantic salmon, how it affected growth in freshwater and after transfer to sea and development of traditional smoltification parameters. In addition, analyzes were made of other immune-related genes that are not used in commercial smolt production.

The main challenge for this experiment is that all experimental fish show clear smolt values before the fish are given the different experimental diets. Even the control fish show a good ability to osmoregulate at start-up. This means that the experiment is not about inducing smoltification in Atlantic salmon, but rather a study of growth and trying to maintain smolt status on Atlantic salmon in freshwater with different test diets. To then benchmark the growth after transfer to sea between the different treatment groups.

The two smolt parameters that clearly show that the fish are smoltified before the trial start are:

- The development of the smolt index from the acclimatization period until the experimental diets are given
- The seawater challenge tests at the start of the experiment.

Reference is made to page 16 of the Nofima report PV32, section 4.3.1:

4.3.1 Smolt index

At the start of the trial, the smolt index (ranging from 1-4) was 2.6. During the standard FW period, the smolt index ranged from 3.6-3.8 (Table 10), and between 3.8-4.0 for the delayed FW period. There were no significant differences in smolt index, except at FW4.

Table 10 Smolt index of salmon at start, during the standard FW period (FW1, FW3, FW4) and delayed FW period (FW6, FW8, FW10). The fish was given scores between 1-4 based on parr marks, silver colour and colour of the tailfin. Data (n=3 tanks per dietary treatment) are mean shown with SEM. Significant differences are tested with Kruskal-Wallis One-way ANOVA followed by Wilcoxon post-hoc test. Different letters indicate significant differences.

	Ctrl		mNa		NaTr		NaCa					
FW1	3.6	± 0.0	3.8	± 0.2	3.7	± 0.1	3.6	± 0.2				
FW3	3.7	± 0.1	3.7	± 0.0	3.7	± 0.1	3.6	± 0.0				
FW4	3.6	± 0.1	ab	3.8	± 0.0	a	3.7	± 0.1	ab	3.6	± 0.1	b
FW6	3.9	± 0.0	3.9	± 0.0	3.8	± 0.0	3.9	± 0.0				
FW8	4.0	± 0.0	3.9	± 0.0	3.9	± 0.0	3.9	± 0.0				
FW10	4.0	± 0.0	3.9	± 0.0	4.0	± 0.0	3.9	± 0.0				

In table 10 in the Nofima report (PV32), the development of the smolt index for all fish groups, including the control group, has increased from 2.6 to 3.6 at the first sampling (FW1). This is a classic development in the smolt index for Atlantic salmon that has received one or more smolt signals. Interpretation of the smolt index should always be seen in connection with ATPase development or seawater challenge test. This is because Atlantic salmon in fresh water can have a high smolt index without being able to osmoregulate satisfactorily in seawater. An example of this would be salmon in fresh water that has desmoltified. Here the fish will change back to a freshwater adapted salmon (lose their ability to osmoregulate seawater) without changing the silvery appearance.

But the development for all the fish group of table 10 indicates that all fish groups have received a smolt signal even before the experiment has started and are nearly completely smoltified. This becomes clear when one sees it in connection with the seawater tests that were done at the same time as the smolt index for FW1 was done, cf. Figure 10, page 17.

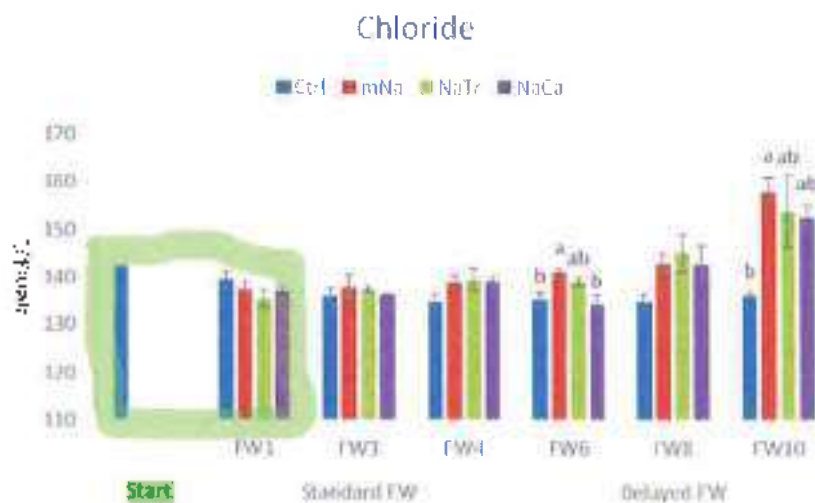


Figure 10 Chloride level (mmol/l) measured after seawater test (24h, about 34 ppm) at start, during the standard FW period (FW1, FW3, FW4) and delayed FW period (FW6, FW8, FW10). Data (n=3 tanks per dietary group) are mean shown with SEM. Significant differences are tested with One-way ANOVA followed by Tukey-HSD. Different letters indicate significant differences.

The fish show a good ability to osmoregulate already at the start of the experiment. Meaning it is by definition a smolt and not a parr. To be able to interpret a seawater challenge test, one looks at the increase in plasma chloride from a reference fish in fresh water compared to a similar fish that has spent a minimum of 24 hours in seawater. If the fish is able to cope with the transfer to sea, the increase in plasma chloride in the fish's blood should not be more than 15% compared to the reference values in fresh water. Figure 12 in the report shows that the reference values for plasma chloride in fresh water were around 125 mmol/l, which are normal values for Atlantic salmon in fresh water. The results from the seawater challenge tests (no individual values > 142 mmol/l chloride level) show that all the fish could have been transferred to the sea even before the experiment started.

Since all fish in this experiment were clearly already smoltified before the start of the experiment, I believe that this experiment can in no way be fit for concluding the relevance of Trp in smoltification or the effect of the feed claimed in EP 290. One cannot induce smoltification in a group of fish that has already been smoltified.

There are a few other things that are also worth noting when it comes to this experiment. There are clear signs that none of the test diets can maintain the smolt status of Atlantic salmon during the freshwater period. There is a clear tendency for seawater challenge tests to get worse as time goes on in all test groups (figure 10). This coincides with a sharp decline in the growth of fish during the same period. This indicates that the fish groups that receive test diets undergo a desmoltification. And the control group has a significantly better growth than the rest of the groups (figure 3, page 13 of PV32).

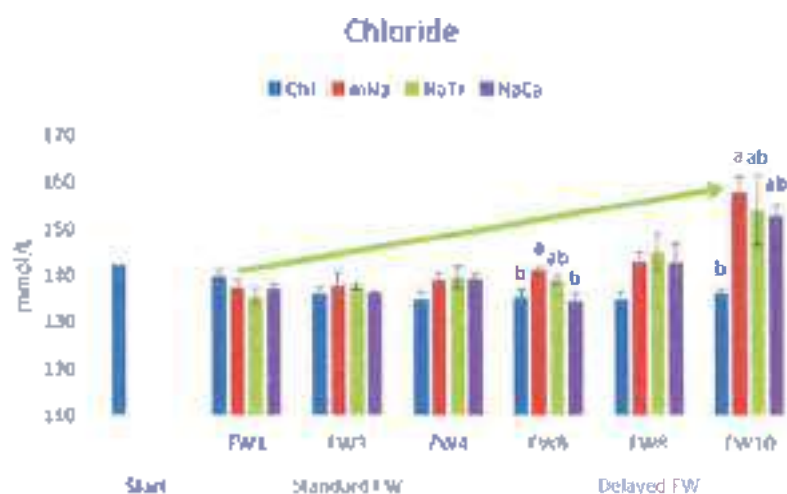


Figure 10 Chloride level (mmol/L) measured after seawater test (24h, about 34 ppm) at start, during the standard FW period (FW1, FW3, FW4) and delayed FW period (FW6, FW8, FW10). Data (n=3 tanks per dietary group) are mean shown with SEM. Significant differences are tested with One-way ANOVA followed by Tukey-HSD. Different letters indicate significant differences.

In the delayed FW period (week 47-53), the SGR varied from 0.7-1.5, whereas TGC was between 1.1-2.5 (Figure 3). SGR and TGC were significantly higher for the control group compared to the other groups. The final weights after second delayed FW period were 111-172 g, and the control group showed 1.4-1.5 times higher weight than the other groups (Figure 3).

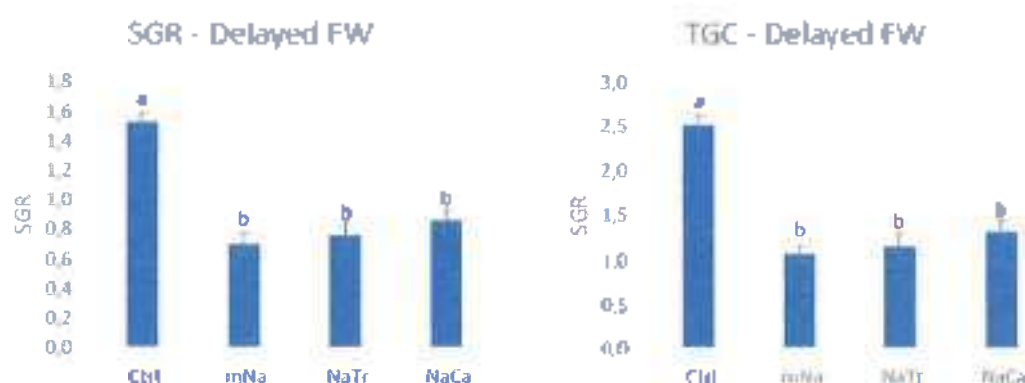


Figure 3 SGR and TGC during the second delayed FW period (week 47-53). Data (n=3 tanks per dietary groups) are means shown with SEM. Significant differences are tested with One-way ANOVA followed by Tukey-HSD. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

In conclusion, the fact that the fish used in the trial reported in the Nofima report (PV32) were already smoltified, the experiment is not suitable for showing differences between three feeds tested.

Alesund 19/5-22



Richard Torrissen

Richard Torrissen

Marine biotechnologist

Experience

2020 - current

Customer advisor - Artec Aqua

Follow-up of biological performance in aquaculture facilities that Artec Aqua has built. Production planning for planned land-based facilities. Both RAS, through flow and hybrid facilities. Analysis of water quality for biological production of salmonids.

2016-2020

Key Account Manager - STIM

Technical manager for SuperSmolt globally and sales responsibility in the Nordic region. Optimization of SuperSmolt technology and implementation of SuperSmolt Original og FeedOnly. Main responsibility for internal training.

2008-2016

Key Account Manager and smolt expert – Europharma/Fishguard/ACD Pharma

Technical implementation of SuperSmolt program. Optimization of anesthesia and vaccination of salmon and trout. Production planning and follow-up of smolts. Analysis of plant data for salmon farmed in fresh water.

Education

2005-2008

Bachelor in Marine Biotechnology

Ålesund University College

2002-2004

Bachelor in Market Economy

BI Trondheim

Skills

- Smoltification
- Water quality for fish farming
- Production planning for aquaculture
- SuperSmolt technology

Contact

Nedre Klasgarden 23
6016 Ålesund, Norway
+47 48 2000 46
richardtorrissen@gmail.com



NORGES HØYESTERETT

Den 12. juli 2022 ble det av Høyesteretts ankeutvalg med dommerne Skoghøy, Matheson og Sæther i

HR-2022-1396-U, (sak nr. 22-072060SIV-HRET), sivil sak, anke over dom:

Biomar A.S.

(advokat Magnus Hauge Greaker)

mot

Stim. AS

(advokat Ida Espolin Johnson)

truffet slik

B E S L U T N I N G :

Biomar A.S. har anket Borgarting lagmannsretts dom 16. mars 2022 i sak nr. 20-074565ASD-BORG/03 mot Stim. AS. Biomar A.S. har blant annet anført at lagmannsrettens dom må oppheves i utvalget i medhold av tvisteloven § 30-3 andre ledd.

Høyesteretts ankeutvalg viser til at utvalget kan oppheve en avgjørelse dersom det foreligger feil som ubetinget skal tillegges virkning, jf. tvisteloven § 29-21 andre ledd, eller utvalget av andre grunner enstemmig finner det klart at det er grunnlag for opphevelse, jf. tvisteloven § 30-3 andre ledd. Anke til Høyesterett kan ikke fremmes uten samtykke fra ankeutvalget. Utvalget kan bare gi samtykke når anken gjelder spørsmål som har betydning utenfor den foreliggende sak, eller det av andre grunner er særlig viktig å få saken avgjort i Høyesterett, jf. tvisteloven § 30-4.

Ankeutvalget finner enstemmig at det ikke er grunn til å oppheve lagmannsrettens dom i utvalget etter tvisteloven § 30-3 andre ledd, og at verken avgjørelsens betydning utenfor den foreliggende sak eller andre forhold tilsier at saken blir fremmet for Høyesterett, jf. tvisteloven § 30-4. Anken tillates derfor ikke fremmet.

Ankemotparten har krevd 300 300 kroner i sakskostnader for ankeutvalget. Kravet tas til følge.

S L U T N I N G

Anken tillates ikke fremmet.

I sakskostnader for Høyesterett betaler Biomar A.S. til Stim. AS 300 300
– trehundretusentrehundre – kroner innen 2 – to – uker fra forkynnelsen av beslutningen.

Wilhelm Matheson
(sign.)

Jens Edvin A. Skoghøy
(sign.)

Knut Erik Sæther
(sign.)

Dokumentet er i samsvar med originalen:
Lars Kristian Skantze



NORGES HØYESTERETT

On 12 July 2022 the Appeals Committee of The Supreme Court with judges Skoghøy, Matheson and Sæther in

HR-2022-1396-U, (case no. 22-072060SIV-HRET), civil case, appeal of decision:

Biomar A.S. (counsel Magnus Hauge Greaker)

against

Stim. AS (counsel Ida Espolin Johnson)

made the following

DECISION

Biomar A.S. has appealed the decision of Borgarting appeal court of 16th of March 2022 in case no. 20-074565 ASD-BORG/03 against Stim AS. Biomar A.S. has inter alia submitted that the decision of the high court should be annulled by the appellate body in accordance with The Dispute Act, section 30-3, 2.

The Appeals Committee of The Supreme Court submits that the committee can annul a decision if errors are present which implicitly shall be granted effect, cf. The Dispute Act, section 29-21, 2, or if the committee for other reasons unanimously finds that there is clearly basis for annulment, cf. The Dispute Act, section 30-3, 2. An appeal before The Supreme Court may not be brought before the Court without consent from the Appeals committee. The Appeals committee can only give its consent when the appeal regards questions which have relevance outside the present case, or if for other reasons is particularly important to have the case decided in The Supreme Court, cf. The Dispute Act, section 30-4.

The Appeals Committee unanimously finds that there is no basis for annulling the decision of the appeal court by the Committee in accordance with The Dispute Act, section 30-3, second paragraph, and that neither the relevance of the decision outside the present case or other circumstances indicate that the case should be brought before The Supreme Court, cf. The

Dispute Act, section 30-4. The appeal is therefore not allowed brought before the Supreme Court.

The counterpart has requested NOK 300 300 in legal costs for the Appeals Committee. The request is approved.

RENDITION OF JUDGEMENT

The appeal is not allowed to be brought before the Supreme Court.

For legal cost before The Supreme Court, Biomar A.S. pays Stim AS NOK 300 300 – three hundred thousand three hundred Norwegian crowns within 2 weeks from the service of the decision.

Wilhelm Matheson
(sign.)

Jens Edvin A. Skoghøy
(sign.)

Knut Erik Sæther
(sign.)

Documents are in accordance with the original:

Lars Kristian Skantze



A-2021-25107



Fallo de aceptación a registro (ley nueva)

Solicitud 2014-003161
Hoja 1 de 5

Expediente N° 10.664; ASILFA con
GENENTECH INC.

Santiago, 10 de Junio de 2021

VISTOS:

1. ANTECEDENTES DE LA SOLICITUD.

TIPO Y NRO. DE SOLICITUD : **Patente de invención PCT 2014 - 003161**

TITULO : ANTICUERPO QUE SE UNE A UN RECEPTOR DE TRANSFERRINA (TFR) ACOPLADO A UN COMPUESTO Y CON FUNCION EFECTORA REDUCIDA O ELIMINADA; USO PARA PREPARAR UN MEDICAMENTO UTIL PARA EL TRANSPORTE DE UN COMPUESTO A TRAVES DE LA BARRERA HEMATOENCEFALICA.

CLASIFICACION : C 07K 16/28(2006.01), C 07K 16/40(2006.01), C 07K 16/46(2006.01), A 61K 39/395(2006.01), A 61K 47/51(2017.01), A 61P 25/00(2006.01)

FECHA DE SOLICITUD : 21/11/2014

PRIORIDAD : 61/649,878 21/05/2012 US, 61/698,495 07/09/2012 US y 61/763,915 12/02/2013 US

FECHA DE PUBLICACIÓN : 27/02/2015

SOLICITANTE : GENENTECH, INC.
1 DNA WAY, SOUTH SAN FRANCISCO, CALIFORNIA 94080, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA.

ABOGADO PATROCINANTE : SARGENT & KRAHN
AV. ANDRÉS BELLO 2711, PISO 19, Las Condes, Región Metropolitana, CHILE.

2. ANTECEDENTES DE LA OPOSICIÓN.

OPONENTE : ASOCIACIÓN INDUSTRIAL DE LABORATORIOS FARMACÉUTICOS AG.

DOMICILIO : Pío Nono N° 110-C, Recoleta, Santiago, Chile.

CAUSAL INVOCADA : Que, dentro del plazo legal, la ASOCIACIÓN INDUSTRIAL DE LABORATORIOS FARMACÉUTICOS AG., interpuso demanda de oposición en contra de la

Si desea verificar la integridad y autenticidad del presente documento electrónico, puede hacerlo en los Expedientes Electrónicos publicados en www.inapi.cl, o presencialmente en módulos de autoconsulta en las oficinas de INAPI, en Alameda 194, Santiago.

**Expediente N° 10.664; ASILFA con
GENENTECH INC.**

solicitud de patente de invención de autos, fundada en los artículos 5, 31, 32, 33 y demás disposiciones pertinentes de la Ley N° 19.039, solicitando su rechazo total.

El oponente alega que la petición de autos no tiene Novedad, ya que en el informe de búsqueda PCT/US2013/041860, se encontraron dos documentos X, que afectan todas las reivindicaciones.

3. DE LA CONTESTACIÓN DEL DEMANDADO.

Que se confirió traslado de la oposición al solicitante, quien contestó la demanda solicitando sea rechazada, por falta de fundamentos.

LA PRUEBA RENDIDA.

Que se tuvo por contestada la oposición, y se recibió la causa a prueba, a fin de que el demandante acredite: "Efectividad que la invención cuya patente se solicita, existe en el estado de la técnica con anterioridad a la fecha de presentación de la solicitud de autos o de la respectiva prioridad, según sea el caso".

Que, durante la fase de prueba, ninguna de las partes presentó documentos.

4. DEL ANÁLISIS TÉCNICO.

1.- Que fue designado perito en estos autos don Simón Beard, Ingeniero en Biotecnología Molecular, quien aceptó el cargo con fecha 27 de julio de 2016.

2.- Que el perito evacuó el informe pericial N°1 con fecha 30 de septiembre de 2016 y el informe pericial N°2 con fecha 25 de septiembre de 2017.

3.- Que el solicitante formuló observaciones a los informes periciales N°1 y N°2.

4.- Que el demandante no hizo observaciones a los informes pericial antes señalados y el plazo para hacerlo se encuentra vencido.

5.- Que, de acuerdo a lo señalado en el informe pericial N°2, el perito informa que la solicitud no cumple con el requisito de novedad establecido en el artículo 33 de la Ley N° 19.039, por cuanto el documento CL 201301535 (D1), equivalente a WO 2012/075037 A1 (D2) (=D1), interfiere con las reivindicaciones de la solicitud de autos.

6.- Que, en relación con el análisis de nivel inventivo, en el informe pericial N°2 el perito señala que acorde con la UI en análisis, el análisis de Nivel Inventivo se realizará considerando la cláusula N° 8. Las cláusulas N°s 1a, [6, 16, 19-21], 1b, 2 y 17 (enmendadas) que no son Novedosas, y en consecuencia no pueden ser inventivas no serán analizadas. Por su parte, las cláusulas N°s 3-5, 7, 10-15 y 22-24 y 26-36 afectadas por preámbulo y caracterizado incorrecto y/o falta de claridad, las cláusulas N°s 9 y 18 afectadas por exclusión de patentabilidad, y la cláusula N° 25 (enmendada) que no pertenece a la UI seleccionada tampoco serán analizadas.

Asimismo, señala el perito que el problema técnico que aborda el pliego en análisis acorde a la UI seleccionada se relaciona con proveer métodos para mejorar la seguridad en el transporte de la barrera hematoencefálica (BBB) mediada por un receptor de barrera hematoencefálica (BBB-R).

Así, para abordar este problema, el pliego en análisis de la UI seleccionada de la solicitud nacional propone el uso de un anticuerpo de acuerdo con la cláusula N° 1a (enmendada) para preparar un medicamento útil para el transporte de un compuesto a través de la barrera

**Expediente N° 10.664; ASILFA con
GENENTECH INC.**

hematoencefálica en donde el anticuerpo acoplado al compuesto es usado con un compuesto adicional, seleccionado de eritropoyetina (EPO), un complemento de hierro, vitamina C, ácido fólico, y vitamina B12, o donde el compuesto adicional es de glóbulos rojos o reticulocitos del mismo u otro sujeto (cláusula N° 8, enmendada).

Indica el perito que el documento Yu, Y. Joy, et al. “Boosting brain uptake of a therapeutic antibody by reducing its affinity for a transcytosis target.” *Science translational medicine* 3.84 (2011): 84ra44-84ra44. Fecha de Publicación: 25/05/2011 (D3), podría considerarse como el estado de la técnica más cercano a la solicitud nacional.

Al igual que la solicitud en estudio, D3 muestra el uso de anticuerpos terapéuticos específicos de baja afinidad para el receptor de transferrina (TfR) acoplados a un segundo compuesto (enzima β -secretasa, BACE1) útiles para el tratamiento de un trastorno neurológico (enfermedad de Alzheimer). A diferencia de la solicitud en estudio, D3 no especifica el uso del anticuerpo que se une a TfR con un compuesto adicional.

Se concluye entonces que el problema técnico objetivo es brindar una nueva alternativa a la técnica ya conocida del uso de anticuerpos que se unen a TfR útiles para preparar un medicamento para tratar un trastorno neurológico (D3).

Señala el perito que el D3 no explicita el uso de un anticuerpo que se une al receptor de transferrina (TfR) junto a un compuesto adicional, por lo que un experto en la materia a la luz del estado del arte previo más cercano (D3) no se hubiese visto motivado a utilizar sus enseñanzas de manera de solucionar el problema técnico objetivo de la misma manera que lo hace el pliego en análisis de la solicitud en estudio, de manera que la cláusula N° 8, no sería obvia. Sin embargo, dentro de los antecedentes presentados junto a la solicitud nacional no se muestra el uso de un anticuerpo que se une a TfR junto a un compuesto adicional (como eritropoyetina (EPO), un complemento de hierro, vitamina C, ácido fólico, y vitamina B12, o donde el compuesto adicional es de glóbulos rojos o reticulocitos del mismo u otro sujeto), de manera que no se puede determinar si la presencia de este compuesto adicional tiene un efecto técnico. En consecuencia, la cláusula N° 8 (enmendada) no puede tener Nivel Inventivo de acuerdo al artículo 35 de la Ley 19.039.

Indica el perito que, en su contesta al Informe Pericial, el solicitante indica que “D1 y D3 no discuten ninguna reducción de los niveles de glóbulos rojos en el sujeto tras la administración del anticuerpo. Por lo tanto, un experto en la materia no habría tenido ninguna razón en vista de D1 y D3 para modificar la función efectora o la función de activación del complemento del anticuerpo para reducir este efecto desconocido. (...) La presente solicitud informa que los estudios fueron repetidos con anticuerpos con regiones Fc que poseen una o más de las siguientes modificaciones: una mutación N297G o N297A en la región Fc que anula la glicosilación (...). En consecuencia, reivindicaciones de la presente invención difieren de D1 y D3 en proporcionar anticuerpos con la función efectora de la región Fc del anticuerpo o la función de activación del anticuerpo reducida o eliminada (...). El efecto técnico de esta diferencia es una reducción disminuida o eliminada de los niveles de glóbulos rojos después de la administración. Este efecto técnico no habría sido esperado en vista de D1 o D3 porque el problema ni siquiera fue reconocido en estos documentos” (ver Contesta al Informe Pericial del 28/03/2017, página 2, párrafo 6; página 3, párrafos 3 y 4).

Sin embargo, el Perito considera que esta argumentación no es persuasiva: el documento D1 (=D2) enseña un anticuerpo biespecífico anti-TfR^A/BACE1 en el cual el brazo anti-TfR comprende una mutación en la región Fc que anula la glicosilación (N297G), de manera que el efecto de esta mutación sobre los niveles de glóbulos rojos observados en el sujeto después de su administración se encuentra incorporado implícitamente en la divulgación de D1 (=D2), y su constatación no entrega Novedad o Nivel Inventivo a la presente solicitud.

**Expediente N° 10.664; ASILFA con
GENENTECH INC.**

En conclusión, la solicitud no tiene nivel inventivo y no cumple con el artículo 35 de la Ley N°19.039.

7- Que, por otra parte, la presente solicitud tiene aplicación industrial, dado que la materia reivindicada es susceptible de ser reproducida en la industria, de acuerdo al artículo 36 de la Ley N°19.039.

8.- Que, asimismo, en el informe pericial N°2 el perito indica que las cláusulas 9 y 18 contienen materia excluida de patentabilidad, de acuerdo al artículo 37 letra d) de la Ley N° 19.039, ya que declaran métodos de tratamiento terapéutico.

9.- Que en virtud de lo dispuesto en el artículo 86 del Reglamento de la Ley N° 19.039, se ordenó que pasaran los antecedentes a la Examinadora Carolina Garrido, a objeto que evacue un Informe Técnico.

10.- Que, en su Informe Técnico N°2, la Examinadora señala que la Resolución de correcciones de fondo, notificada con fecha 03 de septiembre de 2020, señala que la solicitud no cumple con los requisitos de novedad y nivel inventivo, de acuerdo con lo establecido en los artículos 33 y 35 de la Ley N°19.039.

Que, además, la Resolución de correcciones de fondo señala que la solicitud comprende materia excluida de patentabilidad de acuerdo con el artículo 37, letra d) de la Ley N°19.039.

Que, el solicitante aportó nuevos antecedentes con fecha 30 de noviembre de 2020, constituidos por Pliego de reivindicaciones compuesto por 13 cláusulas y con fecha 28 de diciembre de 2017, Memoria descriptiva, página 169 y Hoja técnica. El nuevo pliego modificó la reivindicación 1 eliminando la opción de que el anticuerpo fuera un isotipo que tiene naturalmente reducida o eliminada su función efectora. Además, se modificó la redacción de la reivindicación 13. Estas modificaciones no comprenden ampliación del contenido original.

Que, en relación con la observación de exclusión de patentabilidad de la reivindicación 13, la examinadora señala que la modificación en su redacción permite subsanar dicho problema. La nueva reivindicación 13 ya no indica un método de tratamiento, sino que el uso conjunto del anticuerpo en conjunto con otros compuestos para preparar un medicamento.

Que, en relación con la novedad, la examinadora informa que el nuevo pliego sí cumple con dicho requisito. La nueva reivindicación 1 eliminó la opción de que el anticuerpo fuera un isotipo que tiene naturalmente reducida o eliminada su función efectora. La nueva reivindicación 1 restringe el anticuerpo que se une al receptor de transferrina (TfR) a un anticuerpo IgG acoplado a un compuesto y cuya función efectora o la función de activación del complemento del anticuerpo ha sido reducida o eliminada en relación a un anticuerpo de tipo silvestre del mismo isotipo mediante una o más de una mutación N297A o una mutación D265A. El documento D1 que afectaba la novedad de la solicitud no divulga un anticuerpo con dichas mutaciones específicas. Por lo tanto, el documento D1 ya no afecta la novedad del pliego de reivindicaciones.

Que, en relación con el análisis de nivel inventivo, la examinadora señala que el nuevo pliego sí cumple con dicho requisito. El documento D1 corresponde a la presentación nacional de un documento P y, por tanto, no puede ser utilizado para el análisis de novedad. El documento estado de la técnica más cercano corresponde a D3 que reporta evidencia que sustenta la factibilidad del uso de anticuerpos terapéuticos específicos de baja afinidad para TfR y de alta afinidad por BACE1, un blanco de drogas para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. En particular, D3 muestra que variantes de anticuerpos anti-TfR de menor afinidad muestran una mayor captación en el cerebro y una mayor localización en el cerebro. Sin embargo, el

**Expediente N° 10.664; ASILFA con
GENENTECH INC.**

documento D3 no indica que el anticuerpo tenga eliminada o reducida su función efectora. El efecto técnico de esta diferencia es una disminución o eliminación de la reducción de los niveles de glóbulos rojos después de la administración. Este efecto técnico no se puede esperar en vista de D3 porque este problema técnico no fue reconocido en dicho documento. La examinadora, por tanto, considera que el pliego de reivindicaciones sí cumple con el requisito de nivel inventivo.

Que, sin embargo, la solicitud de autos adolece de errores de tipo formal en la hoja técnica que no afectan el fondo, y que atendida su naturaleza se corrigen de oficio por la examinadora.

5. CONSIDERANDO:

1.- Que, de acuerdo con el mérito de los antecedentes, cabe concluir que el Informe Técnico de la Examinadora, señala que la solicitud cumple con los requisitos de patentabilidad establecidos en el artículo 32 de la Ley N°19.039.

2.- Que, en consecuencia, este Tribunal, apreciando los antecedentes de acuerdo a las normas de la sana crítica, hace suyas las fundamentaciones expuestas por la Examinadora, en el sentido de que la solicitud cumple con los requisitos de patentabilidad de novedad, nivel inventivo y aplicación industrial establecidos en el artículo 32 de la Ley N°19.039.

3.- Que, atendido que la demanda de oposición de la Asociación Industrial de Laboratorios Farmacéuticos AG., no presenta los fundamentos de hecho en forma, puesto que no cita los documentos del Informe de Búsqueda PCT que eventualmente interferirían la materia reivindicada en autos y, asimismo, omite indicar de qué forma y qué contenidos de los documentos en referencia vulnerarían los requisitos de patentabilidad, procede rechazar ésta.

4.- Que, se tuvo por evacuado el Informe Técnico N°2 de la Examinadora y se citó a las partes a oír sentencia.

5.- Que, de acuerdo al mérito de los antecedentes, se deja expresa constancia que la solicitud no infringe lo dispuesto en el artículo 38 de la Ley N° 19.039.

Por las consideraciones antes expuestas, y teniendo presente lo dispuesto en la Ley N° 19.039, en sus artículos 31, 32, 33, 35, 36, 37 y las disposiciones pertinentes del Reglamento.

RESUELVO:

Rechazar la oposición y conceder la solicitud de patente de invención N° 201403161, conforme al pliego de reivindicaciones de fecha 30 de noviembre de 2020.

Notifíquese, regístrese y archívese.

Resolución notificada por el Estado Diario con esta fecha. Resolución firmada por quien ejerce el cargo de Directora Nacional del Instituto Nacional de Propiedad Industrial, en calidad de titular o subrogante, y por el(la) Secretario(a)-Abogado(a) de Patentes de invención, Modelos de Utilidad, Dibujos y Diseños Industriales y Esquemas de Trazado o Topografías de Circuitos Integrados.

Santiago, veintitrés de agosto del año dos mil veintidós

VISTOS:

Que, en autos se ha presentado la solicitud de patente de invención N°2018000387, Rol N° 001538-2020, para: "MOLDE PARA MOLDEAR UNA TAPA DE BÓVEDA DE MATERIAL POLIMÉRICO QUE CONSTA DE UN TROQUEL DE CAVIDAD Y UN TROQUEL CENTRAL AJUSTADOS POR UN BORDE DE CORTE TELESCÓPICO, DONDE LA TAPA SE MOLDEA ENTRE LOS TROQUELES, TIENE UNA SUPERFICIE TEXTURIZADA Y CUENTA CON UN MECANISMO DE REMOCIÓN DE LA TAPA MOLDEADA. (DIVISIONAL DE SOL. 201600802)", por CHANNELL COMMERCIAL CORPORATION y PRC COMPOSITES, LLC.

Que, la solicitud fue admitida a tramitación y una vez publicada no fue objeto de demandas de oposición en su contra.

Que, con fecha uno de octubre del año dos mil veinte se dictó resolución de rechazo por parte de INAPI, estimando que la misma carecía de nivel inventivo, de conformidad con lo establecido en el artículo 35 de la Ley de Propiedad Industrial.

Que, el veintiuno de octubre del año dos mil veinte, el solicitante interpone recurso de apelación para lo cual elabora argumentos técnicos respecto del rechazo de la solicitud, a fin de avalar sus argumentos en favor del nivel inventivo de la presente invención.

Que, con fecha veintiuno de diciembre del año dos mil veinte, se trajeron los autos en relación

Que, durante el estado de acuerdo este Tribunal ha determinado la necesidad de oír a un perito para que informe, si la solicitud de autos cumple con los requisitos legales para ser otorgada, dictando al efecto, una medida para mejor resolver, pidiéndole al profesional designado Sr. David Alejandro Espejo Canales, Ingeniero Civil Mecánico, que informe sobre los siguientes puntos:

1. Ilustrar al Tribunal sobre la invención que se busca proteger, considerando siempre el último pliego de reivindicaciones válidamente presentado. Analizar si dicho pliego constituye una ampliación del contenido original y de los pliegos presentados, especialmente del analizado por el resolutor de primer grado y si éste se encuentra debidamente sustentado en la memoria descriptiva y si presenta unidad de invención. Desde los antecedentes que existen en la Memoria Descriptiva, determinar cuál era el problema técnico que se buscaba resolver.

2. Ilustrar al Tribunal sobre cuáles son las características especiales, en el evento de tenerlas, que posee la invención presentada a patentamiento respecto del estado del arte conocido, en particular en cuanto a los documentos D1, D2, D3 y D4, así como otros antecedentes relevantes.

3. Ilustrar al Tribunal si lo reivindicado corresponde a una tapa o molde para moldear la tapa, y si se encuentran o no descritas en la invención solicitada, particularidades técnicas o físicas, entre otras, la existencia de un mecanismo de expulsión y una superficie texturizada en la parte superior de la tapa, así como, medios para alinear el troquel de la cavidad y el troquel central, y en caso afirmativo, si estas características, son o no, de uso estándar en la industria, si están descritas o no en la solicitud de autos, y si esto constituye una ventaja, frente a lo descrito en el estado del arte.

4.-Ilustrar al Tribunal, si la tapa o cubierta para bóvedas y pozos para servicios públicos que sean ligeras en peso, durables para soportar cargas, con características UV mejoradas, con resistencia al deslizamiento, rica en resina por encima de las fibras, y método para fabricarla, y constituye o no una ventaja, frente a lo descrito en el estado del arte y si la invención solicitada cuenta o no, con dichas cualidades.

5. Que, señale al Tribunal si los pliegos que componen las patentes otorgadas en el extranjero, acompañadas en autos, pueden ser tenidos como equivalentes a la solicitud requerida en la presente solicitud.

6. Si, teniendo presente la conclusión de los puntos anteriores y el análisis de lo divulgado en el arte previo, la solicitud de invención posee nivel inventivo o si, por

el contrario, carece de este requisito, explicando cómo y por qué llega a esa conclusión.

Que, en autos consta el informe pericial requerido y se ha rendido cuenta pública del mismo, realizándose la audiencia pública vía telemática, en fecha diecisiete de agosto del año dos mil veintidós, con la asistencia del abogado de la parte, Sr. Francisco Valverde Bórquez.

CON LO RELACIONADO Y CONSIDERANDO:

PRIMERO: Que, el centro de la discrepancia del solicitante con la resolución de primer grado, radica en que el INAPI señala que la solicitud carece de nivel inventivo de conformidad con lo establecido en el artículo 35 de la Ley de Propiedad Industrial, con respecto a los documentos D1, D2, D3 y D4, a diferencia de lo que señala el requirente de la solicitud de autos, que ésta cumple con los requisitos de patentabilidad.

SEGUNDO: Que, señala el artículo 35: Se considera que una invención tiene nivel inventivo, si, para una persona normalmente versada en la materia técnica correspondiente, ella no resulta obvia ni se habría derivado de manera evidente del estado de la técnica.

Esta última norma se debe concordar en el artículo 33 del Reglamento de dicha ley, que preceptúa: "Para determinar el nivel inventivo a que se refiere el artículo 35 de la Ley, se considerará el grado de conocimiento que exista en el respectivo sector de la técnica".

TERCERO: Que, la descripción de la solicitud, el campo técnico, se refiere a las tapas plásticas de bóveda para servicios públicos, por ejemplo de alcantarillado o cajas de cableado y, en particular la solicitud trata de un molde para moldear una tapa de bóveda, el cual se hace de un material polimérico reforzado con fibra.

El pliego válido para el análisis del perito designado en esta instancia, fue presentado en el INAPI el 21 de abril de 2020, constante de 12 cláusulas, todas referentes a un molde para moldear una tapa, con una sola reivindicación independiente.

La reivindicación principal se transcribe a continuación:

REIVINDICACIONES

1. Un molde para moldear una tapa de bóveda para servicios públicos de material polimérico reforzado con fibra, CARACTERIZADO porque comprende:

un troquel de cavidad;

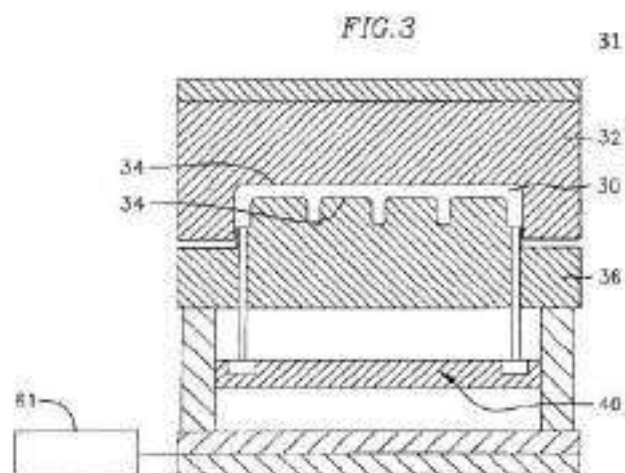
un troquel central con un borde de corte telescópico para la interconexión con el troquel central dentro del troquel de cavidad, en donde la tapa se moldea entre el troquel de la cavidad y el troquel central; y

un mecanismo de expulsión de la tapa para remover la tapa moldeada del molde;

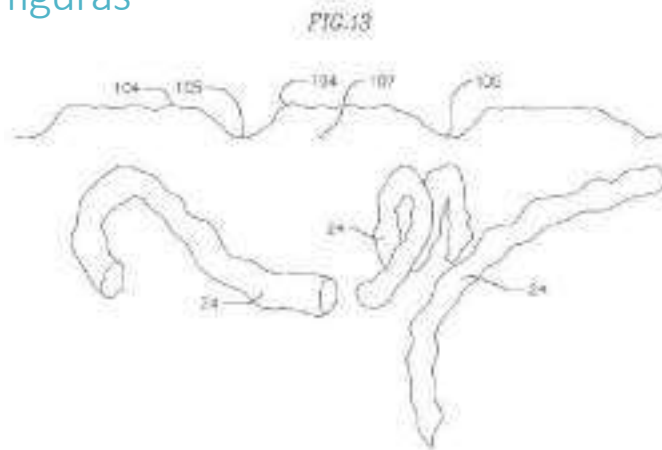
en donde el troquel de cavidad forma una superficie texturizada en una superficie superior de la tapa, al tener una pluralidad de protuberancias que empujan las fibras individuales de la tapa de bóveda para servicios públicos de material polimérico reforzado con fibra lejos de la superficie superior, para crear una capa rica en resina por encima de las fibras individuales.

Cuyas figuras se muestran a continuación

Solicitud, figuras



Solicitud, figuras



CUARTO: Que, el problema técnico de la solicitud, tiene relación con proporcionar un molde para tapas de bóvedas de sectores públicos o de industrias, tales como aquellas para contener cables, líneas de gas, de energía y otros conductos.

Dicho molde es capaz de fabricar una tapa que soporte cargas suficientes y además que tenga una resistencia mejorada al deslizamiento ante situaciones de humedad, en particular, el molde es capaz de fabricar una tapa con una superficie rica en resina, que se moldea durante la fabricación y que otorga una resistencia a la intemperie, combinando textura y estabilidad en los rayos UV.

QUINTO: Que, los documentos del estado del arte son los siguientes D1 (EP2052836), describe un Método de Moldeo por inyección. En que el problema técnico tiene relación con reducir porciones de moldeo en un procedimiento de moldeo por inyección, es decir reducir el material de exceso que se le entrega al molde para crear una pieza, lo que es bastante más complicado que sólo una tapa.

Se describe una configuración de troqueles para el moldeo.

El documento D1 describe un procedimiento de moldeo por vacío negativo, donde el procedimiento va enfocado a ser asegurado para el llenado del molde, no describe que uno de los troqueles tenga una superficie texturizada, ni crear propiedades especiales de la materia. Tampoco describe que los troqueles tengan superficies texturizadas, ni ninguna otra propiedad, ni detalla que el molde se use con resina con fibras, por lo que no describe un procedimiento para empujar las fibras ni crear una superficie rica en resina.

Siendo la solicitud distinta a D1, ya que presenta características especiales y es otro el problema técnico.

SEXTO: Que, el documento D2 (EP0416791), atiende otro problema técnico, ya que describe un aparato y método para moldeo por compresión, en el que los moldes se dedican al moldeo de partes de gran tamaño y el calentamiento de los moldes para lograr una fluidez uniforme de la resina durante el procedimiento de moldeo, se centra en los electrodos que se utilizan para calentar el molde y la pieza a moldear y finalmente no logra describir que los troqueles tengan superficies, ni el uso de características de los moldes para el trabajo de una resina con fibras. Por lo que, D2 describe elementos de electrodos para calentar la pieza a moldear, no describe que uno de los troqueles tenga una superficie texturizada; ni especifica el uso de una resina con fibras, por lo que no puntualiza un procedimiento para empujar las fibras ni crear una superficie rica en resina.

SÉPTIMO: Que, en cuanto a D3 (JPH0727818U), en que el problema técnico tiene relación con la temperatura de calentamiento de las partes del molde, combinada con la compresión aplicada a los troqueles. Se trata de un procedimiento diferente, que es un moldeo por compresión.

D3 no describe que uno de los troqueles tenga una superficie texturizada, tampoco detalla características para trabajar el uso de una resina con fibras, por lo que no especifica un procedimiento para empujar las fibras ni crear una superficie rica en resina.

OCTAVO: Que, respecto a D4 (WO9008023), el problema técnico tiene relación con la extracción de la pieza moldeada, en que se proporcionan medios para conseguir la extracción de la misma, consiste en moldear diferentes tipos de objetos sin desmontar por completo el molde.

En parte el CARACTERIZADO, de la reivindicación, también nombra medios para la extracción de una pieza, pero no es lo que le otorga el nivel inventivo a la invención y lo central de la invención solicitada, no aparece escrito en D4, ya que no describe que uno de los troqueles tenga una superficie texturizada, ni señala el uso de una resina con fibras, ni medios para trabajar, por lo que no detalla un procedimiento para empujar las fibras ni crear una superficie rica en resina.

NOVENO: Que, de acuerdo a los requisitos de patentabilidad, ninguno de los documentos D1 a D4, alcanza a describir las características que aparecen en los

troqueles de la solicitud y tampoco ninguno tiene medios para trabajar específicamente con piezas, ni hacer una gestión de un manejo de las fibras en la resina durante el procedimiento de moldeo. Tampoco se describe que los moldes del estado del arte citado utilicen una resina con fibras, por lo que no especifica un procedimiento para empujar las fibras ni crear una superficie rica en resina.

DÉCIMO: Que, a juicio del perito designado en esta instancia la solicitud tiene nivel inventivo, ya que las características novedosas tienen efectos técnicos no observados en el estado del arte, ni sugeridos, ni perseguidos por ninguno de los documentos que han sido citados que tengan por efecto técnico la creación de la capa rica en resina que le otorgaría una resistencia a la intemperie, que combinaría una textura, como una estabilidad de los rayos ultravioletas (UV), y este efecto técnico, siendo un efecto sorprendente que no ha aparecido antes, ni sugerido por el estado de la técnica, ni tampoco se ha proporcionado un molde para manejar el contenido de la fibra, ni la densidad de la fibra en la resina durante el moldeo, por ello, es que la solicitud tiene nivel inventivo.

DÉCIMO PRIMERO: Que, en cuanto a las presentaciones internacionales patentadas en: Australia (AU 2017/203606); Canadá (CA 3014607); Nueva Zelanda (NZ 724009); Singapur (SG 10201804092Q); tienen contenido técnico similar y un alcance de protección similar a la solicitud de autos y se pueden considerar equivalentes.

En cuanto a la solicitud de Estados Unidos, no tiene un pliego similar, sin embargo reivindica un procedimiento de moldeo, que usa el mismo molde de la solicitud y el contenido técnico es similar a la solicitud de autos.

DÉCIMO SEGUNDO: Que, estos sentenciadores se encuentran contestes con las conclusiones señaladas por el perito designado en esta instancia, por cuanto, la reivindicación del molde y el molde en sí, es capaz de hacer esta capa de resina en un solo paso, sin aplicar resina después de refuerzo, ya que las protuberancias del molde son capaces de mover las fibras de la resina reforzada por fibra y crear en un solo paso, en un solo moldeo esta capa que es rica en resina y que tiene menos fibra, por lo que así las cosas, el molde es capaz de fabricar una tapa con una superficie rica en resina, que se moldea durante la fabricación y que otorga una

resistencia a la intemperie, combinando textura y estabilidad en los rayos UV, lo que produce un efecto sorprendente capaz de lograr nivel inventivo.

DÉCIMO TERCERO: Que, por lo señalado se estiman atendibles los fundamentos del recurso de apelación de fecha veintiuno de octubre del año dos mil veinte, ya que la solicitud cumple con el requisito de nivel inventivo.

SE RESUELVE:

Por lo anterior, en mérito de lo expuesto y conforme a lo previsto en los artículos 6, 7, 16, 17 bis B, 18 bis C) y 35 de la Ley de Propiedad Industrial, artículos 186 y siguientes del Código de Procedimiento Civil, se revoca la resolución apelada de fecha uno de octubre del año dos mil veinte, en cuanto denegó la solicitud requerida por carecer de nivel inventivo. Y en definitiva, se declara que se otorga la patente solicitada, por estimar que la solicitud cumple con todos los requisitos de patentabilidad.

Dejase constancia que procede la devolución de la suma consignada para la interposición del recurso.

Devuélvanse los autos.

Rol TDPI N° 001538-2020

Pronunciada por los Ministros Sra. Carmen Iglesias Muñoz, Sr. Juan Cristóbal Guzmán Lagos y Sr. Andrés Álvarez Piñones.

Santiago, veintiocho de julio de dos mil veintiuno

VISTOS:

Que, en autos se ha presentado a trámite la solicitud de patente N° 201602387, Rol TDPI N° 1794 - 2019, para: “DISPOSITIVO Y SISTEMA DE ADIESTRAMIENTO PARA INHALACIÓN, PARA LA PRÁCTICA DE UN PROCEDIMIENTO DE INHALACIÓN POR PARTE DE UN PACIENTE”, de los titulares BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH”,

Que, con fecha 3 de julio de 2019, se emite una resolución de rechazo por parte del INAPI. Esta resolución cita el documento US20110226242 A1 para concluir que la solicitud no cumple con el requisito de nivel inventivo, por lo que se recomienda rechazar la solicitud por falta de nivel inventivo, ya que se consideró que el documento D3 divulga suficiente elementos para obtener una formulación en polvo elaborado de leche que tiene un contenido reducido de carbohidratos, por lo que combinado con D5 y D6 se resolvió el rechazo definitivo de la patente, por falta de nivel inventivo.

Que, con fecha 25 de julio de 2019, el recurrente presenta un escrito de apelación con argumentación preferentemente para discutir el rechazo del último pliego presentado, reemplazando a su vez el pliego por uno nuevo de 22 reivindicaciones.

Que, con fecha 18 de noviembre de 2019 se emite resolución donde se tiene por presentado, por parte del solicitante, un nuevo pliego de reivindicaciones presentado con fecha 8 de octubre de 2019 ante el Honorable Tribunal de Propiedad Industrial. El nuevo pliego de reivindicaciones corrige un error formal en una reivindicación dependiente, respecto del anterior pliego presentado para análisis.

Que, centrados en los argumentos de las partes y lo resuelto por el sentenciador de primer grado, durante el estado de acuerdo este Tribunal determinó la necesidad de oír a un perito para que informe, a fin de que verificar si la solicitud de autos cumple con los requisitos legales para ser otorgada, tal como también lo pidió el solicitante, requiriendo al perito:

1.- Ilustrar al Tribunal sobre la invención que se busca proteger, considerando siempre el último pliego de reivindicaciones válidamente presentado en autos. Analizar si dicho nuevo pliego constituye una ampliación del contenido original y de los pliegos presentados con posterioridad, especialmente el pliego analizado por el resolutor de primer grado y si este se encuentra debidamente sustentado en la memoria descriptiva. Desde los antecedentes que existen en la Memoria Descriptiva, determinar cuál era el problema técnico que se buscaba resolver y si este difiere de los mencionados por el resolutor de primer grado.

2.- Si es efectivo que el disponer de un dispositivo de comunicaciones portátiles a través de un conector para audio o auriculares (cláusulas 4 y 9), no entrega efectos técnicos que permita resolver el problema técnico de la solicitud.

3.- Si el nuevo pliego de reivindicaciones restringido acompañado ante este Tribunal el 8 de octubre de 2019 es equivalente al considerado como aceptable en Europa, respecto de la solicitud equivalente No. 15722065.8.

4.- Ilustrar al Tribunal si es efectivo lo que señala el solicitante, que el dispositivo de entrenamiento para inhalación (Incorporado a un inhalador) y un sistema de entrenamiento para inhalación permitan un entrenamiento eficaz, simple, fiable y cómodo (Comunicado con el celular), como un sistema de bloqueo del medicamento para efectos de entrenamiento, diferentes a los dispositivos o sistemas empleados en la técnica, en especial en relación al documento D1.

5.- Ilustrar al Tribunal si a su juicio la solicitud de autos cumple con el requisito de nivel inventivo consagrado en el artículo 35 de la Ley 19.039, explicando cómo y por qué llega a dicha conclusión.

Que con fecha 24 de junio de 2021, se realizó la audiencia pública ante este Tribunal, por parte del Sr. David Espejo Canales, de profesión Ingeniero Civil Mecánico.

CON LO RELACIONADO Y CONSIDERANDO:

PRIMERO: Que, el centro actual de la discrepancia del recurrente con la resolución de instancia radica en la aplicación del 35 de la Ley 19.039, en cuanto estima que su invención posee nivel inventivo, a diferencia de la sentencia que declaró carente de este atributo a la solicitud de la patente de autos. Que, en lo que dice relación con la altura inventiva debe considerarse que el artículo 35, citado, establece: "Se considera que una invención tiene nivel inventivo, si para una persona normalmente versada en la materia técnica correspondiente, ella no resulta obvia ni se habría derivado de manera evidente del estado de la técnica". Por su parte el Reglamento de la Ley del ramo, establece en su artículo 33: "Para determinar el nivel inventivo a que se refiere el artículo 35 de la Ley, se considerará el grado de conocimiento que exista en el respectivo sector de la técnica".

Como se aprecia, la legislación no define un método para determinar el nivel inventivo, sino que establece parámetros que ilustran al Tribunal y en su caso al perito, para que, conforme a las reglas de la sana crítica, es decir de la lógica y la experiencia, determine conforme al grado de conocimiento que exista en el respectivo sector de la técnica, si la invención, copulativamente: no resulta obvia y no se deriva de manera evidente del estado de la técnica. En consecuencia, para atribuir nivel inventivo a una invención el perito puede buscarlo en el "Efecto Sorprendente", a través del método de Problema-Solución, del Salto Técnico u

otro. Lo que no puede hacer es emitir un informe infundado, no razonado y ausente de respaldo lógico y técnico. Ahora bien, cualquiera sea el método utilizado, corresponde en definitiva al sentenciador, habiendo valorado la prueba conforme a las reglas de la sana crítica, llegar al convencimiento de la existencia o ausencia de nivel inventivo en una invención determinada.

SEGUNDO: Que, para enfrentar el análisis de la solicitud, debe precisarse respecto del nuevo pliego de reivindicaciones presentado en esta instancia, que, en relación al problema técnico, hace referencia con la práctica de un procedimiento de inhalación por parte de un paciente y a un sistema de entrenamiento para el procedimiento de inhalación. Específicamente, se ha identificado el problema técnico de aumentar la eficacia de un medicamento que se ha de inhalar mediante el entrenamiento del paciente. Para esto se propone retroalimentar al paciente con algún tipo de información que dé cuenta de la efectividad de la inhalación. El propósito de la invención, según la memoria descriptiva página 2, es proporcionar un dispositivo y sistema de entrenamiento para la inhalación que permita un entrenamiento eficaz, simple, cómodo y barato, junto con una medición precisa de un flujo generado por el paciente durante su entrenamiento.

TERCERO: Que, en relación al documento US20110226242 A1, en adelante identificado como D1, citado en la resolución de rechazo, el cual ha sido identificado como el más cercano a la solicitud de autos, el mismo describe un aparato para el suministro de un medicamento respiratorio que incluye un alojamiento para contener una fuente de medicamento, donde el alojamiento tiene una porción de interfaz del paciente para entregar una o más dosis, al cual se agrega un generador de sonido acoplado al alojamiento. El generador de sonido está adaptado para generar una o más instrucciones sonoras como respuesta a una señal de activación. El problema técnico general abordado por el documento D1 es similar al de la solicitud de autos, y corresponde a la corrección del comportamiento de un paciente al utilizar el dispositivo inhalador.

Sin embargo, el documento D1 no aborda el problema técnico de bloquear el suministro de medicamento durante el entrenamiento.

CUARTO: Que, siguiendo con el análisis del punto anterior, la función que cumple el dispositivo de bloqueo de prevenir la liberación de medicamento durante el entrenamiento, no aparece señalada ni sugerida en las enseñanzas del documento D1, por lo que estos sentenciadores contestes con lo señalado por el señor perito de esta instancia procesal, vienen en señalar que la solicitud de autos aborda un problema técnico nuevo y diferente respecto de la técnica anterior, que es el bloqueo del dispositivo para no liberar medicamento durante el entrenamiento del paciente.

La liberación de medicamento durante el entrenamiento no aparece identificada como problemático en el documento citado para análisis, por lo que una persona experta de conocimiento medio no se vería motivada a generar una solución para tal situación.

Por lo tanto, en opinión de estos sentenciadores la solicitud de autos cumple con el requisito de nivel inventivo respecto del estado del arte citado.

QUINTO: Que, por estas consideraciones, se estiman atendibles los fundamentos del recurso de fecha 25 de julio de 2019, en la forma que se señalara en lo resolutivo del fallo.

SE RESUELVE:

Por lo anterior, en mérito de lo expuesto y conforme lo previsto en los artículos 6, 7, 16, 17 bis B, 18 bis C, 31, y 35, de la Ley de Propiedad Industrial, artículos 170, 186 y siguientes del Código de Procedimiento Civil, y demás disposiciones pertinentes, se acoge el recurso de apelación interpuesto el 25 de julio de 2019 y se revoca la resolución apelada de fecha 3 de julio del año 2019,

acogiéndose la solicitud de autos conforme al último pliego de reivindicaciones acompañado por el solicitante ante este Tribunal el 8 de octubre del 2019.

Todo lo anterior no obsta a que el INAPI pudiese ordenar corregir la memoria descriptiva u otros documentos que sustentan la patente, a fin de hacerlos concordantes con el pliego de reivindicaciones.

Déjese constancia que procede la devolución al apelante, de la suma consignada por la interposición del recurso.

Anótese la sentencia y devuélvanse los autos.

ROL TPI N° 1794-2019

Pronunciada por los Ministros Sr Juan Cristóbal Guzmán Lagos, Sr Marco Arellano Quiroz y Sra. Janett Fuentealba Rollat.



Solicitud N° 674-2017 “ALIMENTO PARA PECES QUE COMPRENDE SALES DE SODIO, MAGNESIO Y CALCIO Y UN MODULADOR DEL RECEPTOR DE CATIONES POLIVALENTES (PVCR) EN LA FORMA DE TRIPTÓFANO O FENILALANINA; Y USO PARA EL TRATAMIENTO PROFILÁCTICO Y/O TERAPÉUTICO DEL SÍNDROME HEMORRÁGICO DEL SMOLT (HSS) EN SALMONIDAE”

Rol N° 1489-2021

Jueves 06 de abril del 2023, 1
Sala, 2ndo lugar.

EN LO PRINCIPAL: SE ANUNCIA PARA ALEGATO; **OTROSÍ:** SOLICITUD QUE INDICA.

H. TRIBUNAL DE PROPIEDAD INDUSTRIAL.

CRISTIAN BARROS MICHELL, en representación de **Europharma SA**, a este H. Tribunal de Propiedad Industrial respetuosamente digo:

Vengo en anunciarme para alegar por mi mandante **Europharma SA**, en esta causa que fue fijada en tabla para el día jueves 06 de abril del 2023, primera sala, en el 2º lugar.

El alegato tendrá una duración de 20 minutos.

A ESTE H. TRIBUNAL DE PROPIEDAD INDUSTRIAL PIDO: tener por anunciado para asistir a la audiencia.

OTROSÍ: De conformidad con el auto acordado de este H. Tribunal de Propiedad Industrial de fecha 24 de marzo de 2020 sobre audiencias por sistema de video conferencia, vengo en hacer presente que haré uso del sistema de videoconferencia y que para estos efectos mi dirección de e-mail es cbarros@sargent.cl y mi teléfono +56954145935.

POR TANTO,

A ESTE H. TRIBUNAL DE PROPIEDAD INDUSTRIAL PIDO: tenerlo presente y acceder a lo solicitado.

Cristian
Kenneth
Barros Michell

Firmado digitalmente por
Cristian Kenneth
Barros Michell
Fecha: 2023.04.04
19:40:07 -04'00'

PRIMERA SALA

Tabla del 06-04-2023, N° 2

Materia : Patente de Invención

Solicitud : 201700674

Rol : 1489-2021

Relatora : Ana María Troncoso Veas

EN LO PRINCIPAL: Solicita suspensión de la vista de la causa;

EN EL OTROSÍ: Acompaña documento.

H. TRIBUNAL DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

María Trinidad Rojas Wünkhaus, en representación de la oponente y apelante Biomar Chile S.A., en el expediente de la solicitud de patente de invención N° 201700674, rol N° 1489-2021, al H. Tribunal de Propiedad Industrial respetuosamente digo:

Que vengo en solicitar la suspensión de la vista de la causa materia de estos autos, conforme a lo establecido en el artículo 165 N° 5 del Código de Procedimiento Civil.

POR TANTO,

al H. Tribunal de Propiedad Industrial respetuosamente pido:

Se sirva decretar la suspensión de la vista de la causa.

OTROSÍ: Sírvase tener por acompañada una copia del comprobante de transacción del pago realizado en la Tesorería General de la República, por concepto de la suspensión de la vista de la causa.





Tesorería General
de la República

COMPROBANTE DE TRANSACCION

Rut - Rol	79753810-8
Formulario	10
Folio	1680617969
Vencimiento	03-04-2023
Moneda de Pago	CLP
Total Pagado	15.597
Fecha Pago	04-04-2023 10:20:31
Institución Recaudadora	TRANSBANK
Identificador de Transacción	35192773-18487864

No válido para pago en Instituciones Recaudadoras
0404180009952304300101791K



Certificado de Movimiento

Nombre: CLARO Y COMPANIA	Comuna: LAS CONDES
Dirección: Q ECHENQUE N° 30 DPIP 53, LAS CONDES	
RUT: 79753810-8	Formulario: 10
Folio: 1680617969	Cuentas: 879537804
Fecha Cuentas: 04/04/2023	

Tipo Movimiento	Nro. Movimiento	Fecha Movimiento	Comuna	Moneda	Monto
Declaración y Pago Simultáneo:	1238841868	04/04/2023	13180	Pesos (\$)	15.597

Cod Descripción	Valor	Cod Descripción	Valor
1 R. SOCIAL/AR.PAT.	CLARO Y COMPANIA	3 NRO. DE RUT	797538108
6 DIRECCION	Av. Aguirre 3721, pao 14	7 ORDEN O FOLIO	1680617969
8 COMUNA	LAS CONDES	18 FECHA VENCIMIENTO	20230403
52 MOTIVO DEL INGRESO Y DE DAT.	suspension TDPL CAU SA ROLI 1489-2021	55 N° TELEFONO	223673000
63 RUT DEPOSITANTE	797538108	95 NOMBRE	CLARO Y CIA
24 TOTAL A PAGAR PLAZO	15597	244 SUBSG. DE ECONOMIA	15597
9924 IDENT. AR. C. BANCA	04041800099523043001 01791K	9926 ID. TRA	2023040418487864
9933 RUT IRA	96689318-9	9938 LOTE RECA	4950365
9937 FOLIO F01	3267364840	9939 FECHA INYECCION A LA CUT	20230404
9941 FECHA DE LA TRANSACCION	20230404	9952 CANAL	PORTAL
9963 TIPO DE REGISTRO:	TGR_LINEA		

Fecha de Emisión del Certificado: 04-04-2023 10:22:03

IMPORTANTE

DOCUMENTO NO VÁLIDO PARA PAGAR EN INSTITUCIONES RECAUDADORAS



3202309481686110

Santiago, seis de abril del año dos mil veintitrés.

A la presentación de fecha 03-04-2023 Código 10258: A lo principal: Téngase presente; al otrosí: Por acompañados con citación.

A la presentación de fecha 04-04-2023 Código 10290: A lo principal y otrosí: Estése a lo resuelto a continuación.

A la presentación de fecha 05-04-2023 Código 10298: A lo principal: Como se pide a la suspensión de la vista de la causa; al otrosí: Por acompañado comprobante de consignación.

ROL TDPI N° 1489-2021

Proveído por el Presidente (S) de la Primera Sala del Tribunal de Propiedad Industrial Sr. Juan Cristóbal Guzmán Lagos.

NOTIFICADA POR EL ESTADO DIARIO CON ESTA FECHA

MTG

This document is digitally signed

Signer: JUAN CRISTOBAL GUZMAN LAGOS
Date: jue, abr 6, 2023 07:22:16 CLT
Location: PUNE

This document is digitally signed

Signer: Ana Maria Troncoso Veas
Date: jue, abr 6, 2023 09:34:03 CLT
Location: PUNE

Solicitud N° 674-2017 "ALIMENTO PARA PECES QUE COMPRENDE SALES DE SODIO, MAGNESIO Y CALCIO Y UN MODULADOR DEL RECEPTOR DE CATIONES POLIVALENTES (PVCR) EN LA FORMA DE TRIPTÓFANO O FENILALANINA; Y USO PARA EL TRATAMIENTO PROFILÁCTICO Y/O TERAPÉUTICO DEL SÍNDROME HEMORRÁGICO DEL SMOLT (HSS) EN SALMONIDAE"

Rol N° 1489-2021

Lugar 1

Jueves 27 de abril del 2023

Primera sala

DELEGA PODER

H. TRIBUNAL DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

CRISTIÁN BARROS MICHELL, abogado, en representación de **EUROPHARMA AS.**, ambos ya individualizados en estos autos a UD. respetuosamente digo:

Que sin perjuicio de mis facultades, vengo en delegar poder al abogado habilitado para el ejercicio de la profesión **JUAN FRANCISCO PERALTA INDA** de mí mismo domicilio, quien firma en señal de aceptación.

POR TANTO,

A UD. PIDO tenerlo presente.

Cristian
Kenneth
Barros
Michell

Firmado digitalmente por Cristian
Kenneth Barros Michell
Fecha: 2023.04.24 15:44:06 -04'00'

Solicitud N° 674-2017 “ALIMENTO PARA PECES QUE COMPRENDE SALES DE SODIO, MAGNESIO Y CALCIO Y UN MODULADOR DEL RECEPTOR DE CATIONES POLIVALENTES (PVCR) EN LA FORMA DE TRIPTÓFANO O FENILALANINA; Y USO PARA EL TRATAMIENTO PROFILÁCTICO Y/O TERAPÉUTICO DEL SÍNDROME HEMORRÁGICO DEL SMOLT (HSS) EN SALMONIDAE”

Rol N° 1489-2021

Lugar 1

Jueves 27 de abril del 2023

Primera sala

EN LO PRINCIPAL: SE ANUNCIA PARA ALEGATO; **OTROSÍ:** SOLICITUD QUE INDICA.

H. TRIBUNAL DE PROPIEDAD INDUSTRIAL.

JUAN FRANCISCO PERALTA INDA, en representación de **EUROPHARMA AS.**, a este H. Tribunal de Propiedad Industrial respetuosamente digo:

Vengo en anunciarme para alegar por el apelado **EUROPHARMA AS.**, en esta causa que fue fijada en tabla para el día jueves 27 de abril del 2023, primera sala, en el 1º lugar.

El alegato tendrá una duración de 15 minutos.

POR TANTO,

A ESTE H. TRIBUNAL DE PROPIEDAD INDUSTRIAL PIDO: tener por anunciado.

OTROSÍ: De conformidad con el auto acordado de este H. Tribunal de Propiedad Industrial de fecha 24 de marzo de 2020 sobre audiencias por sistema de video conferencia, vengo en hacer presente que haré uso del sistema de videoconferencia y que para estos efectos mi dirección de e-mail es jfperalta@sargent.cl y mi teléfono +56968441866.

POR TANTO,

A ESTE H. TRIBUNAL DE PROPIEDAD INDUSTRIAL PIDO: tenerlo presente y acceder a lo solicitado.

PRIMERA SALA

Tabla del 27-04-2023, N° 1

Materia : Patente de Invención

Solicitud : 201700674

Rol : 1489-2021

Se tenga presente.

H. TRIBUNAL DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

María Trinidad Rojas Wümkhaus, en representación de la oponente y apelante Biomar Chile S.A., en el expediente de la solicitud de patente de invención N° 201700674, rol N° 1489-2021, al H. Tribunal de Propiedad Industrial respetuosamente digo:

Mediante el presente escrito, vengo en hacer presente los siguientes argumentos que sustentan la apelación presentada por esta parte con fecha 29 de octubre de 2021 y que, además, se dirigen a contrarrestar los argumentos presentados por el solicitante con fecha 3 de abril de 2023.

(I) Falta del examinador interno del INAPI

El examinador interno del INAPI, don Mauricio Aguilera, encargado del Informe Técnico de la presente solicitud, estimó que los documentos presentados por esta parte al contestar los informes periciales serían extemporáneos, ya que *“no es dable aportar e invocar nuevos documentos fuera del término probatorio”* por lo no fueron considerados

en su análisis. Esto lo llevó a concluir que la solicitud de autos cumpliría con el requisito de nivel inventivo, a diferencia de lo considerado por el perito en sus informes.

Conforme a lo señalado en artículo 10 bis, inciso segundo, de la Ley 19.039 de Propiedad Industrial, *“citadas las partes para oír sentencia, no se admitirán escritos ni pruebas de ningún género (...)”*. No habiendo más normas referentes a este tema en la Ley de Propiedad Industrial, se puede inferir de dicha frase que el material probatorio se entiende oportunamente presentado siempre y cuando no se hayan citado a las partes a oír sentencia. Por lo tanto, los documentos de prueba presentados por esta parte al contestar los informes periciales deberían haber sido considerados por el examinador interno del INAPI, ya que fueron debidamente acompañados antes de la citación a oír sentencia.

Lo anterior es concordante con el artículo 7, inciso segundo, de la Ley 19.039 de Propiedad Industrial, que señala lo siguiente: *“El informe del perito será puesto en conocimiento de las partes, las que dispondrán de 60 días, contados desde la notificación, para formular las observaciones que estimen convenientes (...)”*. La ley claramente entrega a las partes la posibilidad de formular observaciones a los informes periciales. Dentro de este contexto, debiera permitirse el acompañar documentos que sustenten las observaciones emitidas, las cuales, de lo contrario, podrían considerarse palabras vacías, sin valor ni sustento.

En vista de lo señalado, el examinador interno del INAPI erró al no considerar los documentos citados por esta parte en las respuestas presentadas a los informes periciales. En consecuencia, dejó de analizar documentos relevantes del estado del arte que anticipan y afectan el nivel inventivo de la invención de autos, llegando así a una conclusión errónea y recomendando la concesión del privilegio solicitado. Dichas conclusión y

recomendación del examinador fueron tomadas sin más análisis al momento de redactar el fallo, lo cual finalmente llevó a la concesión errónea de la solicitud de autos.

Dentro de los documentos que no fueron considerados por el examinador interno del INAPI se encuentran los documentos D5 y D12, considerados de suma relevancia por el perito en sus dos informes, afectando directamente el nivel inventivo de la invención.

(II) D12 (Hoseini) en combinación con D13 (Sauvant)

La reivindicación principal de autos se refiere a un alimento adecuado para salmónidos que comprende sales de sodio, sales de magnesio y sales de calcio, además de un modulador del receptor de cationes polivalentes en la forma de triptófano, en donde el modulador del receptor de cationes polivalentes está en la forma de aminoácidos libres.

El solicitante estima que el documento D12 no sería un documento relevante para el presente caso, ya que el pliego de reivindicaciones enmendado especifica que el alimento es adecuado para salmónidos, característica que no estaría definida en D12, que se refiere a un alimento para peces, específicamente para la carpa común.

El solicitante argumenta que los niveles de lípidos en la dieta del 35% son "óptimos" para el salmón, mientras que la carpa común no tolera niveles tan altos. Sin embargo, esto es irrelevante ya que, para determinar la novedad de la presente solicitud, lo importante es definir si el alimento para carpas descrito en D12 sería adecuado para los salmónidos, y no al revés.

A este respecto, el solicitante argumenta que un nivel de lípidos del 7,4 % y un nivel de carbohidratos del 21,1 %, tal como se describe en D12, no serían adecuados para un alimento para salmónidos.

Sin embargo, no existe evidencia para sustentar tales dichos. De hecho, no está claro, a partir del documento D17 citado por la contraparte, que los niveles de lípidos del 35% sean necesarios para los salmónidos. D17 simplemente establece que el salmón tolera altos niveles de grasa (y puede mejorar el crecimiento). De hecho, D17 establece que un nivel de lípidos del 8 al 11 % para la trucha arcoíris, que es un salmónido, es aceptable y solo da como resultado un menor crecimiento:

Notwithstanding the above caveats, various studies have investigated the relationships between dietary lipid contents, growth, and lipid deposition in fish. Weight gain was increased in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in fish fed dietary lipid at 21% compared to 8–11% (Luzzana et al., 1994), and growth was higher in brown trout (*Salmo trutta*) fed dietary lipid at 29% compared to 21% (Arzel et al., 1993).

De hecho, los parr criados en criaderos son muy flexibles y aceptan alimentos bajos en grasas y altos en carbohidratos y, aun así, se produce la esmoltificación.

Además, se observa que las reivindicaciones del solicitante no se limitan a ningún nivel óptimo de lípidos o carbohidratos, niveles que tampoco se describen en la memoria descriptiva. Por lo tanto, se debe suponer que el solicitante considera que el experto podrá ajustar dichos niveles según estime conveniente.

El solicitante además argumenta que D12 no podría citarse en contra del nivel inventivo de autos, ya que no se dirige al mismo objetivo, que sería la esmoltificación, ni al mismo tipo de peces.

En primer lugar, se observa que las reivindicaciones actuales no se limitan exclusivamente a un alimento para salmónidos, sino que únicamente señalan que el alimento sería adecuado para salmónidos. Esta limitación solo excluye los alimentos que son directamente inadecuados para los salmónidos y, por lo tanto, puede incluir alimentos para otro tipo de peces, siempre que no sean inadecuados para los salmónidos. En segundo

lugar, las reivindicaciones tampoco se limitan a los alimentos para esmoltificación, sino que a cualquier alimento que no sea inadecuado para los salmónidos. De hecho, el objetivo general de las reivindicaciones y de D12 es exactamente el mismo, a saber, aumentar la tolerancia al agua salada de los peces (ver el resumen, última oración, de D12), lo cual se logra mediante un alimento que contiene triptófano libre agregado (de nuevo, ver el resumen, última oración, de D12).

Además, según lo sostenido a lo largo de todo este proceso, D12 divulga los contenidos de iones de sales de sodio, sales de magnesio, y sales de calcio descritos en autos. Asimismo, D12 anticipa la cantidad de triptófano y el contenido de iones de cloruro reivindicados. Para un experto en la materia, cualquier sal imaginable correspondiente a las cantidades de iones de D12 caería dentro de los rangos de sal extremadamente amplios de la reivindicación 1, particularmente las sales de cloruro.

Por su parte, el documento D13 calcula las cantidades de iones de calcio, magnesio y sodio del alimento de D12. D13 ilustra tres tipos de harina de pescado con diferentes contenidos de proteína. Teniendo en cuenta las desviaciones estándar, las tres comidas anticipan una cantidad de calcio dentro del rango declarado en la reivindicación 1. Por lo tanto, dada la desviación estándar y la preferencia por una harina con alto contenido de proteínas en los alimentos para peces, es abrumadoramente probable que D12 comprenda iones de calcio dentro de los rangos descritos en la reivindicación principal de autos.

En vista de todo lo señalado, es correcto afirmar que la presente solicitud carece de novedad y de nivel inventivo, en vista de D12 en combinación con D13.

(III) D5 (Basulto)

El documento D5 también afecta los requisitos de patentabilidad de la presente solicitud, ya que apunta al mismo problema técnico que la presente solicitud, a saber, mejorar la tolerancia al agua salada del salmón parr (resumen) al inducir la metamorfosis de parr a smolt (página 45, último párrafo) en agua dulce (página 46, último párrafo).

El solicitante planteó una serie de argumentos para desestimar el documento D5. Sin embargo, dichos argumentos pueden descartarse, según se explicará a continuación:

1) El solicitante afirmó que D5 aplica “fotomanipulación” para inducir la esmoltificación en lugar de alimentos enriquecidos con sal. Esto no es correcto.

El término “fotomanipulación”, que el solicitante afirma que no sería necesario de utilizarse el alimento reivindicado en autos, es un término que se usa con poca frecuencia en la literatura sobre esmoltificación y puede ser confusa.

Un salmón juvenil necesita algunas señales ambientales para completar la transformación o smoltificación parr-smolt. Estas señales se denominan en la literatura “zeitgebers” por la palabra alemana para “dador de tiempo”. El fotoperíodo es el principal regulador a largo plazo de la esmoltificación. Los cambios en la duración del día (la parte luminosa del ciclo día-noche de 24 horas) son el “zeitgeber” principal para sincronizar la transformación parr-smolt. Sin un cambio en la duración del día, los salmones juveniles no reciben la señal necesaria para sufrir todos los cambios fisiológicos durante la transformación parr-smolt. Esto sucede si el salmón juvenil se cría bajo luz constante (sin período de oscuridad, luz las 24 horas del día) o sin cambios en la duración del día durante toda la fase de agua dulce (por ejemplo, régimen de 12/12 h). En ausencia de una señal ambiental o de un zeitgeber como un cambio en la duración del día, el sistema endocrino no se activa y la transformación de parr-smolt se ve comprometida. Dichos pseudosmolts

tienen un desarrollo deficiente de la Na-K-ATPasa branquial, reducen la capacidad de regular los iones de plasma y reducen el crecimiento en el agua de mar.

D5 no aplica un régimen lumínico con una secuencia de fotoperiodos cortos seguidos de fotoperiodos largos. D5 aplica un fotoperiodo constante de 12 horas luz día/12 horas oscuridad (ver página 46, último párrafo de D5). Esto se hace con el objetivo de evitar la esmoltificación debido a la fotomanipulación y, por lo tanto, poder evaluar los efectos de la alimentación de prueba. Así, en D5 se pretende evaluar la tolerancia al agua salada sin aplicar otras señales ambientales que afecten la esmoltificación. De hecho, D5 muestra que la adición de sales en el alimento estimula la tolerancia a la salinidad típica de la transformación parr-smolt (ver página 54, primer párrafo, de D5).

2) El solicitante también argumentó que D5 no se ocupa de la esmoltificación. Esto no es correcto.

Incluso en el título de D5 se hace referencia a la esmoltificación. El título es “Tolerancia inducida al agua salada en relación con sales inorgánicas en la alimentación del salmón del atlántico”. Claramente, la tolerancia al agua salada en relación con las sales inorgánicas tiene que ver con la esmoltificación.

3) Finalmente, el solicitante argumentó que los resultados relacionados con el aumento de la tolerancia al agua salada de D5 son cuestionables, lo cual no es correcto.

Los resultados en D5 son claros y muestran una mayor tolerancia al agua salada, es decir, una mejor tasa de supervivencia, cuando se transfiere al agua de mar después de la alimentación, en salmónes alimentados con una dieta enriquecida en sal (ver el primer párrafo y la conclusión, punto (1) en la página 54).

Así, aparece claramente que D5 apunta al mismo problema técnico que la presente solicitud. Es más, D5 es tan similar a la invención reivindicada, que sólo requiere de cambios estructurales mínimos para alcanzar los mismos resultados.

Por ejemplo, la dieta de prueba B de D5 (página 47) se refieren a un alimento para peces que comprende un alimento básico para peces (alimento en polvo Tess) que, en virtud de ser un alimento para peces, siempre contiene proteínas, grasas, carbohidratos, vitaminas, minerales y minerales. Sin embargo, para eliminar cualquier duda, se observa lo siguiente para cada componente enumerado en la reivindicación 1:

Proteínas	La proteína está incluida en el alimento en polvo Tess, ya que comprende “polvo de pescado” (página 47, líneas 7-8), que es básicamente pescado molido que contiene naturalmente este componente. Además, D13, página 272-276, describe el contenido de harina de pescado y establece que hay un contenido de proteína de alrededor del 62%.
Grasas	La grasa está incluida en el alimento en polvo Tess, ya que comprende “polvo de pescado” (página 47, líneas 7-8), que es básicamente pescado molido que contiene naturalmente este componente. Además, D13, página 272-276, describe el contenido de la harina de pescado y establece que contiene ácidos grasos (procedentes de la grasa).
Carbohidratos	Los carbohidratos están incluidos en el alimento en polvo Tess, ya que se trata de “polvo de pescado” (página 47, líneas 7-8), que es básicamente pescado molido que naturalmente contiene este componente. Además, CMC, el segundo componente del alimento

	de prueba B es carboximetilcelulosa (página 47, líneas 6-7), es decir, un carbohidrato.
Vitaminas	Las vitaminas están contenidas en el alimento en polvo Tess ya que se compone de “polvo de pescado” (página 47, líneas 7-8), que es básicamente pescado molido. El pescado sano utilizado en polvo de pescado comprendería naturalmente vitaminas. Además, D13, página 272-276, describe el contenido de la harina de pescado y establece que contiene una amplia gama de vitaminas.
Minerales	Los minerales están incluidos explícitamente como el tercer componente de la dieta B de prueba más un 1% de sales naturales contenidas. Las cantidades de iones relevantes se analizan a continuación. Además, D13, página 272-276, describe el contenido de la harina de pescado y establece que contiene una amplia gama de minerales.
Agua	El agua se añade explícitamente cf. página 47, línea 26.

La cantidad de iones de sodio, magnesio y calcio en los alimentos de prueba de D5 (dietas A-D, página 47 del mismo) se puede calcular de acuerdo con la cantidad de suplemento mineral (océano instantáneo) agregado según lo dispuesto en la página 47, líneas 27-30, de D5. Los cálculos se muestran en el documento Cálculos de Basulto, presentado junto con la oposición. Los resultados muestran que las dietas de prueba B (y C y D) están dentro de los rangos reivindicados en la cláusula principal de autos. Si bien las cantidades reales pueden ser ligeramente más altas debido a la sal natural (1 %) en el alimento en polvo (D5, página 47, líneas 4-5), aún se encuentran dentro de los rangos reivindicados.

	Na ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺
Dieta A	0	0	0
Dieta B	10,374 g/kg alimento	1,255 g/kg alimento	0,477 g/kg alimento
Dieta C	20,748 g/kg alimento	2,510 g/kg alimento	0,953 g/kg alimento
Dieta D	31,122 g/kg alimento	3,765 g/kg alimento	1,430 g/kg alimento

D5 proporciona los iones y las sales y la idoneidad para inducir la esmoltificación, al igual que los componentes básicos del alimento de autos, tales como las proteínas, los carbohidratos, las vitaminas, etc. Por lo tanto, la única diferencia entre D5 y la solicitud de autos sería la adición de triptófano libre al alimento. Sin embargo, según se ha demostrado a lo largo del presente procedimiento, tal diferencia no conlleva ningún efecto.

A partir de la evidencia experimental de la solicitud, queda claro que no se demuestra ningún efecto de agregar triptófano al alimento de la solicitud. La “dieta de prueba 2”, que corresponde a la dieta “según la presente invención”, comprende todos los componentes descritos en la cláusula principal de autos. No hay comparación alguna en la solicitud entre dicha “dieta de prueba 2”, que comprende todos los componentes, y un alimento que comprende las sales declaradas, pero no triptófano libre. Por lo tanto, no puede deducirse, a partir de la solicitud, que el triptófano libre tenga algún efecto sorprendente por sobre alimentos que no contienen triptófano libre, como sería el alimento de D5.

Así, queda claramente comprobado que no existe ningún efecto técnico sorprendente o ventajoso en agregar receptores de cationes polivalentes en la forma de triptófano al alimento. Lo anterior se ve corroborado por el informe de Nofima, que

concluye que no se puede establecer ningún efecto del triptófano de forma aislada y que el triptófano libre en la dieta tiene poco o ningún efecto sobre la inducción de la esmoltificación en salmónidos.

El informe analiza una dieta de control (ctrl), una dieta con cloruro de sodio añadido (60 g/kg) (mNa), una dieta con sal de cloruro de sodio añadido (60 g/kg) y triptófano (3 g/kg) (NaTr), y una dieta con sal de cloruro de sodio (60 g/kg) y cloruro de calcio (5 g/kg) añadidos. Por lo tanto, el triptófano y el contenido de iones y sales se encuentran dentro de los rangos declarados, en la medida en que los componentes se agreguen en los alimentos específicos. Las composiciones de los alimentos se proporcionan en la tabla 6, y el contenido relevante de iones y triptófano medido en los alimentos se proporciona en las tablas 8 y 9. Los ensayos se llevan a cabo en agua dulce (FW) con transferencia posterior a agua de mar (SW) mientras se continúa con el monitoreo. Se utiliza un período de luz de 24 horas, es decir, no se aplica ninguna manipulación fotográfica para inducir la esmoltificación.

Table 6 Feed composition (%).

** Additives are amino acids, antioxidants and technical additives*

Raw Material	Ctrl	mNa	NaTr	NaCa
Fish meal LT	32.5	32.5	32.5	32.5
Krill meal	7.5	7.5	7.5	7.5
Soya SPC	5.3	2.0	2.5	4.0
Sunflower Extracted, low fiber	8.0			
Wheat Gluten	8.0	11.7	14.6	13.9
Maize Gluten	5.5	7.6	3.0	3.2
Wheat Milling quality	11.2	11.2	11.2	11.2
Fish Oil	11.8	11.7	11.8	11.8
Rapeseed Oil	5.1	5.0	5.1	5.1
Mono-calcium Phosphate (MCP)	3.7	3.4	3.9	3.3
Lucantin Pink, BASF	0.01	0.01	0.01	0.01
Vitamins, minerals and additives*	2.3	2.1	2.1	2.0
Feed Salt		6.0	6.0	5.5
Calcium chloride				0.5
L-tryptophan			0.3	
Water change	-0.9	-0.5	-0.3	-0.4
Total	100.0	100.0	100.0	100.0

En cuanto a la solicitud presentada, el informe analiza el índice de smolt y el análisis de expresión de ATPasa Na-K para dar una indicación de la inducción de smoltificación. Los resultados utilizando el índice de smolt se proporcionan en la sección 4.3.1, página 16, y en particular en la tabla 10 que se proporciona a continuación.

Table 10 Smolt index of salmon at start, during the standard FW period (FW1, FW3, FW4) and delayed FW period (FW6, FW8, FW10). The fish was given scores between 1-4 based on parr marks, silver colour and colour of the tailfin. Data (n=3 tanks per dietary treatment) are mean shown with SEM. Significant differences are tested with Kruskal-Wallis One-way ANOVA followed by Wilcox post-hoc test. Different letters indicate significant differences.

	Ctrl	mNa	NaTr	NaCa
FW1	3.6 ± 0.0	3.6 ± 0.2	3.7 ± 0.1	3.6 ± 0.2
FW3	3.7 ± 0.1	3.7 ± 0.0	3.7 ± 0.1	3.6 ± 0.0
FW4	3.6 ± 0.1 ab	3.8 ± 0.0 a	3.7 ± 0.1 ab	3.6 ± 0.1 b
FW6	3.9 ± 0.0	3.9 ± 0.0	3.8 ± 0.0	3.9 ± 0.0
FW8	4.0 ± 0.0	3.9 ± 0.0	3.9 ± 0.0	3.9 ± 0.0
FW10	4.0 ± 0.0	3.9 ± 0.0	4.0 ± 0.0	3.9 ± 0.0

Como se puede ver en la tabla 10 y la conclusión del informe de Nofima, no hay un efecto significativo en el índice de smolt en ninguna de las tres dietas de prueba en comparación con la dieta de control, excepto para el período FW4. Pero, incluso en FW4, la dieta con triptófano tiene un Índice de smolt más bajo que la dieta que solo contiene cloruro de sodio (mNa).

Cuando la esmoltificación se mide mediante la expresión génica de Na-K ATPasas, los resultados son similares, aunque las tres dietas de prueba parecen tener algún efecto en la fase de agua dulce, nuevamente no hay una diferencia significativa entre la dieta que contiene cloruro de sodio (MNa) y la dieta con triptófano NaTr. (ver figura 15-16, página 21, del reporte de Nofina). En la página 23, debajo de la tabla 19, se concluye que los efectos de la dieta con triptófano fueron menores:

To summarize, differences between control and test feeds were manifested mainly in FW, especially during first six weeks. While control group showed high and low levels or respectively FW and SW isoforms, this difference was blurred in fish fed with salt containing diets and the expression patterns were closer to marine. Addition of calcium markedly increased variance of 1a expression in four of 12 analysed time-points and this was associated with lower average levels. Effect of dietary tryptophan was minor.

En conclusión, la solicitud no puede establecer ningún efecto del triptófano de forma aislada o en comparación con D5, lo cual es confirmado mediante informes posteriores que investigan este punto.

En vista de lo anterior, no cabe duda de que D5 es, como mínimo, un documento relevante del estado del arte, ya que apunta al mismo problema técnico y requiere de mínimas modificaciones para alcanzar el alimento reivindicado en autos.

(IV) D2 (WO 02/301182)

El documento D2 también aparece como un documento relevante del estado del arte, ya que se refiere a alimentos para peces, en donde el alimento APS II (descrito en el párrafo que une las páginas 92-93) comprende, además del alimento estándar, 7 g/kg de NaCl y 2 o 4 g/kg de triptófano libre. También estudia un alimento en el que se agrega 2% (es decir, 20 g/kg) de MgCl₂ al alimento APS II (ejemplo 17, páginas 118-121).

La diferencia entre el alimento APS II y la actual reivindicación 1 es, por tanto, la presencia de los cationes divalentes de Mg (0,026-25,530 g/kg) y Ca (0,036-36,110 g/kg) añadidos en las cantidades especificadas. Sin embargo, la única diferencia entre el alimento del ejemplo 17 y el alimento de autos es la presencia de 0,036-36,110 g/kg de iones Ca en la alimentación.

Las dietas estudiadas y probadas en la presente solicitud se describen en la página 18, en donde la “dieta de prueba 2” es la única dieta “según la presente invención”.

En primer lugar, es evidente que no se ha establecido el efecto de añadir iones de Ca, de modo que no se puede demostrar ningún efecto en comparación con el alimento de D2. Además, también está claro que los datos entregados en la solicitud de autos son insuficientes para respaldar cualquier efecto de los iones de Ca y Mg, particularmente en los rangos tan amplios reivindicados para estos dos iones.

Al revisar los estudios presentados en autos, está claro que la dieta de prueba 1 (correspondiente a una dieta de D2) nunca se compara con la dieta de prueba 2 en el mismo experimento. Por el contrario, las dietas de prueba 1 y 2 se prueban consistentemente contra los alimentos de control no definidos por separado. Por lo tanto, cualquier efecto de agregar $MgCl_2$ y/o $CaCl_2$ a la alimentación de D2 no puede extraerse o sustentarse en la solicitud de autos, tal como fue presentada.

En segundo lugar, observando la evidencia experimental de la presente solicitud, solo se prueba un alimento de acuerdo con la invención, a saber, la "dieta de prueba 2", que consiste en un alimento para peces al que se le agregó 6% de $NaCl$, 0,75% de $CaCl_2$, 0,25% de $MgCl_2$ y 0,4% de L- triptófano (ver página 18, líneas 11-17 de la solicitud presentada). En base a los pesos moleculares de los iones de calcio, magnesio y cloruro, la adición de 0,75 % de $CaCl_2$ corresponde a la adición de 2,7 g/kg de ion Ca^{2+} , mientras que la adición de 0,25 % de $MgCl_2$ corresponde a la adición de 0,64 g/kg de ion Mg^{2+} .

La reivindicación 1 declara para estos dos iones de calcio y de magnesio, un rango inferior de 0,036 g/kg Ca^{2+} y 0,026 g/kg Mg^{2+} . Sin embargo, como ya señalamos, la "dieta de prueba 2", correspondiente a la única dieta descrita de acuerdo a la invención y, por lo tanto, la única dieta sustentada con evidencia en autos, comprende 0,75% de $CaCl_2$, 0,25% de $MgCl_2$. Es decir, la única dieta de autos efectivamente probada comprende estas dos sales en aproximadamente 75 y 25 puntos más alto, respectivamente, que el rango más bajo reivindicado para estos iones. Por lo tanto, *prima facie* no se hace plausible que las cantidades mínimas de iones reivindicadas en la cláusula principal proporcionen algún efecto en comparación con los datos experimentales entregados en la solicitud, en donde se agregan cantidades de dichos iones en un orden de magnitud muy superior.

Los rangos de activadores y desactivadores de PVCR que se declaran, que serían el núcleo mismo de la invención, claramente no se refleja en los rangos extremadamente amplios de sales y aminoácidos que se describen en las reivindicaciones, a partir de las cuales se pueden combinar esencialmente en cualquier proporción, incluyendo, por ejemplo, grandes excesos de Na^+ , que amortiguaría cualquier efecto del $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$. Así, en la “dieta de prueba 2”, la relación entre desactivadores de PVCR, es decir, iones Na y activadores, a saber, Ca^{2+} , Mg^{2+} y triptófano, es de 6:1,4. En otras palabras, el factor de exceso de desactivador sobre activadores es de 4,3, mientras que los rangos declarados en la cláusula principal de autos permiten una relación desactivador/activador de hasta 100:2,2 (en donde el factor de exceso de desactivador sobre activadores sería de 45,5). Claramente, no es plausible que la proporción declara en la cláusula 1 proporcione una activación de PVCR y mucho menos una ruta alternativa a la esmoltificación.

Por otra parte, el solicitante sostiene que existe una mejora evidente en cuanto a que las sales se aportan a través del alimento en lugar del agua, lo que supondría una solución menos laboriosa y económica al problema técnico. Esta es, sin embargo, una suposición incorrecta por varias razones. En primer lugar, ninguna de las reivindicaciones incluye la característica de que los iones de Ca y Mg no se agregan también al agua. Además, lo que es más importante, esta aseveración sólo sería válida en la medida en se mantengan o se mejoren el grado de esmoltificación, la tasa de supervivencia y el crecimiento de los peces en comparación con el documento D2. Si no es así, el alimento de autos no proporcionaría un método menos laborioso y costoso. Sin embargo, como ya se señaló, no hay evidencia de ello, ya que los alimentos del documento D2 y de la presente invención nunca se han comparado en el mismo ensayo y, por lo tanto, no se han probado las supuestas mejoras alegadas.

Además, según lo ya señalado, no habría efectos plausibles o mejoras evidenciadas relacionadas con la adición de iones Ca y Mg, en particular para los rangos inferiores declarados de cationes divalentes. El informe de Nofina aportado por esta parte confirma que la sal de Ca añadida no presenta ningún efecto sorprendente o mejora. Según ya se explicó, no hay diferencias significativas entre las dietas de prueba que contienen cloruro de sodio añadido, triptófano añadido o cloruro de calcio añadido. De hecho, según lo medido por el índice de smolt, el alimento de NaCl fue el que se desempeñó mejor (ver el resumen de la página 1):

La puntuación del índice de smolt no varió entre los diferentes grupos de alimentos, excepto para el muestreo FW4 (muestreo 3, antes de la primera transferencia de agua de mar) cuando los peces alimentados con un aditivo de sal pura tenían un índice de smolt significativamente más alto que los peces alimentados con una combinación de sodio y calcio.

Según lo medido por los niveles de expresión génica, todos los alimentos de prueba funcionaron mejor que el alimento de control (ctrl), pero el alimento que contenía calcio agregado (NaCa) solo tuvo un efecto menor en comparación con el alimento de prueba de NaCl (MNa) y solo en los muestreos en agua dulce FW3 y FW4, mientras que presentó una gran variación en los resultados en los muestreos en agua dulce FW6, FW8 y FW10 (cf. Figura 15). En los muestreos de agua salada (SW), estas diferencias con respecto al control se eliminaron por completo a medida que aumentaba la variación individual. Esto es evidente a partir de las Figuras 15-16, página 21 y el resumen, tercera página, que establece:

Los alimentos de prueba afectaron los niveles de expresión de los marcadores genéticos de esmoltificación clave NKA α 1a (supresión) y 1b (inducción) en FW durante el protocolo estándar. Esta diferencia se eliminó en el grupo FW retrasado a medida que aumentaba la variación individual.

En conclusión, no hay ningún efecto atribuible al calcio añadido. Asimismo, tampoco se le puede atribuir un efecto plausible al extremo inferior de los rangos de calcio declarados. El informe de Nofima utiliza 5 g/kg de cloruro de calcio añadido (tabla 6), lo que da como resultado un contenido de Ca²⁺ de 16,3 g/kg (tabla 8). Naturalmente, si esto no proporciona una inducción significativa de esmoltificación en comparación con un alimento suplementado con NaCl correspondiente, tampoco lo hará un alimento con solo 0,1 g/kg de sal de calcio añadida (como se afirma en autos).

En vista de todo lo ya explicado, el alimento para peces reivindicado en autos es una mera alternativa al documento D2. Sólo queda explicar cuál sería la motivación de un experto para agregar cationes divalentes como Mg o Ca en las cantidades reivindicadas en el alimento de D2.

Se describe claramente en el propio documento D2 que los moduladores de PVCR (como los iones de Ca y Mg, que son los moduladores de PVCR preferidos de acuerdo con, por ejemplo, la reivindicación 5) se pueden agregar al agua, pero también al alimento (ver página 2, líneas 16-23, de D2):

modulator of the PVCR. The pre-adult anadromous fish are subjected to the modulator when it is added to their freshwater environment, and optionally, to the feed. The invention encompasses adding at least one PVCR modulator to the

Es importante tener en cuenta que en D2, los moduladores de PVCR agregados al agua dulce y, opcionalmente, al alimento son iones Mg y Ca (ver la reivindicación 5), mientras que el "agente que es suficiente para contribuir a un nivel significativamente mayor de moduladores de PVCR en suero de pescado" es preferentemente NaCl.

La adición de cationes divalentes a la alimentación también se sugiere directamente en la sección de ejemplo de D2 (ver el ejemplo 8, página 92, líneas 1-2, de D2):

Other ingredients can include NaCl, MgCl₂, CaCl₂ or L-Tryptophan that are added by weight to the base diet by weight.

Además, la tabla 19 de la página 120, muestra que los peces en aguas de cría que contienen Ca y Mg (entradas 2-6) se adaptan mejor al agua de mar que el experimento de control en agua dulce (entrada 1). Cuando esto se combina con el conocimiento general común de que estas sales pueden absorberse tanto a través del agua como del alimento, resulta obvio que la ingestión de Ca y Mg a través del alimento también sería beneficiosa para la tolerancia al agua de mar. La Tabla 19 muestra, además, que la entrada 6 es exactamente la alimentación sugerida en la página 92, a la que además de NaCl, triptófano y alimentación básica, se le ha añadido MgCl₂. También queda claro en la tabla que este alimento en particular funciona mejor que todos los demás alimentos, excepto la entrada 3, donde funciona comparativamente bien. Por lo tanto, la solución al problema técnico de la presente solicitud es obvia a partir de D2, por lo que carece de nivel inventivo.

(V) D2 (WO 02/301182) en combinación con D5 (Basulto)

Además, a partir de D2, el experto podría combinarlo con D5, que está relacionado con la resolución del mismo problema y también enseña que la adición de iones de Ca y Mg es beneficiosa para la supervivencia de los smolts cuando se transfieren al agua de

mar debido a una mayor tolerancia a la salinidad. Esto se proporciona tanto en el ejemplo de la página 52 de D5, incluyendo la tabla V y VI, como en la conclusión (página 53, primer párrafo, de D5):

Table VI lists results of seawater exposure for four different batches of fish after approximately 1 month on diets. The results indicate that, in general, more survivors were obtained in the groups where salt was included in the diet. In both series of experiments it was possible to verify clearly for all groups the natural increase with time of the seawater tolerance. The mean survival rate rose from 0% in March to 82–82.9% in June.

Es importante tener en cuenta que la “sal” añadida probada y discutida en D5 es el suplemento mineral "oceánico instantáneo" que, de acuerdo con su nombre, es sal marina, que proporciona alimentos de prueba que comprenden iones de Na, Mg y Ca añadidos en las cantidades declaradas, según se detalla en los cálculos de Basulto.

También se establece directamente en D5 que se espera que las dietas enriquecidas con sal puedan reemplazar efectivamente la adaptación que se produce cuando los peces están sujetos a una salinidad creciente en el agua en la que nadan e inevitablemente también ingieren al beber (ver página 54, primer párrafo, de D5):

The principal aim of our research was to verify whether diets enriched with salts had any influence upon saltwater tolerance of salmon parr: as to that, the results are positive. Using survival rates as an indication of greater or lesser resistance to abrupt changes from fresh to salt water, it can be concluded that fish fed a salt-enriched diet seem to have, in general, a higher tolerance to salt water. Zaugg and McLain (1969) suggest that “ingestion of elevated quantities of salts would activate the excretory process involved in the elimination of these salts when swallowed by drinking sea water in a marine environment”.

Por lo tanto, el párrafo anterior de D5 propone directamente adaptar las divulgaciones de D2 para alcanzar la materia reivindicada en la cláusula principal de autos. Esto lleva a la conclusión de que la invención también es obvia a partir de D2 en combinación con D5.

(VI) D2 (WO 02/301182) en combinación con la Declaración de Deacon

Finalmente, destacamos el documento D2 en relación con la Declaración de Deacon, presentada por esta parte con fecha 29 de marzo de 2023. La Tabla 19 de D2 revela, en su entrada 6, un alimento que comprende todas las características de la presente reivindicación 1, excepto los iones de calcio. Todos los alimentos de esta tabla 19 se basan en una “dieta estándar para salmónidos de agua dulce de Moore Clark”, según se describe en la dieta II de proceso APS, en las páginas 92 y 93 de D2. Por su parte, la declaración de Deacon confirma y revela en el Anexo 2 que la dieta estándar para salmónidos de agua dulce de Moore Clark, utilizada para hacer la dieta de la entrada 6 de la tabla 19 de D2, comprende 2,4 % (o 24 g/kg) de iones de calcio. Por lo tanto, el alimento de autos estaría anticipado por D2 en relación con la Declaración de Deacon.

(VII) Espe

Es relevante destacar también el documento identificado como Espe, que se refiere a un alimento para salmón atlántico que describe las ventajas de proporcionar al salmón pre-smolt aminoácidos libres en la dieta, incluyendo triptófano, (ver, por ejemplo, tabla 1, resumen y conclusión), además de comprender sodio, calcio y magnesio en la alimentación, tal como se describe en la reivindicación principal de autos.

La única diferencia existente entre ambos documentos radica en los rangos de las cantidades de sales de sodio, calcio y magnesio y/o triptófano libre. Sin embargo, no hay evidencia alguna en la presente solicitud de que los rangos citados en la reivindicación 1 proporcionen efectos que no estarían ya presentes en las dietas descritas en el documento citado. Así, la presente solicitud carece también de nivel inventivo en vista del documento Espe.

(VIII) Decisiones en el caso europeo NO/EP3197290B1

Por último, en relación con la decisión paralela de los tribunales noruegos, señalamos que estas decisiones se tomaron bajo la ley noruega y no se aplican directamente a la práctica chilena. Es más, las decisiones emitidas en el extranjero no son vinculantes en Chile.

Además, es necesario destacar que dicha decisión se tomó considerando las reivindicaciones presentadas ante la División de Oposición de la EPO, las cuales difieren de las reivindicaciones actualmente pendientes en Chile. Así, la reivindicación 1 confirmada en Europa y Noruega señala:

2.3 Auxiliary request 2 filed during oral proceedings on 05-07-2021

1. A fish feed for inducing smoltification of Salmonidae, comprising protein, fat, carbohydrates, vitamins, minerals and water, CHARACTERIZED IN THAT the fish feed comprises Na⁺ from 3.934 - 39.340 g/kg by weight, Mg²⁺ from 0.026 - 25.530 g/kg by weight, and Ca²⁺ from 0.036 - 36.110 g/kg by weight, Cl⁻ from 6.202 - 199.020 g/kg by weight, polyvalent cation receptor modulator (PVCR) in the form of tryptophan from 2 - 10 g/kg by weight, wherein the polyvalent cation receptor modulator is in the form of free amino acids, where the Na⁺, Mg²⁺, and Ca²⁺ are provided as salts in the ranges of 10-100 g/kg, 0.1 - 100 g/kg, 0.1 - 100 g/kg, respectively.

Por lo tanto, el alimento reivindicado en el caso europea/noruego se limita a un alimento “para inducir la esmoltificación en salmónidos”. Dicha reivindicación es más estrecha que la cláusula principal de autos, ya que se establece como requisito del alimento que produzca un efecto sobre la esmoltificación. En cambio, en la presente solicitud, la única limitación del alimento es que sea adecuado para salmónidos. Además, en el caso europeo/noruego, los iones deben agregarse como sales, limitación que no se encuentra presente en las reivindicaciones chilenas, en donde no se define el origen de los iones.

Por lo tanto, las decisiones tomadas en Noruega no pueden aplicarse directamente al caso chileno. Además, se hace presente que el solicitante ha considerado necesario

limitar aún más las reivindicaciones en el caso europeo/noruego, en vista de los procedimientos de apelación posteriores con la EPO. Dicho procedimiento de apelación en la EPO aún se encuentra en curso y no se ha llegado a una decisión final sobre la validez de la patente europea.

(IX) Conclusiones

En vista de todo lo antes señalado, resulta evidente que la presente solicitud fue concedida en contravención a los requisitos de patentabilidad exigidos por la ley, motivo por el cual debiera revocarse el fallo de primera instancia y, en definitiva, rechazarse el privilegio solicitado.

POR TANTO,

al H. Tribunal de Propiedad Industrial respetuosamente pido: Se sirva tenerlo presente.

PRIMERA SALA

Tabla del 27-04-2023, N° 1

Materia : Patente de Invención

Solicitud : 201700674

Rol : 1489-2021

EN LO PRINCIPAL: Se anuncia; **EN EL OTROSÍ:** Solicitud que indica.

H. TRIBUNAL DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

María Trinidad Rojas Wünkhaus, en representación de la oponente y apelante Biomar Chile S.A., en el expediente de la solicitud de patente de invención N° 201700674, rol N° 1489-2021, al H. Tribunal de Propiedad Industrial respetuosamente digo:

Por medio del presente escrito, vengo en anunciarme para alegar en la audiencia de fecha 27 de abril de 2023, por un lapso de 20 minutos.

Hago presente que la causa de estos autos se encuentra en el lugar N° 1 de la tabla fijada para el día citado.

POR TANTO,

al H. Tribunal de Propiedad Industrial respetuosamente pido: Se sirva tenerme por anunciado para alegar.

OTROSÍ: Conforme a lo dispuesto en el Auto Acordado del Pleno del H. Tribunal de Propiedad Industrial sobre Audiencias por Sistema de Video Conferencia, solicito hacer

uso del sistema de videoconferencia para alegar en la audiencia indicada en lo principal de este escrito.

Al respecto, hago presente que mi dirección de correo electrónico es trojas@claro.cl y que mi teléfono de contacto para el día de la audiencia es el +56991384001.

P00195 SuspVistaCausa 4887-8392-8667 v.1.docx

Santiago, veintisiete de abril del año dos mil veintitrés.

VISTOS:

Que, atendido el mérito de autos, como medida para mejor resolver, procede decretar un informe pericial, para cuyo efecto se cita a las partes a un comparendo de estilo para la designación del perito, el que se llevará a efecto el día tres de mayo del presente, a las 10:15 hrs, por video conferencia en el oficio de la Secretaría del Tribunal, ante la Ministra Sra. Carmen Iglesias Muñoz, especialmente comisionada al efecto.

ROL TPI N° 001489-2021.

Dictada por los Ministros Sr. Marco Arellano Quiroz, Sra. Carmen Iglesias Muñoz y Sra. Pamela Fitch Rossel.

RESOLUCION ANOTADA EN EL ESTADO DIARIO CON ESTA FECHA

AMTV

Santiago, veintisiete de abril del año dos mil veintitrés.

A la presentación de fecha 25-04-2023 Código 10689: Téngase presente la delegación de poder en favor de Juan Peralta Inda. A lo principal: Téngase por anunciado; al otrosí: Como se pide a la solicitud de alegatos por videoconferencia.

A la presentación de fecha 26-04-2023 Código 10696: Téngase presente.

A la presentación de fecha 26-04-2023 Código 10697: A lo principal: Téngase por anunciado; al otrosí: Como se pide a la solicitud de alegatos por videoconferencia.

ROL TDPI N° 1489-2021

Proveído por el Presidente de la Primera Sala del Tribunal de Propiedad Industrial Sr. Marco Arellano Quiroz.

NOTIFICADA POR EL ESTADO DIARIO CON ESTA FECHA

MTG

This document is digitally signed

Signer: MARCO ANTONIO ARELLANO
QÚIROZ
Date: jue, abr 27, 2023 11:13:40 CLT
Location: PUNE

This document is digitally signed

Signer: Marta Beatriz Araya Fernandez
Date: jue, abr 27, 2023 11:21:44 CLT
Location: PUNE

PRIMERA SALA

Materia : Patente de Invención

Solicitud : 201700674

Rol : 1489-2021

Comparendo de designación de perito

EN LO PRINCIPAL: Se anuncia; **EN EL OTROSÍ:** Solicitud que indica.

H. TRIBUNAL DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

María Trinidad Rojas Wünkhaus, en representación de la oponente y apelante Biomar Chile S.A., en el expediente de la solicitud de patente de invención N° 201700674, rol N° 1489-2021, al H. Tribunal de Propiedad Industrial respetuosamente digo:

Por medio del presente escrito, vengo en anunciarme para el comparendo de designación de perito programado para el día 03 de mayo de 2023, a las 10.15 horas.

POR TANTO,

al H. Tribunal de Propiedad Industrial respetuosamente pido: Se sirva tenerme por anunciado.

OTROSÍ: Conforme a lo dispuesto en el Auto Acordado del Pleno del H. Tribunal de Propiedad Industrial sobre Audiencias por Sistema de Video Conferencia, solicito hacer uso del sistema de videoconferencia para alegar en la audiencia indicada en lo principal de este escrito.

Al respecto, hago presente que mi dirección de correo electrónico es trojas@claro.cl y que mi teléfono de contacto para el día de la audiencia es el +56991384001.

P00195 AnunciaComparendoNombramientoPerito 4877-9677-5009 v.1.doc



Solicitud Nº 674-2017 “ALIMENTO PARA PECES QUE COMPRENDE SALES DE SODIO, MAGNESIO Y CALCIO Y UN MODULADOR DEL RECEPTOR DE CATIONES POLIVALENTES (PVCR) EN LA FORMA DE TRIPTÓFANO O FENILALANINA; Y USO PARA EL TRATAMIENTO PROFILÁCTICO Y/O TERAPÉUTICO DEL SÍNDROME HEMORRÁGICO DEL SMOLT (HSS) EN SALMONIDAE”

Rol Nº 1489-2021

Comparendo de designación de Perito

Miércoles 3 de mayo del 2023

EN LO PRINCIPAL: SE ANUNCIA; **OTROSÍ:** SOLICITUD QUE INDICA.

H. TRIBUNAL DE PROPIEDAD INDUSTRIAL.

JUAN FRANCISCO PERALTA INDA, en representación de **EUROPHARMA AS.**, a este H. Tribunal de Propiedad Industrial respetuosamente digo:

Vengo en anunciarme para asistir por el solicitante **EUROPHARMA AS.**, en esta causa cuya audiencia de designación de perito fue fijada para el día 3 de mayo de 2023.

POR TANTO,

A ESTE H. TRIBUNAL DE PROPIEDAD INDUSTRIAL PIDO: tener por anunciado.

OTROSÍ: De conformidad con el auto acordado de este H. Tribunal de Propiedad Industrial de fecha 24 de marzo de 2020 sobre audiencias por sistema de video conferencia, vengo en hacer presente que haré uso del sistema de videoconferencia y que para estos efectos mi dirección de e-mail es jfperalta@sargent.cl y mi teléfono +56968441866.

POR TANTO,

A ESTE H. TRIBUNAL DE PROPIEDAD INDUSTRIAL PIDO: tenerlo presente y acceder a lo solicitado.

Santiago, tres de mayo del año dos mil veintitrés

VISTOS:

Que, en autos se ha presentado la solicitud de patente de invención N° 201802841, Rol TDPI N° 001476-2021, para: "GUIA DEL CONDUCTOR PARA MANIOBRAS GUIADAS", cuyo solicitante es MODULAR MINING SYSTEMS, INC.

Que, con fecha quince de septiembre del año dos mil veintiuno, se dictó sentencia definitiva en la causa, acogiendo la oposición presentada por CODELCOTEC SPA. y rechazando la patente solicitada por no cumplir el requisito de nivel inventivo.

Que, el cinco de octubre del año dos mil veintiuno, la solicitante, MODULAR MINING SYSTEMS, INC., interpone recurso de apelación.

Que, el veinticinco de noviembre del año dos mil veintiuno, se dictó resolución de autos en relación.

Que, como medida para mejor resolver, se estimó necesario requerir un informe pericial, para cuyo efecto se citó a las partes a un comparendo de estilo para la designación del perito, se fijó audiencia para el día tres de mayo del presente.

Que, consta en autos, que se llevó a efecto con esta fecha la audiencia de estilo para la designación un perito, ante la ausencia de los representantes de MODULAR MINING SYSTEMS, INC. y CODELCOTEC SPA. se debe presumir la falta de acuerdo de las partes sobre persona que debe periciar la causa y corresponderá al Tribunal tal designación.

SE RESUELVE:

PRIMERO: Como medida para mejor resolver requiérase informe pericial, a fin que el perito informe:

1. Ilustrar al Tribunal sobre la invención que se busca proteger, considerando siempre el último pliego de reivindicaciones válidamente presentado en primera instancia. Desde los antecedentes que existen en la Memoria Descriptiva,

- determinar cuál era el problema técnico que se buscaba resolver y si lo reivindicado se encuentra debidamente sustentado en la Memoria Descriptiva.
2. Ilustrar al Tribunal sobre cuáles son las características especiales -en el evento de tenerlas- que posee la invención presentada a patentamiento respecto del estado del arte conocido, especialmente el documento D1 (US2010/0063954).
 3. Ilustrar al Tribunal si el documento individualizado en autos como D1 sentido de presentar con anterioridad a la invención que el solicitante pretende proteger, un sistema que permite calcular la posición de un vehículo, señales de guía que permiten calcular el movimiento del vehículo, algoritmos que permiten descifrar la posición óptima de un vehículo, y la utilización de bases de datos (tanto de base como adquiridas) para recibir datos espaciales actualizados a medida que el vehículo avanza.
 4. Si, teniendo presente la conclusión de los puntos anteriores y el análisis de lo divulgado en el arte previo, si la solicitud de invención, a su juicio, presenta nivel inventivo, explicando cómo y por qué llega a esa conclusión.

SEGUNDO: El informe pericial tendrá el siguiente contenido mínimo:

El nombre, apellido, profesión, nacionalidad, domicilio y Cédula Nacional de Identidad del perito;

La descripción de la situación o estado de los hechos, sobre los que se hizo el peritaje;

La exposición detallada de lo que se ha comprobado en relación al encargo;

La motivación o fundamentación del examen técnico;

La indicación de los criterios científicos o técnicos y las reglas de las que se sirvieron para hacer el examen;

Conclusiones, las mismas que deberán ser claras, detalladas y fundamentadas en la interpretación de los hallazgos obtenidos, teniendo la precaución de no presentar ambigüedades que den lugar a diversas interpretaciones; y,

Lugar, fecha y firma.

TERCERO: Que, considerando la designación de común acuerdo por las partes en calidad de perito de Don Rodrigo Navarrete Ragga, profesión Ingeniero Civil Mecánico, quien tendrá el plazo de 30 días corridos para evacuar su encargo, a contar de la fecha en que acepte el cargo. Se aplicarán al perito las inhabilidades legales y las establecidas en el artículo 413 del Código de Procedimiento Civil. El perito deberá aceptar el cargo, jurando desempeñarlo fielmente, en el acto de la notificación o ante el Ministro de fe respectivo o ante la Secretaria Abogada del Tribunal, debiendo dejarse testimonio en autos de su juramento y aceptación.

Signer: Ana Maria Troncoso Veas
Date: mié, may 3, 2023 12:47:21 CLT
Location: PUNE

CUARTO: Fíjense como honorarios periciales la suma de \$663.000. El pago del honorario se deberá efectuar mediante depósito o transferencia electrónica en la cuenta corriente N° 900.360-6 del Banco Estado, a nombre de la Subsecretaría de Economía y Empresas de Menor Tamaño, RUT N° 60.701.000-5, debiendo informar del hecho a través de la presentación de un escrito en el expediente respectivo o por vía electrónica a la Secretaria Abogada del Tribunal al correo maraya@tdpi.cl.

QUINTO: El pago de los honorarios periciales será de cargo de la recurrente. Si dentro de los plazos designados no cumple con la obligación de pago, quedará sin efecto la presente resolución, procediéndose a resolver sin más trámite.

SEXTO: Recibido el pago por la Sra. Secretaria Abogada del Tribunal, se notificará al perito designado. En el acto de la notificación se le hará presente que además de su informe, deberá absolver las consultas que pudieren efectuar los señores Ministros integrantes del Acuerdo de autos, en audiencia a efectuar especialmente al efecto.

SÉPTIMO: Suspéndase, entretanto, el estado de acuerdo.

Rol TDPI N° 001476-2021.

Dictada por el Ministro Sr. Marco Arellano Quiroz, Ministras Sra. Carmen Iglesias Muñoz y Sra. Pamela Fitch Rossel.

RESOLUCION ANOTADA EN EL ESTADO DIARIO CON ESTA FECHA

Signer: MARCO ANTONIO ARELLANO
QUIROZ
Date: mié, may 3, 2023 12:31:14 CLT
Location: PUNE

Signer: CARMEN GABRIELA IGLESIAS
MUNOZ
Date: mié, may 3, 2023 12:38:18 CLT
Location: PUNE

Signer: PAMELA FRANCISCA FITCH ROSSEL
Date: mié, may 3, 2023 12:46:15 CLT
Location: PUNE

Santiago, tres de mayo del año dos mil veintitrés.

A la hora señalada se lleva a efecto la audiencia de designación de perito con la asistencia de la abogada María Trinidad Rojas Wunkhaus en representación de BIOMAR CHILE S.A. y del abogado Juan Francisco Peralta Inda, en representación de EUROPHARMA AS.

Los profesionales acuerdan designar como perito en estos autos al Sr. Pablo Cañón Amengual, Bioquímico.

ROL TDPI 001489-2021

María
Trinidad
Rojas
Wunkhaus
María Trinidad Rojas Wunkhaus
ABOGADA

Firmado
digitalmente por
María Trinidad
Rojas Wunkhaus
Fecha: 2023.05.03
10:59:10 -04'00'

JUAN
FRANCIS
CO
PERALTA
INDA

Firmado
digitalmente
por JUAN
FRANCISCO
PERALTA INDA
Fecha:
2023.05.03
11:26:52 -04'00'

Juan Francisco Peralta Inda
ABOGADO

Carmen Iglesias Muñoz
MINISTRA

Gloria Cervantes Gómez
SECRETARIA ABOGADA (S)

This document is digitally signed

Signer: CARMEN GABRIELA IGLESIAS
MUNOZ
Date: mié, may 3, 2023 12:39:19 CLT
Location: PUNE

This document is digitally signed

Signer: GLORIA GIOVANA CERVANTES
GÓMEZ
Date: mié, may 3, 2023 12:46:14 CLT
Location: PUNE

Santiago, tres de mayo del año dos mil veintitrés.

A las presentaciones de fecha 02-05-2023 Códigos 10757 y 10784: A lo principal y otrosí: Como se pide.

ROL TDPI N° 1489-2021

Proveído por el Presidente del Tribunal de Propiedad Industrial Sr. Marco Arellano Quiroz.

NOTIFICADA POR EL ESTADO DIARIO CON ESTA FECHA

MTG

This document is digitally signed

Signer: MARCO ANTONIO ARELLANO
QUIROZ
Date: mié, may 3, 2023 09:42:16 CLT
Location: PUNE

This document is digitally signed

Signer: Ana Maria Troncoso Veas
Date: mié, may 3, 2023 10:20:12 CLT
Location: PUNE

This document is digitally signed

Signer: Marta Beatriz Araya Fernandez
Date: vie, may 5, 2023 09:33:55 CLT
Location: PUNE



Santiago, cuatro de mayo del año dos mil veintitrés.

De conformidad a lo dispuesto en el artículo 84 del Código de Procedimiento Civil y en mérito que se ha sido erróneamente adjuntado: Déjese sin efecto la medida para mejor resolver notificada el 03-05-2023, y estese a lo que se resolverá con esta misma fecha.

ROL TDPI N° 001489-2021

Dictada por el Ministro Sr. Marco Arellano Quiroz, Ministra Sra. Carmen Iglesias Muñoz, Ministra Sra. Pamela Fitch Rossel.

AMTV

RESOLUCION ANOTADA EN EL ESTADO DIARIO CON ESTA FECHA

This document is digitally signed

Signer: MARCO ANTONIO ARELLANO
QUIROZ
Date: jue, may 4, 2023 12:36:45 CLT
Location: PUNE

This document is digitally signed

Signer: CARMEN GABRIELA IGLESIAS
MUNOZ
Date: jue, may 4, 2023 12:59:03 CLT
Location: PUNE

This document is digitally signed

Signer: PAMELA FRANCISCA FITCH ROSSEL
Date: vie, may 5, 2023 09:27:05 CLT
Location: PUNE

Santiago, cuatro de mayo del año dos mil veintitrés.

VISTOS:

Que, en autos se ha presentado la solicitud de patente de invención N° 201700674, Rol TDPI N°001489-2021, para: "ALIMENTO PARA PECES QUE COMPRENDE SALES DE SODIO, MAGNESIO Y CALCIO Y UN MODULADOR DEL RECEPTOR DE CATIONES POLIVALENTES (PVCR) EN LA FORMA DE TRIPTÓFANO O FENILALANINA; Y USO PARA EL TRATAMIENTO PROFILÁCTICO Y/O TERAPÉUTICO DEL SÍNDROME HEMORRÁGICO DEL SMOLT (HSS) EN SALMONIDAE", cuyo solicitante es EUROPHARMA AS.

Que, con fecha siete de octubre de dos mil veintiuno, se dictó sentencia definitiva en la causa, rechazando la oposición presentada por BIOMAR CHILE S.A., aceptando a registro la invención de autos, solicitada por EUROPHARMA AS., por cumplir con los requisitos de patentabilidad.

Que, con fecha veintinueve de octubre de dos mil veintiuno, el oponente BIOMAR CHILE S.A., interpone recurso de apelación basado en que la solicitud no cumple con los requisitos de patentabilidad, fundándose en los artículos 17 bis b), 5, 31, 32, 33, 35, 36 y 37 letra d) de la Ley de Propiedad Industrial, argumentando que carece de novedad y nivel inventivo.

Que, el veintiséis de noviembre del año dos mil veintiuno, se dictó resolución de autos en relación.

Que, como medida para mejor resolver, se estimó necesario requerir un informe pericial, para cuyo efecto se citó a las partes a un comparendo de estilo para la designación del perito, se fijó audiencia para el día tres de mayo del presente.

Que, consta en autos, que se lleva a efecto la audiencia de designación de perito con la asistencia de la abogada María Trinidad Rojas Wünkaus en representación de BIOMAR CHILE S.A. y del abogado Juan Francisco Peralta Inda, en representación de EUROPHARMA AS. Los profesionales acuerdan designar como perito en estos autos al Sr. Pablo Cañón Amengual, Bioquímico.

SE RESUELVE:

PRIMERO: Como medida para mejor resolver requiérase informe pericial, a fin de que el perito informe:

1. Ilustrar al Tribunal sobre las características esenciales de la patente objeto de la solicitud de autos, considerando siempre el último pliego de reivindicaciones válidamente presentado en autos. Analizar si dicho pliego constituye una ampliación del contenido original y de los pliegos presentados con posterioridad, especialmente el pliego analizado por el resolutor de primer grado y si éste se encuentra debidamente sustentado en la memoria descriptiva. Desde los antecedentes que existen en la Memoria Descriptiva, determinar cuál era el problema técnico que se buscaba resolver.
2. Ilustrar al Tribunal sobre cuáles son las características especiales -en el evento de tenerlas- que posee la invención presentada a patentamiento respecto del estado del arte conocido, especialmente de los documentos D11, D12, D13, D5, D7, D2 y declaración documento Dicon.
3. Explicar al Tribunal, si los documentos D12 en combinación con D13, anticipan o no las características de la reivindicación 1, y si estos documentos se dirigen o no al mismo problema objetivo de la smoltificación y al mismo tipo de peces.
4. Explicar al Tribunal, si la única diferencia entre el documento D5 y la solicitud es la adición de triptófano o fenilalanina libres al alimento, y si de ser así, tal diferencia conlleva o no algún efecto frente al estado del arte citado.
5. Ilustrar al tribunal si las cantidades mínimas de iones de calcio reivindicados en la cláusula principal proporcionan algún efecto en comparación con los datos experimentales entregados en la solicitud y si las cantidades entregadas son o no mas altas y si esto se considera o no una ventaja frente al estado del arte citado.
6. Explicar el alcance del técnico del documento D2, si incluye o no evidencia experimental sobre la dieta de prueba de los peces, su alimentación y rango reivindicado.
7. Señalar y explicar el alcance del documento Dicon, su combinación con D2 y lo reivindicado en autos y cuáles sus efectos frente a las especies.
8. Si, teniendo presente la conclusión de los puntos anteriores y el análisis de lo divulgado en el arte previo, la solicitud de invención, a su juicio, presenta novedad, nivel inventivo y aplicación industrial, explicando cómo y por qué llega a esa conclusión.

SEGUNDO: El informe pericial tendrá el siguiente contenido mínimo:

El nombre, apellido, profesión, nacionalidad, domicilio y Cédula Nacional de Identidad del perito;

Signer: Marta Beatriz Araya Fernandez
Date: vie, may 5, 2023 09:34:46 CLT
Location: PUNE

La descripción de la situación o estado de los hechos, sobre los que se hizo el peritaje;

La exposición detallada de lo que se ha comprobado en relación al encargo;

La motivación o fundamentación del examen técnico;

La indicación de los criterios científicos o técnicos y las reglas de las que se sirvieron para hacer el examen;

Conclusiones, las mismas que deberán ser claras, detalladas y fundamentadas en la interpretación de los hallazgos obtenidos, teniendo la precaución de no presentar ambigüedades que den lugar a diversas interpretaciones; y,

Lugar, fecha y firma.

TERCERO: Que, considerando la designación de común acuerdo por las partes en calidad de perito de Don Pablo Cañón Amengual profesión Bioquímico, quien tendrá el plazo de 30 días corridos para evacuar su encargo, a contar de la fecha en que acepte el cargo. Se aplicarán al perito las inhabilidades legales y las establecidas en el artículo 413 del Código de Procedimiento Civil. El perito deberá aceptar el cargo, jurando desempeñarlo fielmente, en el acto de la notificación o ante el Ministro de fe respectivo o ante la Secretaria Abogada del Tribunal, debiendo dejarse testimonio en autos de su juramento y aceptación.

CUARTO: Fíjense como honorarios periciales la suma de \$663.000. El pago del honorario se deberá efectuar mediante depósito o transferencia electrónica en la cuenta corriente N° 900.360-6 del Banco Estado, a nombre de la Subsecretaría de Economía y Empresas de Menor Tamaño, RUT N° 60.701.000-5, debiendo informar del hecho a través de la presentación de un escrito en el expediente respectivo o por vía electrónica a la Secretaria Abogada del Tribunal al correo maraya@tdpi.cl.

QUINTO: El pago de los honorarios periciales será de cargo de la recurrente. Si dentro de los plazos designados no cumple con la obligación de pago, quedará sin efecto la presente resolución, procediéndose a resolver sin más trámite.

SEXTO: Recibido el pago por la Sra. Secretaria Abogada del Tribunal, se notificará al perito designado. En el acto de la notificación se le hará presente que además de su informe, deberá absolver las consultas que pudieren efectuar los señores Ministros integrantes del Acuerdo de autos, en audiencia a efectuar especialmente al efecto.

SÉPTIMO: Suspéndase, entretanto, el estado de acuerdo.

Rol TDPI N° 001489-2021.

Dictada por el Ministro Sr. Marco Arellano Quiroz, Ministra Sra. Carmen Iglesias

Muñoz, Ministra Sra. Pamela Fitch Rossel.

This document is digitally signed

This document is digitally signed

This document is digitally signed

RESOLUCION ANOTADA EN EL ESTADO DIARIO CON ESTA FECHA

Signer: MARCO ANTONIO ARELLANO
QUIROZ
Date: jue, may 4, 2023 12:45:15 CLT
Location: PUNE

Signer: CARMEN GABRIELA IGLESIAS
MUNOZ
Date: jue, may 4, 2023 13:00:39 CLT
Location: PUNE

Signer: PAMELA FRANCISCA FITCH ROSSEL
Date: vie, may 5, 2023 09:27:18 CLT
Location: PUNE

Santiago, cinco de mayo del año dos mil veintitrés

No habiéndose notificado las resoluciones de fecha 04-05-2023 folios 33 y 34, en la referida fecha por estado diario, procédase a su notificación conjuntamente con la presente resolución.

ROL TDPI 1489-2021

Proveído por el Presidente del Tribunal de Propiedad Industrial Sr. Marco Arellano Quiroz.

NOTIFICADA POR EL ESTADO DIARIO CON ESTA FECHA

MTG

This document is digitally signed

Signer: MARCO ANTONIO ARELLANO
QUÍROZ
Date: vie, may 5, 2023 09:46:45 CLT
Location: PUNE

This document is digitally signed

Signer: Marta Beatriz Araya Fernandez
Date: vie, may 5, 2023 09:47:31 CLT
Location: PUNE

Materia : Patente de Invención

Solicitud : 201700674

Rol : 1489-2021

Acredita pago de honorarios periciales y acompaña comprobante de transferencia de fondos.

H. TRIBUNAL DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

María Trinidad Rojas Wünkhaus, en representación de la oponente y apelante Biomar Chile S.A., en el expediente de la solicitud de patente de invención N° 201700674, rol N° 1489-2021, al H. Tribunal de Propiedad Industrial respetuosamente digo:

Vengo en acreditar el pago de los honorarios periciales en estos autos, para lo cual se acompaña una copia del comprobante de la transferencia de fondos efectuada el día 08 de mayo de 2023, por la suma de \$ 663.000.-

POR TANTO,

al H. Tribunal de Propiedad Industrial respetuosamente pido: Se sirva tener por acreditado el pago de los honorarios periciales y por acompañado el comprobante de transferencia de fondos.



Trinidad Rojas W.

De: serviciodetransferencias@bancochile.cl
Enviado el: lunes, 8 de mayo de 2023 15:57
Para: Trinidad Rojas W.
Asunto: Pago honorarios perito P00195



CLARO Y COMPAÑIA

Ha instruido una transferencia de fondos

Datos de Destino	
Nombre del Beneficiario	Subsecretaría de Economía Y Empresas de Menor Tamaño
Número de Cuenta Corriente	9003606
Monto Operación	\$663.000
Datos de Origen	
Número de Cuenta Corriente Banco de Chile	4720079309
Datos de la Transacción	
Fecha y Hora de la Operación	08/05/2023 15:56
ID de la operación	INT_EMP2305081556109967726640
Mensaje Operación	Honorarios Perito P00195 por orden Claro y Cia





- **Por tu seguridad, este mensaje no tiene enlace al sitio web de Banco de Chile, además:**
- Nunca te pediremos ingresar a un sitio web desde un correo
- Nunca te pediremos ingresar tu clave Digipass antes del ingreso a tu Banco en Línea, ni al inicio de tu sesión
- Nunca te llamaremos ni pediremos por SMS tus claves, datos personales o tu clave Digipass
- Nunca hagas click en un link desde un correo porque puede llevarte a un sitio falso
- Verifica siempre que la URL del Banco en Línea comience con <https://>(en vez de <http://>)
- No hagas click en un link de resultado de búsqueda. Hasta un buscador puede no ser seguro.

ACTA DE NOTIFICACION, JURAMENTO Y ACEPTACION DE CARGO

En Santiago, 10 de mayo del año dos mil veintitrés, siendo las 11:30 horas, el **Sr. Pablo Cañon Amengual**, Bioquímico, quien fue designado perito por resolución de fecha 05-05-2023, en los autos correspondientes a la Patente de Invención número de solicitud INAPI **201700674**, rol TDPI N° **001489-2021**, tomó conocimiento personalmente de la designación, aceptó el nombramiento y juró desempeñarlo fiel y legalmente, ante la Secretaria Abogado del Tribunal de Propiedad Industrial en calidad de Ministro de Fe.

Powered by Firma electrónica avanzada
**PABLO MARTIN CANON
AMENGUAL**
2023.05.10 00:09:31 -0400

Sr. Pablo Cañon A.
Bioquímico

Secretaria Abogada

Santiago, diez de mayo del año dos mil veintitrés.

A sus autos acta de notificación, juramento y aceptación del cargo.

N° Rol 001489-2021

Resolución dictada por el Presidente del Tribunal de Propiedad Industrial Ministro Sr. Marco Arellano Quiroz.

RESOLUCION ANOTADA EN EL ESTADO DIARIO CON ESTA FECHA

This document is digitally signed

Signer: MARCO ANTONIO ARELLANO
QÚIROZ
Date: mié, may 10, 2023 13:05:47 CLT
Location: PUNE

This document is digitally signed

Signer: Marta Beatriz Araya Fernandez
Date: mié, may 10, 2023 13:42:00 CLT
Location: PUNE

Santiago, diez de mayo del año dos mil veintitrés.

C/2023/010914 Por acompañado y agréguese a sus autos comprobante de transferencia por concepto de honorario pericial.

Nº Rol 001489-2021.

Resolución dictada por el Presidente del Tribunal de Propiedad Industrial Ministro Sr. Marco Arellano Quiroz.

AMTV

RESOLUCION ANOTADA EN EL ESTADO DIARIO CON ESTA FECHA

This document is digitally signed

Signer: MARCO ANTONIO ARELLANO
QÚIROZ
Date: mié, may 10, 2023 12:55:07 CLT
Location: PUNE

This document is digitally signed

Signer: Marta Beatriz Araya Fernandez
Date: mié, may 10, 2023 13:19:52 CLT
Location: PUNE

INFORME PERICIAL

SOLICITUD DE PATENTE N° 201700674 (ROL TPI 1489-2021)

Nombre Perito: Pablo Cañón Amengual
Profesión: Bioquímico
Nacionalidad: Chilena
Domicilio: Monte Alegre 1133, Depto. A3, Las Condes.
RUT: 13.756.009-7

Solicitud de patente de invención N.º 201700674 para “Alimento para peces que comprende sales de sodio, magnesio y calcio y un modulador del receptor de cationes polivalentes (PVCR) en la forma de triptófano o fenilalanina; y uso para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico del síndrome hemorrágico del smolt (HSS) en salmonidae”.

Solicitante: Europharma AS.

Oponente (apelante): Biomar Chile S.A.

Pliego de reivindicaciones analizado:	Pliego presentado al TDPI el 22 de marzo de 2023.
--	---

I.- Antecedentes Generales

El Informe Pericial fue solicitado por Resolución de fecha 4 de mayo de 2023 del Tribunal de Propiedad Industrial, como medida para mejor resolver en la solicitud de patente N° 201700674 que consta en la causa Rol TDPI N° 1489-2021. La Resolución señalada solicita que se informe respecto a los siguientes puntos:

1. Ilustrar al Tribunal sobre las características esenciales de la patente objeto de la solicitud de autos, considerando siempre el último pliego de reivindicaciones válidamente presentado en autos. Analizar si dicho pliego constituye una ampliación del contenido original y de los pliegos presentados con posterioridad, especialmente el pliego analizado por el resolutor de primer grado y si éste se encuentra debidamente sustentado en la memoria descriptiva. Desde los antecedentes que existen en la Memoria Descriptiva, determinar cuál era el problema técnico que se buscaba resolver.
2. Ilustrar al Tribunal sobre cuáles son las características especiales -en el evento de tenerlas- que posee la invención presentada a patentamiento respecto del estado del arte conocido, especialmente de los documentos D11, D12, D13, D5, D7, D2 y declaración documento Deacon.
3. Explicar al Tribunal, si los documentos D12 en combinación con D13, anticipan o no las características de la reivindicación 1, y si estos documentos se dirigen o no al mismo problema objetivo de la esmoltificación y al mismo tipo de peces.
4. Explicar al Tribunal, si la única diferencia entre el documento D5 y la solicitud es la adición de triptófano o fenilalanina libres al alimento, y si de ser así, tal diferencia conlleva o no algún efecto frente al estado del arte citado.
5. Ilustrar al tribunal si las cantidades mínimas de iones de calcio reivindicados en la cláusula principal proporcionan algún efecto en comparación con los datos experimentales entregados

en la solicitud y si las cantidades entregadas son o no más altas y si esto se considera o no una ventaja frente al estado del arte citado.

6. Explicar el alcance del técnico del documento D2, si incluye o no evidencia experimental sobre la dieta de prueba de los peces, su alimentación y rango reivindicado.
7. Señalar y explicar el alcance del documento Deacon, su combinación con D2 y lo reivindicado en autos y cuáles sus efectos frente a las especies.
8. Si, teniendo presente la conclusión de los puntos anteriores y el análisis de lo divulgado en el arte previo, la solicitud de invención, a su juicio, presenta novedad, nivel inventivo y aplicación industrial, explicando cómo y por qué llega a esa conclusión..

Inventor: Nordly, J. R., Lyngøy, A., Mansilla, C., Retamal.

Fecha de Solicitud: 23-03-2017

Número de Prioridad: US 62/053,826 23-09-2014

Solicitud Internacional PCT: EP 2015/071684 22-09-2015

Solicitante: Europharma AS.

Representante solicitante: Sargent & Krahn

Oponente (apelante): Biomar Chile S.A.

Representante oponente: Claro

Resumen:

Un alimento para peces útil en un método para la esmoltificación y prevención de la desmoltificación en Salmonidae, y para la profilaxis y el tratamiento del síndrome hemorrágico del smolt (HSS) en Salmonidae. El alimento contiene proteína, grasa, carbohidratos, vitaminas, minerales y agua, y además comprende sales de sodio (Na⁺) de 10 -100 g/kg en peso, modulador del receptor de cationes polivalentes (PVCR) de 1-10 g/kg en peso, sales de magnesio (Mg²⁺) de 0,1-100 g/kg en peso, y sales de calcio (Ca²⁺) de 0,1-100 g/kg en peso.

II.- Antecedentes Evaluados

- Solicitud (inglés): 20-03-2017
 - o Pliego de reivindicaciones (23 cláusulas)
- Solicitud (español): 12-12-2017
 - o Pliego de reivindicaciones (23 cláusulas)
- Oposición: 29-03-2018
- Solicitante contesta demanda de oposición: 16-03-2018
- Solicitante acompaña nuevo PR: 08-03-2019
 - o Pliego de reivindicaciones (13 cláusulas)
- Téngase presente del oponente: 22-03-2019
- Informe pericial: 09-08-2019
- Solicitante contesta Informe pericial: 12-11-2019
 - o Nueva memoria descriptiva.
 - o Nuevo pliego de reivindicaciones (10 cláusulas)
 - o Nuevas figuras 1 a 28.
 - o Anexo A1: Hugli et al.; "Determination of the Tryptophan content of proteins by ion exchange chromatography of alkaline hydrolysates*"; The Journal of Biological Chemistry (1972; vol. 247, N° 9; pp 2828-2834).
 - o Anexo A2: Davies, M; "The Biochrom Handbook of Amino Acids"; Biochrom, Cambridge (2002; pp. 85).

- Anexo A3: WO02/30182 A2 (Aquabio Products Sciences LL; 18.04.2002), páginas 1, 44, 118 - 120.
- Anexo A4: pliego de reivindicaciones concedido de patente N° EP3197290 B1.
- Oponente contesta Informe pericial: 07-02-2020
 - Hoseini, S. y Hoseini, S. (2010). Effect of dietary L-tryptophan on osmotic stress tolerance in common carp, *Cyprinus carpio*, juveniles. *Fish Physiol Biochem*, 36, 1061-1067.
 - Sauvant, J., Pérez, J.M. y Tran, G. (Eds.).(2004). Tables of composition and nutritional value feed materials. INRA. (Extracto).
 - Reite and Staurnes, Fiskehelse, 1990 (extracto).
 - Einen/Mørkøre, Fôringslære for akvakultur, 1997 (extracto).
 - Tom Hansen (Editor), Oppdrett af laksesmolt, 1998, A/S Landbruksforlaget (extracto).
 - Nutrient requirements of fish and shrimp, Table 18-1, 2011, The National Academies Press, Washington D.C.
 - Nutrient requirements of fish, 1993, The National Academies Press, Washington D.C.
 - Declaración del Experto Torbjørn Åsgard, incluyendo su Curriculum Vitae.
 - Shearer and Åsgård, *Fish physiol. and Biochem.* Vol 9, 1992, 387-392.
 - Declaración del Experto H. William Harris, de fecha 30 de septiembre de 2019, presentada en la fase nacional en Noruega, por el solicitante.
 - Conigrave et al., L-amino acid sensing by the extracellular Ca²⁺-sensing receptor, *PNAS*, Vol 97, 2000, p 4816-4819.
 - Declaración del Experto Sigurd Stefansson, incluyendo su Curriculum Vitae.
- Respuesta del Perito: 14-05-2020
- Oponente contesta Informe pericial: 11-08-2020
 - Espe et al. (1994). Do Atlantic salmon (*Salmo salar*) utilize mixtures of free amino acids to the same extent as intact protein sources for muscle protein synthesis? *Comp. Biochem. Physiol*, 107A(1), 249-254.
 - NRC 2011.
 - Annex 1 (cálculos de cantidades de iones y aminoácido en Espe).
- Solicitante contesta Informe pericial: 09-11-2020
 - Pliego de reivindicaciones (8 cláusulas)
 - Declaración del Dr. Harris.
 - Striberny et al., *Aquaculture*, 532 (2021), 736044, pp. 1 – 16.
 - Presentación ppt de Børge Takvam.
 - Traducción al inglés de la decisión del Tribunal de la Ciudad de Oslo de principios de 2020.
- ITE sugiriendo aceptación: 31-08-2021
- Fallo de aceptación de registro: 07-10-2021
- Recurso de Apelación del oponente: 29-10-2021
- Téngase presente del oponente: 21-04-2022
 - Optimised growth study, Feeding trial with Atlantic salmon (*Salmo salar*)”, emitido por el instituto de investigación noruego Nofima, con fecha 8 de diciembre de 2021.
- Solicitante acompaña nuevo PR: 22-03-2023
 - Pliego de reivindicaciones (5 cláusulas)
- Téngase presente del oponente: 29-03-2023
 - Declaración de Greg Deacon.
- Téngase presente del solicitante: 03-04-2023
 - Nuevo pliego de reivindicaciones (5 cláusulas).
 - Nutrient Requirements off Fish and Shrimp; The National Academies Press; páginas 106, 107, y páginas 326, 327.
 - Segunda Declaration of Dr. William Harris

- Basic 2013; Aquaculture 388-391: páginas 8-13
- Lepage et al. (2002). The Journal of Experimental Biology, 205, 3679-3687.
- Lepage, (2005). J. Pineal Res. 2005; 38: 264-271.
- Cuarta Declaración del Dr. William Harris
- Declaración de Jesse Trushenski
- Declaración de Richard Torrisen
- Decisión del Comité de Apelación del Tribunal Supremo de Noruega
- Copia simple de sentencia de Tribunal de Propiedad Industrial Rol TPI 1794-2019 emitido el 28 de julio de 2021
- Copia simple de fallo N° 10.664 emitido el 10 de junio de 2021 respecto de la
- solicitud 3161-2014 por INAPI.
- Copia simple de sentencia de Tribunal de Propiedad Industrial Rol TPI 1538-2020 emitida el 23 de agosto de 2022.
- Téngase presente del oponente: 26-04-2023
- Medida para Mejor Resolver del TDPI: 04-05-2023
- Estado del arte:
 - **D2:** WO 02/30182 A2 (AQUABIO PRODUCTS SCIENCES). 18-04-2002.
 - **D5:** Basulto, S. "Induced saltwater tolerance in connection with inorganic salts in connection with inorganic salts in the feeding of atlantic salmon (*Salmo salar* L.)". vol 8, pp. 45-55, 01-01-1976.
 - **D7:** Anonymous. "Skretting feed catalogue (passage)". SKRETTING FEED CATALOGUE. 01-08-2012.
 - **D11:** Aas, T. S., Terjesen, B. F., Sigholt, T., Hillestad, M., Holm, J., Refstie, S., ... & Åsgård, T. (2011). Nutritional responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets with different physical qualities at stable or variable environmental conditions. *Aquaculture Nutrition*, 17(6), 657-670.
 - **D12:** Hoseini, S. y Hoseini, S. (2010). Effect of dietary L-tryptophan on osmotic stress tolerance in common carp, *Cyprinus carpio*, juveniles. *Fish Physiol Biochem*, 36, 1061-1067.
 - **D13:** Sauvant, J., Pérez, J.M. y Tran, G. (Eds.).(2004). *Tables of composition and nutritional value feed materials*. INRA.

III- Definiciones

Clasificación de los peces según su patrón migratorio¹

Los peces migratorios se subdividen en diferentes categorías según el tipo de migración y su hábitat. Algunas especies de peces migran dentro de un mismo cuerpo de agua, mientras que otras migran hacia cuerpos de agua diferentes. Estas migraciones pueden ser para la cría, la alimentación o la hibernación. Los peces que permanecen en un solo lugar se llaman estacionarios.

El término "anádromos" y "catádromos", en que se clasificaban, solían ser confusos. George S. Myers en 1949 propuso nuevas definiciones que fueron ampliamente aceptadas en ese momento y siguen siendo aceptadas hoy en día. No obstante, Robert M. McDowall creyó que los términos "anadromía", "catadromía" y "anfidromía" eran formas exclusivas y especializadas de diadromía que parecían cubrir todas las posibilidades.

A continuación, se presentan las definiciones aceptadas hasta la actualidad:

- **Diádromos:** Son peces que migran entre agua dulce y agua salada.
 - **Anádromos:** Son peces diádromos que viven en el mar una gran parte de su vida y migran a aguas dulces para reproducirse. Por ejemplo, el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) que cría en el curso superior de un río.
 - **Catádromos:** son peces diádromos que viven la mayor parte de su vida en aguas dulces y migran al mar para desovar (por ejemplo, la anguila).
 - **Anfídromos:** son peces diádromos cuya migración entre agua dulce y salada, o viceversa, se realiza sin ánimo de reproducirse, sino por razones de alimentación o para hibernar. Los peces tilapia son anfídromos.
- **Potamódromos:** son peces que viven y migran en el interior de una misma cuenca hidrográfica, solo en el agua dulce. Por ejemplo, la trucha (*Salmo trutta*).
- **Oceanódromos:** que viven y migran en el mar, por ejemplo, para seguir las «nubes» de plancton. Los atunes son un ejemplo.

Según otros autores, se pueden utilizar definiciones más específicas o intermedias, como semicatádromos (Whitfield, 2005), semianádromos (Cronin y Mansueti 1971), migrante estuarino (Whitfield 1999, 2005), etc.

Proceso de acuicultura del salmón²

Los salmónidos salvajes comienzan su vida en agua dulce. Los salmones adultos desovan en agua dulce, de sus huevos se convierten en alevines y luego comienzan su desarrollo hasta convertirse en alevines y parr. En esta etapa, las señales ambientales inician el proceso de esmoltificación, preparando a los peces para la migración río abajo y la entrada al agua de mar, donde crecerán como una especie marina depredadora. Esta estrategia anádroma confiere ventajas reproductivas y de desarrollo al salmón porque les permite utilizar un entorno relativamente seguro proporcionado por el agua dulce para su reproducción, mientras que la migración juvenil hacia el océano les permite alimentarse de una rica fuente de peces y otros organismos marinos. Por lo tanto, la esmoltificación representa el punto de inflexión clave en el ciclo de vida anádromo del salmón del Atlántico.

El proceso de producción del salmón se desarrolló considerando el trasfondo biológico de este ciclo de vida típicamente anádromo. El proceso de producción de salmón se puede dividir en tres pasos (Figura 1): a) producción de reproductores, huevas y alevines en agua dulce; b) producción de smolts (esmoltificación) en agua dulce; y c) cultivo de peces de piscifactoría en agua de mar.

El ciclo de producción del salmón de piscifactoría dura en promedio unos tres años. Durante el primer año de producción, los huevos se fertilizan y los peces se desarrollan y crecen hasta aproximadamente 100 gramos en un ambiente controlado de agua dulce (Figura 1a y 1b). Posteriormente, los peces se transfieren a jaulas de agua de mar, donde continúan creciendo hasta aproximadamente 4-5 kg durante 14-24 meses (Figura 1c). Después de alcanzar el tamaño de captura, el pescado se transporta a plantas de procesamiento primario donde se sacrifica y eviscera.

Base biológica de los cambios fisiológicos que ocurren durante la esmoltificación²

En la naturaleza, la esmoltificación, también llamada transformación parr-smolt, es un proceso de adaptación complejo impulsado por el sistema endocrino que consiste en varios cambios de desarrollo independientes pero coordinados en la bioquímica, fisiología, morfología y comportamiento del salmón juvenil. Estos cambios poseen un alto costo energético para los peces y se correlacionan con una disminución de las defensas relacionadas con el sistema inmunológico, sin embargo, este proceso prepara a los peces para la migración río abajo y la transición a la etapa de vida marina. Los componentes importantes de la transformación parr-smolt son i) señales ambientales, principalmente fotoperíodo y temperatura; ii) control endocrino de la esmoltificación, y iii) cambios fisiológicos en la osmorregulación que permiten que los smolt prosperen en ambientes con alto contenido de sal.

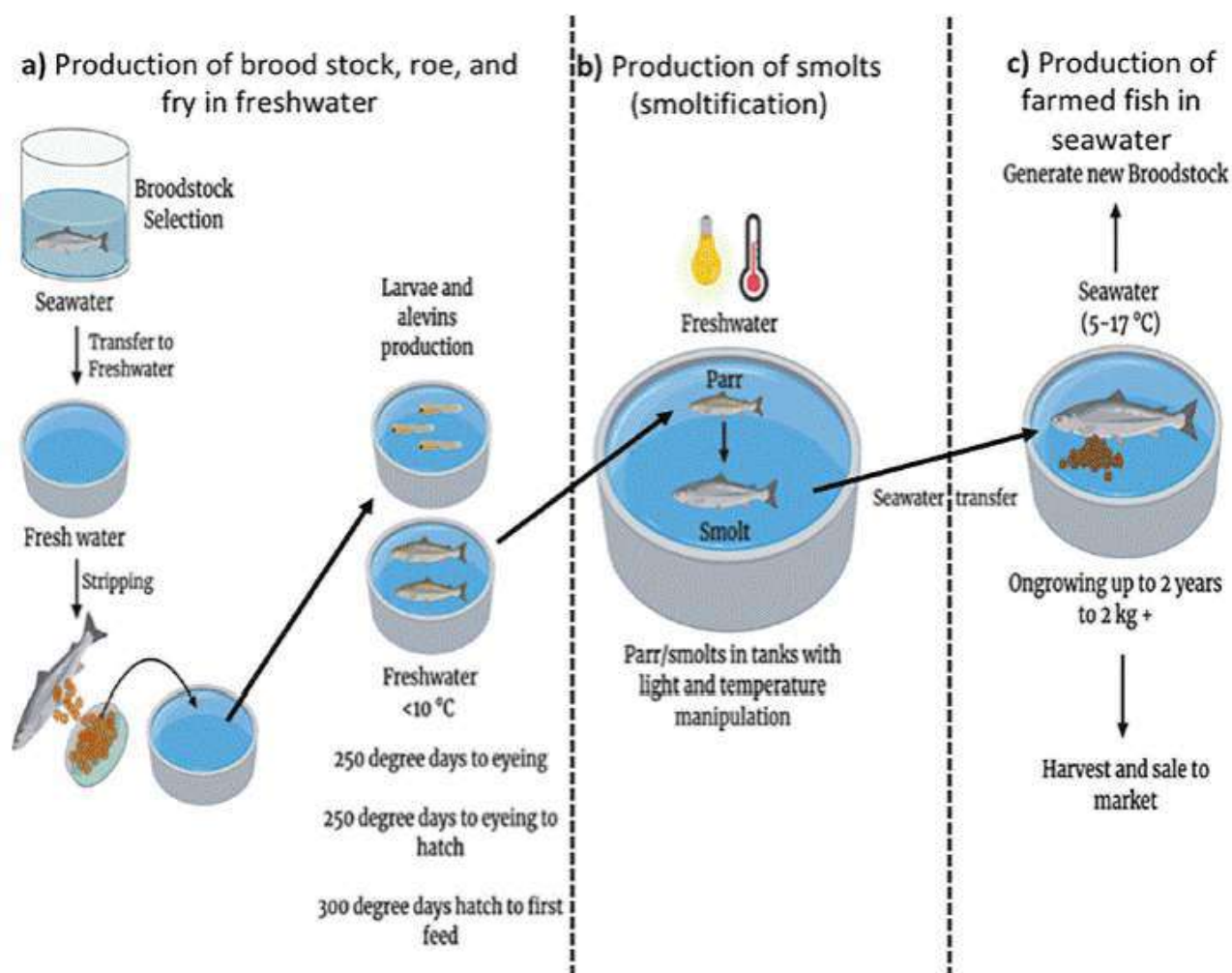


Figura 1: Resumen del proceso de producción del salmón (Morera et al., 2021).

i) Regulación ambiental de la esmoltificación

El fotoperíodo y las fluctuaciones estacionales de temperatura son dos señales ambientales importantes que trabajan juntas para transformar las crías de salmón del Atlántico en smolts. En el hemisferio norte, la esmoltificación del salmón salvaje se completa en la primavera, cuando un aumento de temperatura de 8 a 10 °C inicia la migración de los smolt salvajes al agua de mar. El mecanismo por el cual la información fotoperiódica se traduce en una respuesta neuroendocrina en los teleósteos no ha sido completamente dilucidado. Diferentes fotoperíodos preparatorios muestran patrones diferenciales de actividad y expresión de NKA branquial en ionocitos. La secreción de

melatonina por la glándula pineal de los salmónidos puede estimularse directamente mediante el fotoperíodo. Además, la temperatura elevada aumenta la secreción de melatonina y la glándula pineal del salmón podría estar funcionando como sensor de temperatura y fotoperíodo.

ii) Regulación hormonal de la esmoltificación

La transformación Parr-smolt involucra varios sistemas de señalización endocrina (Figura 2). Una vez que los salmones han alcanzado un umbral relacionado con el tamaño o el crecimiento, el fotoperíodo y la temperatura estacional estimulan el eje luz-cerebro-hipófisis, lo que da como resultado incrementos simultáneos de la hormona del crecimiento (GH), el cortisol y las hormonas tiroideas. Además de sus funciones relacionadas con el crecimiento, la GH modula el metabolismo intermediario y los mecanismos osmorreguladores en los peces estimulando la actividad de la somatomedina, como los factores de crecimiento similares a la insulina IGF-1 e IGF-2. La GH y el cortisol interactúan para controlar los mecanismos hiperosmorreguladores en branquias, intestinos y riñones, promoviendo una mayor tolerancia a la salinidad y cambios en el crecimiento (relación peso-longitud) y el metabolismo intermediario. En las branquias, el cortisol y el eje GH/IGF-1 promueven la diferenciación de los ionocitos secretores de sal (consulte la siguiente sección para obtener más detalles), un proceso que requiere la regulación positiva de tres principales transportadores de membrana osmorreguladores: la ATPasa sodio-potasio (NKA), el cotransportador 1 de cloruro de sodio-potasio-2 (NKCC1) y el regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR).

Por último, las hormonas tiroideas regulan la impronta olfativa, el metabolismo, los cambios morfológicos como el plateado y posiblemente el comportamiento, mientras que se cree que la prolactina en la esmoltificación es un inhibidor general de la mayoría de los aspectos del desarrollo de los smolt. Se detecta un aumento de las hormonas tiroideas (plasma T4) en smolts de criadero después de la liberación y en smolts silvestres durante la migración. Además, la T4 plasmática aumenta después de que los smolts se exponen a agua con diferentes composiciones químicas o durante la entrada a ambientes estuarinos.

iii) Cambios osmorreguladores en las brallas durante la esmoltificación

Como se mencionó anteriormente, los salmónidos comienzan su ciclo de vida en agua dulce, donde son hiperosmóticos al medio externo. La presión osmótica favorece la entrada de agua al cuerpo y la pérdida de sal por difusión a través de las branquias. Para compensar este flujo pasivo de agua e iones para mantener la homeostasis, el pez elimina el exceso de agua en forma de orina diluida y obtiene sales de los alimentos en el intestino y agua mediante absorción activa a través del epitelio de las branquias. A medida que ingresan al agua de mar, el gradiente osmótico se invierte porque los fluidos internos de los salmónidos tienen aproximadamente un tercio de la osmolaridad del agua de mar y se vuelven hipoosmóticos en relación con el medio externo. En consecuencia, los salmones pierden agua y ganan sales por difusión pasiva. Como mecanismos compensatorios, beben agua de mar, reducen su producción de orina y secretan activamente sales a través del epitelio de las branquias a través de células especializadas llamadas ionocitos, células ricas en mitocondrias (MR) o células de cloruro.

Bibliografía

1 Morais, P; Daverat, F (2016). *An Introduction to Fish Migration*. CEC Press.

2 Morera, Francisco J., Castro-Guarda, Marcos, Nualart, Daniela, Espinosa, Gabriel, Muñoz, Jose L., & Vargas-Chacoff, Luis. (2021). The biological basis of smoltification in Atlantic salmon. *Austral journal of veterinary sciences*, 53(1), 73-82. <https://dx.doi.org/10.4067/S0719-81322021000100073>

3 McCormickSD. 2013. Fisiología y endocrinología de los smolts. En: Fisiología de los peces: peces eurihalinos . 1ª ed. McCormick SD, Farrel AP, Brauner CJ (eds). Academic Press, Waltham, EE. UU., págs. 199-251

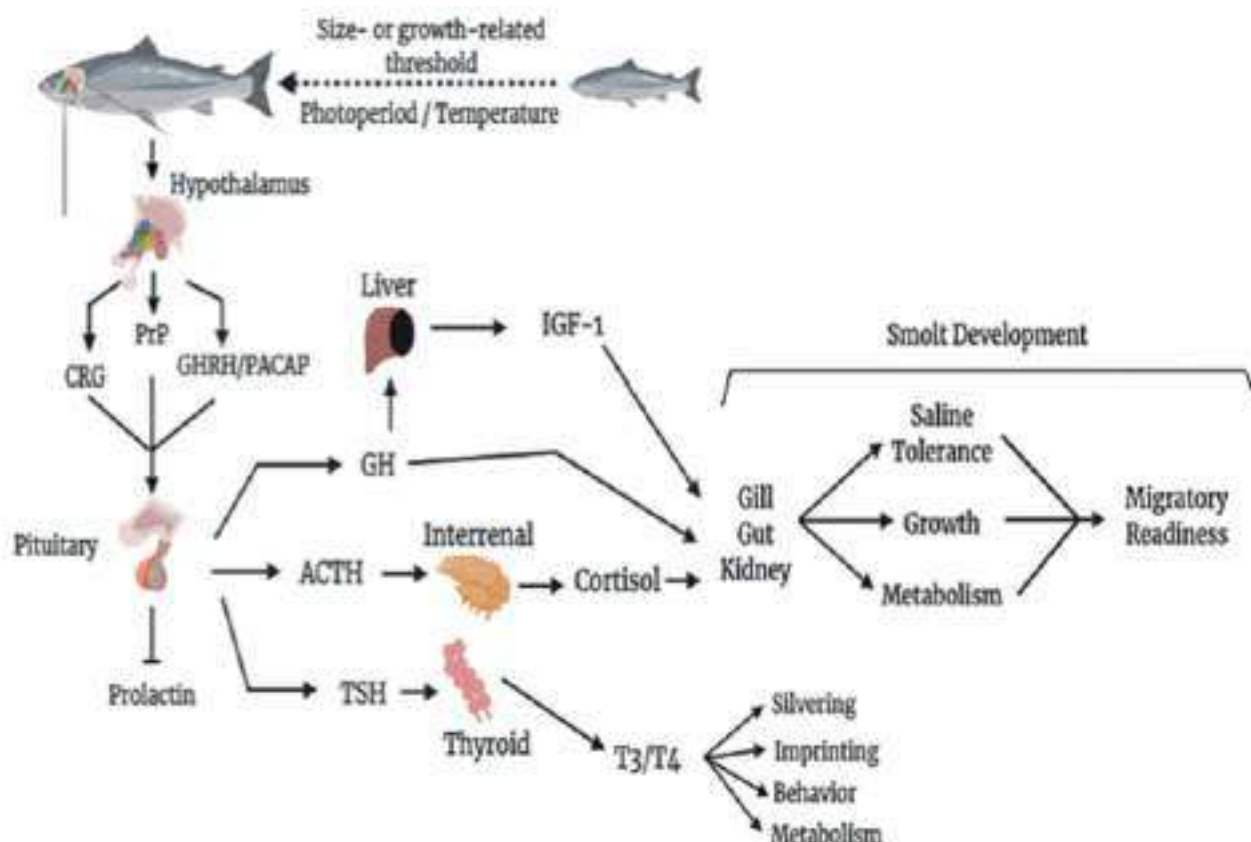


Figura 2: Control neuroendocrino de la esmoltificación (modificado de McCormick 2013). El aumento de la respuesta del eje luz-cerebro-pituitaria estimula los niveles circulantes de la hormona del crecimiento (GH), el cortisol y las hormonas tiroideas. Esta respuesta se desencadena cuando los peces alcanzan un umbral relacionado con el tamaño o el crecimiento para iniciar la esmoltificación en respuesta a estímulos de fotoperíodo/temperatura. La GH y el cortisol interactúan para controlar los mecanismos hiperosmorreguladores en las branquias, el intestino y los riñones, lo que resulta en una mayor tolerancia a la salinidad, así como cambios en el crecimiento y el metabolismo. CRF: factor liberador de corticotropina; PrP: péptido liberador de prolactina; GHRH: hormona liberadora de la hormona del crecimiento; PACAP: péptido activador de la adenilato ciclasa pituitaria; ACTH: hormona adrenocorticotrópica; TSH: hormona estimulante de la tiroides.

IV.- Evaluación de los Antecedentes

Con fecha 20 de marzo de 2017 se presentó la solicitud N° 20170064 para “Alimento para peces que comprende sales de sodio, magnesio y calcio y un modulador del receptor de cationes polivalentes (PVCr) en la forma de triptófano o fenilalanina; y uso para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico del síndrome hemorrágico del smolt (HSS) en salmonidae” por Europharma AS.

Con fecha 29 de marzo de 2018, Biomar Chile S.A. formula oposición, por cuanto la solicitud no cumpliría con los requisitos de patentabilidad que exige la ley.

Los siguientes antecedentes del proceso figuran en el Fallo de aceptación a registro que continúa.

FALLO DE ACEPTACIÓN A REGISTRO: 07-10-2021

El Fallo establece en el punto N.º 2 “Antecedentes de la oposición”:

“Que, dentro del plazo legal, BIOMAR CHILE S.A., interpuso demanda de oposición en contra de la solicitud de patente de invención de autos, fundada en los artículos 5, 31, 32, 35, 36, 37 letra d) y demás disposiciones pertinentes de la Ley N.º 19.039, solicitando su rechazo total ya que la solicitud adolece

de falta de claridad, no cumple el requisito de nivel inventivo y reivindica materia excluida de patentabilidad.

En relación con la falta de claridad, el oponente señala que las reivindicaciones 1 y 13 protegen una variedad de sales, aunque se citan iones entre paréntesis después de las sales respectivas (“sales de sodio (Na⁺) de 10-100 g/kg en peso, sales de magnesio (Mg²⁺) de 0,1-100 g/kg en peso y sales de calcio (Ca²⁺) de 0,1-100 g/kg en peso”). De la lectura de las reivindicaciones, es poco claro si los rangos citados en g/kg se refiere a las sales per se o a la cantidad de iones de sodio, magnesio o calcio disponibles por dichas sales. En otrosí el oponente acompaña los siguientes documentos, con citación:

- a) Basulto, 1976.*
- b) Basulto, Cálculos, 1976.*
- c) Catálogo “Skretting feed”, 2012, y su traducción al inglés.*
- d) Nylund et al., 2003.*
- e) Roger and Richards, 1998.”*

En el punto N.º 3 “De la contestación del demandado” del Fallo se establece que:

“Que se confirió traslado de la oposición al solicitante, quien contestó la demanda solicitando que sea rechazada, por falta de fundamento. Adicionalmente el solicitante acompañó un nuevo pliego de reivindicaciones”.

En el punto N.º 4 “De la prueba rendida” del Fallo se establece que:

“Que se tuvo por contestada la oposición, y se recibió la causa a prueba a fin de que el demandante acredite: “Efectividad que la invención cuya patente se solicita, resulta obvia o se habría derivado de manera evidente del estado de la técnica a la fecha de presentación de la solicitud de autos o de la respectiva prioridad, según sea el caso”.

Que, durante la fase de prueba, solo el oponente acompañó copia de los siguientes documentos:

- a) Basulto, Cálculos, 1976.*
- b) Catálogo “Skretting feed”, 2012, y su traducción al inglés.*
- c) Nylund et al., 2003.*
- d) Roger and Richards, 1998”.*

En el punto N.º 5 “Del análisis técnico” del Fallo se establece que:

“1.- Que fue designado perito en estos autos don Claudio Allard, Bioquímico, quien aceptó el cargo con fecha 25 de febrero de 2019.

2.- Que el perito evacuó el informe pericial N°1 con fecha 09 de agosto de 2019 y el informe pericial N°2 con fecha 14 de mayo de 2020.

3.- Que el solicitante formuló observaciones a los informes periciales N°1 y N°2.

4.- Que el demandante formuló observaciones a los informes periciales N°1 y N°2.

5.- Que, de acuerdo a lo señalado en el informe pericial N°2, el perito informa que la solicitud cumple con el requisito de novedad establecido en el artículo 33 de la Ley N° 19.039, por cuanto los documentos

de la búsqueda internacional, entre otros: Basulto S. “Induced saltwater tolerance in connection with inorganic salts in connection with inorganic salts in the feeding of atlantic salmon (*salmo Salar L*) vol 8, pag 45-55, 01/01/1976 (D5); Anonymous: “Skretting feed catalogue (passage) (ENGLISH TRANSLATION ENCLOSED)”. SKRETTING FEED CATALOGUE. 01/08/2012 (D7); Terjesen TS et al. Nutritional responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* fed diets with differenet physical qualities at stable or variable environmental conditions. AQUACULTURE NUTRITION vol 17 pag 657-670. 2011 (D11); Hoseini S et al. “Effect of dietary L-tryptophan on osmotic stress tolerance in common carp, *Cyprinus carpio*, juveniles. FISH PHYSIOL BIOCHEM. Vol 36, pag 1061- 1067. 2010 (D12), no interfieren con las reivindicaciones de la solicitud de autos.

6.- Que, en relación con el análisis de nivel inventivo, en el informe pericial N°2 el perito señala que el análisis de nivel inventivo se realizó para las reivindicaciones 1 a 10 que son novedosas.

Asimismo, señala el perito que el documento D11, que es considerado como el estado de la técnica más relevante, describe composiciones alimenticias para peces que comprenden lípidos, azúcares, proteínas, Ca (19435, 20958 mg/kg); Mg (2076, 2180 mg/kg); Na (5160, 5602 mg/kg); aminoácidos (Trp 3,5, 3,6 g/kg). Describe que el valor nutricional de la alimentación y las diferencias del valor nutricional están relacionados con la ingesta de comida (todo el documento).

Indica el perito que la materia de las reivindicaciones 1 a 10 difiere tan solo en que describe un alimento para peces que comprende proteína, grasa, carbohidratos, vitaminas, minerales y agua donde el alimento para peces comprende además de 3,934-39,340 g/kg en peso de Na⁺, de 1-10 g/kg en peso de un modulador del receptor de cationes polivalentes (PVCR) en la forma de Trp y Phe, de 0,026-25,530 g/kg en peso de Mg²⁺ y de 0,036-36,110 g/kg en peso de Ca²⁺, en donde el modulador del receptor de cationes polivalentes está en forma de aminoácidos libres. Y el uso de un alimento para peces de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones precedentes que sirve para preparar un medicamento.

Así, el problema a resolver por la presente invención se puede considerar por tanto, cómo proveer un alimento para fabricar un medicamento para tratar el síndrome hemorrágico de smolt (HSS) en salmonidae.

Señala la perito que la solución sería un alimento para peces que comprende proteína, grasa, carbohidratos, vitaminas, minerales y agua donde el alimento para peces comprende además de 3,934-39,340 g/kg en peso de Na⁺, de 1-10 g/kg en peso de un modulador del receptor de cationes polivalentes (PVCR) en la forma de Trp y Phe, de 0,026-25,530 g/kg en peso de Mg²⁺ y de 0,036-36,110 g/kg en peso de Ca²⁺, en donde el modulador del receptor de cationes polivalentes está en forma de aminoácidos libres. Y el uso de un alimento para peces de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones precedentes que sirve para preparar un medicamento.

El perito señala que la solución propuesta por el solicitante en las reivindicaciones 1 a 8 no tiene nivel inventivo, pues la diferencia entre el alimento descrito en D11 y el alimento descrito en la solicitud nacional es que el Trp y Phe no se encuentran de manera de aminoácidos libres. Sin embargo, esta diferencia se enseña en el documento D12, el cual describe el efecto de suplementar una dieta con L-Trp en la tolerancia al estrés osmótico en las carpas comunes. En la tabla 1 se describe los ingredientes de la dieta. Describiendo que una suplementación con Trp (0,5%) incrementa la tolerancia a el agua salada (todo el documento).

Por lo tanto, el perito indica que a una persona versada en la materia sin dificultad alguna le parecería obvio reemplazar la cantidad de Trp por L-Trp libre en una dieta, el cual presenta un beneficio en la tolerancia al agua salada. Por lo tanto, al combinar los documentos D11 y D12, se logra obtener el alimento reivindicado por la solicitud nacional. Por lo tanto, el perito concluye que las reivindicaciones 1 a 8 no tienen nivel inventivo.

Indica el perito que el solicitante en la respuesta al informe N°1 describe que el propósito de D11 es totalmente diferente al de la presente invención y por lo tanto no puede considerarse que representa la técnica más cercana.

Este argumento no es persuasivo para otorgar nivel inventivo a las reivindicaciones 1 a 8 de la solicitud nacional, pues el solicitante reivindica un alimento y estos se caracterizan por sus componentes y no por su uso. Y el alimento reivindicado se puede derivar de las enseñanzas de los documentos D11 y D12.

Así, las reivindicaciones 9 a 10 describen el uso del alimento, un alimento para peces que comprende proteína, grasa, carbohidratos, vitaminas, minerales y agua donde el alimento para peces comprende además de 3,934-39,340 g/kg en peso de Na⁺, de 1-10 g/kg en peso de un modulador del receptor de cationes polivalentes (PVCR) en la forma de Trp y Phe, de 0,026- 25,530 g/kg en peso de Mg²⁺ y de 0,036-36,110 g/kg en peso de Ca²⁺, en donde el modulador del receptor de cationes polivalentes está en forma de aminoácidos libres que sirve para preparar un medicamento para preparar un medicamento útil para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de HSS en salmonidae.

El perito expone que la solución propuesta en las reivindicaciones 9 a 10 no puede considerarse que tenga nivel inventivo, pues el documento D7 describe un alimento "REACTIONIC", el cual es un alimento en base a sal destinado específicamente a prevenir el HSS con respecto a los acuicultores que no desean aplicar agua de mar a sus instalaciones, para prevenir el HSS. En el catálogo se describe el uso para la prevención de HSS (todo el documento). Por lo tanto, al combinar las enseñanzas del D7 con el D12 se obtiene el uso de un alimento rico en sal, suplementado con L-Trp, para ser utilizado para tratar o prevenir HSS. Por lo tanto, en base a la combinación de las enseñanzas de los documentos D7 y D12 las reivindicaciones 9 a 10 no tienen nivel inventivo.

Que, un análisis similar se puede utilizar utilizando el documento D5 como el estado del arte más cercano, el cual describe que el salmón del Atlántico fue alimentado con 4 dietas diferentes (AD). Para estudiar la tolerancia inducida al agua de mar. Describe un suplemento mineral de sales compuesta por NaCl 65.2 %; MgSO₄ 16, 3%; MgCl₂ 12,8 %; CaCl₂ 3,3; KCl 1,7%; NaHCO₃ 0,5%. Las dietas comprenden proteínas, grasa, carbohidratos, vitaminas, minerales y agua. Además describe en la página 49, que grupos de peces alimentados con una dieta enriquecida en sales tienen valores de sodio y cloruro más altos en el plasma sanguíneo. Y dado que los problemas osmoregulatorios son típicos de peces que padecen HSS. Por lo que el alimento descrito en D5, puede ser utilizado para prevenir HSS de acuerdo a lo descrito en D7.

Por lo que, a juicio del perito, a la persona del oficio normalmente versada en la materia le resultaría obvio el aplicar la solución descrita en D5 y D7 para resolver el problema definido, por lo que no se esperarían un comportamiento sorprendente de dicha aplicación.

Indica el perito que el solicitante en la respuesta al informe 1 describe que el documento D5 es cuestionable y que no está dirigido a un propósito o efecto similar al de la invención reivindicada, describe además que la tabla VI que los peces alimentados con una dieta durante 31 días no se

emoltifican y que se presentan tasas de supervivencia al agua de mar muy bajas y que a los 40 días tienen tasas de supervivencia significativamente más altas. Describiendo que los peces control tuvieron mayor tasa de supervivencia.

Sostiene el perito que los argumentos del solicitante no son persuasivos para otorgar nivel inventivo a las reivindicaciones 9 a 10, pues el solicitante pasa por alto la tabla V en el que el grupo control tiene 0% de supervivencia, mientras que los grupos enriquecidos con sal, poseen mayor % de sobrevivencia. Además, pasa por alto que el D5 describe que las dietas ricas en sal puedan efectivamente reemplazar la adaptación que tiene lugar cuando los peces están sujetos a una mayor salinidad en el agua en la que nadan (página 54). Por lo tanto, las reivindicaciones 9 a 10 no tienen nivel inventivo, de acuerdo a las enseñanzas de los documentos D5 y D7.

Señala el perito que la oposición argumenta con fecha 07 de febrero del 2020 que es conocido en el estado del arte que una ingesta excesiva de minerales por sobre la cantidad óptima puede producir una intoxicación en el pez. Y el D5 describe concentraciones tolerables. Describiendo que la solicitud nacional en sus reivindicaciones describe en su rango superior de concentración de sales el doble de la cantidad tolerable de sal en un alimento para el salmón.

Este argumento es persuasivo para no otorgar nivel inventivo a la solicitud nacional, pues la concentración en el rango superior de las sales reivindicadas no soluciona el problema técnico, de fabricar un medicamento para tratar el síndrome hemorrágico de smolt (HSS) en salmonidae; pues sería un alimento tóxico.

Por otro lado, el solicitante describe en respuesta a la oposición con fecha 16/08/2018 que la condición HSS afecta a los peces que ya han sido esmoltificados y que se mantienen en agua dulce, después de que se han adaptado a la vida de agua salada, describiendo que la alimentación descrita puede inducir esmoltificación en peces para prevenir la desmoltificación y mejorar los síntomas del HSS en los peces esmoltificados.

El perito concluye que este argumento no entrega nivel inventivo, pues se basa en un protocolo de tratamiento en el que se aplica el alimento, lo cual es materia que es excluida de patentabilidad según el artículo 37 letra d.

En conclusión, la solicitud no tiene nivel inventivo y no cumplen con el artículo 35 de la Ley N°19.039.

7- Que, por otra parte, la presente solicitud tiene aplicación industrial, dado que la materia reivindicada es susceptible de ser reproducida en la industria, de acuerdo al artículo 36 de la Ley N°19.039.

8.- Que en virtud de lo dispuesto en el artículo 86 del Reglamento de la Ley N° 19.039, se ordenó que pasaran los antecedentes al Examinador Mauricio Aguilera, a objeto que evacue un Informe Técnico.

9.- Que, en su Informe Técnico, el Examinador señala que atendido el mérito de los antecedentes y en especial el informe pericial N°2, la solicitud no cumpliría con el requisito de nivel inventivo de acuerdo a lo estipulado en el artículo 35 de la Ley N°19.039.

Que de acuerdo al análisis realizado por el examinador interno, la solicitud cumple con lo establecido en el artículo 35 de la Ley N°19.039.

Que en relación al nivel inventivo, el examinador informa que el solicitante con fecha 9 de noviembre de 2020 señala respecto a D11, considerado el estado del arte más cercano en la instancia pericial, que describe la composición química de dos dietas experimentales, donde el contenido de aminoácidos mencionado en la tabla 2 se refiere al contenido total de aminoácidos en el alimento, incluido el contenido de aminoácidos en péptidos y proteínas y no sólo el contenido de aminoácidos en forma libre, no siendo posible discriminar entre aminoácidos libres y aminoácidos en forma de péptidos y proteínas.

Adicionalmente, señala que D11 se centra en la calidad física del alimento, mientras que la solicitud proporciona un alimento para peces adecuado para la esmoltificación y para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico del síndrome hemorrágico del smolt (HSS) en Salmonidae, siendo el propósito o efecto de D11 completamente diferente al de la invención. En relación a D12, el solicitante indica que éste se relaciona con la tolerancia al estrés osmótico en carpas, el cual corresponde a un pez estenoalino. El pez estenoalino, a diferencia de los peces anádromos, no puede tolerar una amplia fluctuación en la salinidad del agua y son típicamente peces de agua dulce, no sufriendo la transformación fisiológica de la esmoltificación como ocurre con los peces anádromos, no abordando el mismo problema técnico abordado por la solicitud. En cuanto a D5, el solicitante señala que no mencionan ni indica que es importante modular la actividad de PVCR para que se desarrollen a smolt, por lo que no hay ninguna enseñanza en D5 sobre los compuestos o condiciones de un alimento que puedan funcionar como señales que inducen la esmoltificación o para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico del síndrome hemorrágico del smolt (HSS) en Salmonidae.

Adicionalmente, el solicitante señala que D5 no proporcionaría ningún incentivo para añadir calcio y magnesio al alimento de los peces, por lo que la persona normalmente versada en la materia no se dirigiría a proporcionar un alimento compuesto de sales de calcio, magnesio y sodio y un aminoácido libre en forma de Trp o Phe para superar las desventajas de los métodos del estado de la técnica comúnmente utilizados por los productores de smolt en la fecha de prioridad. De esta forma, no hay ninguna enseñanza en D5 sobre los compuestos o condiciones de un alimento que puedan funcionar como señales que inducen la esmoltificación o para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico del síndrome hemorrágico del smolt (HSS) en Salmonidae.

En cuanto al documento D7, el solicitante señala que la única información proporcionada es que Skretting ha probado un alimento con sal añadida y muestra una tasa de mortalidad reducida, no proporcionando más información, por ejemplo, sobre el tipo y la cantidad de sales, la alteración del ensayo, los análisis realizados, etc.

*En cuanto al oponente, con fecha 11 de agosto de 2020 acompaña el documento “Do Atlantic salmon (*Salmo salar*) utilize mixtures of free amino acids to the same extent as intact protein sources for muscle protein synthesis?” (Espe et al., 1994), indicando que afectaría la novedad y nivel inventivo de la solicitud.*

Al respecto, el examinador señala que un experto en la materia no estaría motivado a considerar las enseñanzas del documento D11 para arribar a la presente solicitud, dado que resuelve un problema técnico diferente al de la solicitud. En cuanto a D5, indica que no es posible derivar las concentraciones del modulador del receptor de cationes polivalente (triptófano o fenilalanina) indicadas en la solicitud, ni el efecto en la esmoltificación o en el tratamiento profiláctico y/o terapéutico del síndrome hemorrágico del smolt (HSS) en salmones; D7, en tanto, no proporciona información sobre qué tipo y cantidad de sales son necesarios para llevar a cabo el efecto divulgado. Por lo tanto, considerando lo

anterior, no existe motivación en el estado del arte a proponer la composición específica alimentaria de la invención, ni su uso en la esmoltificación o en el tratamiento profiláctico y/o terapéutico del síndrome hemorrágico del smolt (HSS), cumpliendo de esta forma con lo establecido en el artículo 35 de la Ley N° 19.039.

En relación a los documentos D12-D19 aportados por el oponente con fecha 7 de febrero de 2020 y el documento “Do Atlantic salmon (Salmo salar) utilize mixtures of free amino acids to the same extent as intact protein sources for muscle protein synthesis?” acompañado con su última respuesta de fecha 11 de agosto de 2020, el examinador señala que no es dable aportar e invocar nuevos documentos fuera del término probatorio, no siendo en consecuencia considerados en el presente análisis por no corresponder.

Que el solicitante subsanó parcialmente los defectos de la solicitud, acompañando un nuevo pliego de reivindicaciones (cláusulas 1-8) con fecha 9 de noviembre de 2020, documentación que será considerada presentación definitiva, reemplazando en lo que corresponda la documentación individualizada por el perito.

Que la solicitud de autos adolece de evidentes errores de tipo formal en la hoja técnica que no afectan el fondo y que atendida su naturaleza se corrigen de oficio por el examinador.

Finalmente, en el punto N.º 6 “Considerando”, se señala que:

1.- Que, de acuerdo con el mérito de los antecedentes, cabe concluir que el Informe Técnico del Examinador señala que la solicitud cumple con los requisitos de patentabilidad establecidos en el artículo 32 de la Ley N°19.039.

2.- Que, en consecuencia, este Tribunal, apreciando los antecedentes de acuerdo a las normas de la sana crítica, hace suyas las fundamentaciones expuestas por el Examinador, en el sentido de que la solicitud cumple con los requisitos de patentabilidad de novedad, nivel inventivo y aplicación industrial establecidos en el artículo 32 de la Ley N°19.039.

3.- Que, asimismo, procede rechazar la demanda de oposición de BIOMAR CHILE S.A., atendido que de acuerdo al informe técnico del examinador los documentos fundantes de la oposición, carecen de mérito y no permiten acreditar la falta de claridad, de nivel inventivo y la exclusión de patentabilidad alegada.

4.- Que, se tuvo por evacuado el Informe Técnico del Examinador y se citó a las partes a oír sentencia.

5.- Que, de acuerdo al mérito de los antecedentes, se deja expresa constancia que la solicitud no infringe lo dispuesto en el artículo 38 de la Ley N.º 19.039.

Por las consideraciones antes expuestas, y teniendo presente lo dispuesto en la Ley N.º 19.039, en sus artículos 31, 32, 33, 35, 36 y las disposiciones pertinentes del Reglamento.

RESUELVO:

Rechazar la oposición y conceder la solicitud de patente de invención N.º 20170674, conforme al pliego de reivindicaciones de fecha 9 de noviembre de 2020”.

RECURSO DE APELACIÓN (OPONENTE): 29-10-2021

Respecto a los **antecedentes**, el oponente señala que el examinador interno del INAPI no consideró los documentos D12-D19, ni el documento de Espe et al., (1994) al analizar los requisitos de patentabilidad de la solicitud. El señor Perito consideró que el documento D12 afecta directamente el nivel inventivo de la invención, pero el examinador no lo analizó porque consideró que no se podían aportar nuevos documentos fuera del término probatorio. Se considera que los documentos citados por esta parte debieron ser considerados, ya que fueron debidamente acompañados antes de la citación a oír sentencia. Además, todos los documentos citados que no fueron considerados en el análisis de los requisitos de patentabilidad de la solicitud serán presentados en segunda instancia.

Respecto a la **falta de novedad y nivel inventivo**, al solicitante señala que la solicitud de autos carece de novedad y de nivel inventivo en vista del documento D12 (Hoseini et al.) en combinación con D13 (Sauvant). La reivindicación se refiere a un alimento para peces que contiene sales de sodio, magnesio y calcio, con un modulador del receptor de cationes polivalentes en la forma de triptófano o fenilalanina. El contenido de iones ya ha sido divulgado en otro documento y los expertos sabrían que cualquier sal correspondiente a esas cantidades caería dentro de los rangos de la reivindicación, particularmente en las sales de cloruro. Esto es evidente en la siguiente tabla:

	Cantidad de iones calculada de D12	Intervalo de sal de iones de la reivindicación 1 de autos	¿Descripción implícita del intervalo de sal?
Na ⁺	8,5 g/kg	10-100 g/kg	Sí, no existe una sal de sodio nutricionalmente aceptable que no exceda los 10 g/kg y que permanezca por debajo de 100 g/kg basado en 8,5 g/kg de sodio. NaCl ascendería a 21,6 g/kg.
Mg ²⁺	2,1 g/kg	0,1-100 g/kg	Sí, no existe una sal de magnesio nutricionalmente aceptable que no exceda los 0,1 g/kg y que se mantenga por debajo de 100 g/kg basado en 2,1 g/kg de magnesio. MgCl ₂ ascendería a 8,2 g/kg.
Ca ²⁺	21,1 g/kg	0,1-100 g/kg	Sí, no existe una sal de calcio nutricionalmente aceptable que no supere los 0,1 g/kg y se mantenga por debajo de 100 g/kg en base a 21,1 g/kg de calcio. CaCl ₂ ascendería a 58,4 g/kg.

El documento D13 realiza cálculos de iones de Ca, Mg y Na del alimento D12. D13 enseña tres tipos de harina de pescado con diferentes contenidos de proteína. Los cálculos se refieren a una harina de pescado con un 70% de proteína, que resulta en 21,1 g/kg de Ca^{2+} . Los resultados de las tres comidas están dentro del rango declarado en la reivindicación 1, como se ve en la siguiente tabla:

Harina de pescado	Contenido de Ca^{2+} de la harina en D13	Contenido de Ca^{2+} + calculado en D12
62% de proteína	55,4 ± 11,9	36,8
65% de proteína	38,5 ± 8,2	28,3
70% de proteína	24,1 ± 7,9	21,1

De este modo, D12 probablemente comprende una concentración iones de calcio en el rango de 0,0036 a 36,110 g/kg, según la desviación estándar y la preferencia por harina con alto contenido de proteínas en la alimentación de peces, como se describe en la reivindicación principal.

D12 indica que un alimento para peces aumenta la tolerancia al agua salada en peces carpa mediante la suplementación con triptófano, lo que aumenta el cortisol basal y estimula la $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$. D12 induciría a usar esto en cualquier especie de pez para aumentar su tolerancia al agua salada si se sabe que los niveles basales de cortisol se elevan con dietas suplementadas con triptófano.

La invención supuestamente logra la estimulación de $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$ de manera diferente, pero se puede lograr a través de un alimento como se indica en D12. Además, D12 sugiere que el alimento suplementado con triptófano puede reemplazar la aclimatación gradual a la salinidad, es decir, agregar sal al agua dulce.

El contenido ligeramente más alto de iones de calcio en D12 en comparación con el alimento de la solicitud no tiene un impacto significativo, ya que no hay evidencia que sugiera que un contenido reducido de iones de calcio tenga algún efecto específico.

En consecuencia, de lo anteriormente expuesto, la solicitud carece de novedad y de nivel inventivo, envista de D12 en combinación con D13.

Por otra parte, el documento D5 (Basulto) es uno de los documentos más cercanos a la solicitud actual, pero sin contar con la adición de triptófano o fenilalanina libres al alimento, lo que no tiene ningún efecto demostrado según informes periciales.

Los datos experimentales de una solicitud de autos mostraron que se probaron 3 dietas: "Dieta de prueba 1", "Dieta de prueba 2" y "Dietas de Control". Las dietas de prueba 1 y 2 son casi idénticas, excepto que la dieta de prueba 2 incluye CaCl_2 y MgCl_2 , mientras que la dieta de prueba 1 no lo hace. Por lo tanto, cualquier efecto atribuido a la dieta de prueba 2 no se puede atribuir al L-triptófano agregado en la dieta, ya que ese ingrediente estaba presente en ambas dietas.

El estudio muestra que no hay beneficios técnicos al agregar 2-10 g/kg de PVCs, en forma de triptófano o fenilalanina libre. La siguiente tabla, incluida en la oposición, presenta las cantidades de Na^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} en las dietas estudiadas en D5.

	Na ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺
Dieta A	0	0	0
Dieta B	10,374 g/kg alimento	1,255 g/kg alimento	0,477 g/kg alimento
Dieta C	20,748 g/kg alimento	2,510 g/kg alimento	0,953 g/kg alimento
Dieta D	31,122 g/kg alimento	3,765 g/kg alimento	1,430 g/kg alimento

Así, se ha comprobado que los alimentos estudiados en D5 contienen cantidades de Na⁺, Mg²⁺ y Ca²⁺ dentro de los rangos aceptables. La inclusión de las sales en la solicitud no cambia nada, ya que los iones también se agregan como sales en D5 y están presentes en las cantidades reclamadas.

El oponente también analiza la falta de nivel inventivo en virtud del documento Espe et al, (2014). El documento describe un alimento para salmón atlántico que contiene aminoácidos libres y sales en la alimentación (incluido trp y phe). La reivindicación principal de la solicitud se diferencia en los rangos de cantidades de sales y aminoácidos, pero no se ha demostrado que estos rangos proporcionen efectos diferentes a los de una dieta ya existente. Además, no se ha demostrado ningún efecto sorprendente o ventajoso de la fenilalanina, ya que no fue testeada en los ejemplos de la solicitud. Por lo tanto, la solicitud carece de nivel inventivo en vista del documento Espe.

Finalmente, el oponente hace un análisis del nivel inventivo de la solicitud de autos utilizando en **Método Problema-Solución**. Tras aplicar este método, se concluye que la invención reivindicada está anticipada por el estado del arte y resulta obvia en comparación con el arte previo, tal como se observa a continuación:

a) Determinación del estado de la técnica más cercano: Si bien en el fallo de aceptación se determinó que los documentos D5, D7 y D11 serían los más cercanos del estado de la técnica, se dejaron fuera los documentos D12 y Espe, entre otros, los cuales son de suma relevancia al caso de autos.

b) Establecimiento del problema técnico que se resuelve: El problema técnico que se resuelve mediante la presente invención apunta a proveer un alimento alternativo para peces.

c) Análisis de obviedad de la invención reivindicada: El problema técnico identificado y citado en el párrafo previo puede ser solucionado a partir de los documentos D5, D12 y Espe, además de los documentos D7 y D11.

La pregunta que debe hacerse es: ¿podría un experto haber desarrollado un alimento para peces, teniendo a la vista los documentos D5, D7, D11, D12 y Espe? A juicio del oponente, la solución es obvia a la vista de, al menos, D5, D12 y Espe. La característica distintiva en comparación con D5 es la presencia de triptófano libre o fenilalanina solamente. D5 ya comprende los iones y sales en el alimento, tal como se discutió en los párrafos precedentes. D5 enseña que los aminoácidos libres, y en particular el triptófano, activan el modulador de PVCR, lo que aumenta la actividad de Na⁺/K⁺ ATPasa y la inducción de la smoltificación. D12 también proporciona una motivación adicional para agregar triptófano al alimento para peces y enseña que el triptófano libre aumenta la tolerancia al agua salada. Finalmente, Espe se refiere a un alimento para salmón atlántico que describe las ventajas de proporcionar al salmón pre-smolt aminoácidos libres en la dieta, incluyendo triptófano y fenilalanina, además de comprender

Na, Ca y Mg en el alimento. En conclusión, se ha demostrado que la presente solicitud carece de nivel inventivo frente al estado de la técnica, tanto por los argumentos expuestos en los párrafos previos, como empleando el Método Problema-Solución sugerido por el INAPI.

TÉNGASE PRESENTE DEL Oponente: 21-04-2022

Acompaña un informe emitido por el instituto de investigación noruego Nofima, titulado “*Optimised growth study, Feeding trial with Atlantic salmon (Salmo salar)*”, el cual fue emitido con fecha 8 de diciembre de 2021 (más de un mes después de la presentación de la apelación de autos, por lo que no pudo ser presentado con anterioridad en el expediente).

El informe se refiere a un ensayo realizado para establecer, entre otras cosas, si existe algún efecto del triptófano libre o de la sal de Ca añadida en el alimento sobre la inducción de la esmoltificación en salmónidos.

El informe analiza la composición de cuatro tipos de alimentos para peces, un alimento con cloruro de sodio añadido (60 g/kg) (mNa), un alimento con sal de cloruro de sodio añadido (60 g/kg) y triptófano (3 g/kg) (NaTr), y un alimento con sal de cloruro de sodio (60 g/kg) y cloruro de calcio (5 g/kg) añadidos. Los ensayos se realizaron en agua dulce y luego se transfirieron a agua de mar, sin manipulación de luz para inducir la esmoltificación. La tabla 6 muestra las composiciones de los alimentos, mientras que las tablas 8 y 9 detallan los contenidos de iones y triptófano medidos.

De los resultados se observa que los tres alimentos de prueba no tienen un efecto significativo en el índice de smolt en comparación con el alimento de control, excepto para el período FW4, en el cual el alimento que contiene solo cloruro de sodio (mNa) tiene un índice de smolt más alto que el alimento con triptófano.

El estudio midió la esmoltificación a través de la expresión génica de Na-K ATPasa y encontró que, aunque los tres alimentos de prueba tuvieron algún efecto en la fase de agua dulce, no hubo una diferencia significativa entre el alimento de NaCl (MNa) y el alimento de triptófano (NaTr). Incluso los efectos del triptófano dietético fueron menores. En resumen, no se ha encontrado que el triptófano tenga un efecto significativo en la dieta, según informes posteriores.

Además, la adición de sal de Ca no afecta la esmoltificación en salmónidos, según los resultados enseñados.

Los alimentos de prueba tuvieron mejores niveles de expresión génica que el alimento de control, pero el alimento con calcio añadido solo tuvo un efecto menor en comparación con el alimento de prueba de NaCl en algunas muestras de agua dulce. En muestras de agua salada, estas diferencias desaparecieron con la variación individual.

En conclusión, no se encontró un efecto del calcio añadido en el alimento para peces, incluso a niveles bajos de adición. La adición de triptófano libre o sal de calcio tampoco produce efectos sorprendentes o novedosos.

SOLICITANTE ACOMPAÑA NUEVO PR: 21-04-2022

El solicitante acompaña un nuevo pliego compuesto por cinco reivindicaciones. Se diferencia del pliego que fue concedido por INAPI en que en la R1 se cambió “Un alimento para peces”, por “Un alimento

adecuado para salmonidae”, y se eliminó a la fenilalanina como receptor de cationes polivalente. También se eliminaron las reivindicaciones 2, 7 y 8, estas dos últimas relacionadas con la preparación de un medicamento.

TÉNGASE PRESENTE DEL Oponente: 29-03-2023

El oponente adjunta una declaración de don Greg Deacon, quien trabajó como nutricionista en Skretting (antes llamado Moore-Clark) entre los años 1990 y 2007, y luego como nutricionista senior part-time para Skretting. Dicha declaración complementa el contenido del documento identificado como D2 en autos, de modo que D2 divulga un alimento que comprende cada uno de los componentes del alimento descrito en la reivindicación principal de autos.

D2 menciona, en su tabla 19 un alimento que comprende sales de sodio, sales de magnesio y triptófanos libres. Si bien no menciona un contenido de calcio, sí señala que los alimentos de la tabla 19 se basan en una “dieta estándar para salmónidos de agua dulce de Moore Clark”.

Don Greg Deacon, en su declaración, confirma que todos los alimentos de Moore-Clark que podrían incluirse dentro de una “dieta estándar para salmónidos de agua dulce de Moore-Clark” de la tabla 19 de D2 comprenderían calcio en una cantidad aproximada de 2,4% (o 24 g/kg), lo cual se encuentra dentro del rango de 0,036-36,011 g/kg reivindicado en autos.

En dicha declaración se adjunta un folleto del alimento “Moore-Clark’s Select 6 + 6 Freshwater Extruded Smolt Feed”, que coincide con el alimento descrito como “dieta estándar para salmónidos de agua dulce de Moore Clark” de la tabla 19 de D2. Por lo tanto, la presente solicitud carece de novedad y de nivel inventivo en vista de D2, complementado con la declaración de Deacon.

TÉNGASE PRESENTE DEL Solicitante: 03-04-2023

El solicitante contesta en primer lugar los ***Comentarios en relación al documento D12 (Hoseini) en combinación con el documento D13 (Sauvant)***. Señala que el documento D12 describe un ensayo sobre la alimentación con L-triptófano en carpas comunes (pez estenoalino) y no es adecuado para salmónidos (pez anádromo), como se explica en el documento D17. Por lo tanto, el alimento divulgado en D12 no es apto para salmónidos ni para la esmoltificación de sus crías. Además, el oponente no argumentó la falta de novedad en su demanda de oposición, lo que hace que cualquier argumento sobre la supuesta falta de novedad sea extemporáneo. En resumen, se puede afirmar que la reivindicación 1 modificada es novedosa en comparación con D12 y que este documento no afecta el nivel inventivo de la solicitud de patente.

El documento D12 se enfoca en la tolerancia al estrés osmótico en carpas, un pez de agua dulce, y no en los peces salmónidos a los que se dirige la presente invención. La esmoltificación es un proceso exclusivo de los peces salmónidos juveniles, por lo que una persona normalmente versada en el estado de la técnica no buscaría información en un documento sobre osmorregulación en carpas para un alimento que pueda inducir la esmoltificación en Salmonidae.

Para que un documento del estado de la técnica se anticipe a la reivindicación 1, debe divulgar directamente y sin ambigüedades el alimento para Salmonidae según la reivindicación 1. El documento del estado de la técnica D12 no lo hace, ya que no revela el nivel de sales e iones de calcio, sodio, magnesio y cloruro, y el nivel de dichas sales e iones no puede deducirse a partir de la información proporcionada del alimento para peces divulgado en el documento. Además, la tabla 1 de dicho

documento no proporciona información sobre el tipo de harina de pescado utilizado en la preparación del alimento de prueba utilizado en el experimento divulgado. Por tanto, una persona normalmente versada en la materia no habría estado motivado a calcular las cantidades de sales divulgadas en el documento para preparar un alimento para salmónidos como el que se reivindica.

A este respecto, D13 (Sauvant et al., 2004) muestra la composición de diferentes harinas de pescado para piensos en relación al contenido de calcio (g/kg), con desviaciones estándar variables. La harina de pescado 70% tiene la menor cantidad de calcio con 24,1 g/kg y una desviación estándar de 7,9, mientras que la harina de pescado 62% tiene la cantidad más alta con 55,4 g/kg y una desviación estándar de 11,9. El contenido real de magnesio, calcio, sodio y cloruro en el alimento para peces de D12 no puede determinarse sin información sobre el tipo de harina de pescado mencionada en la tabla 1. Además, la falta de información sobre la composición de la mezcla de minerales, sales y vitaminas añadidas al alimento dificulta la comprensión completa de su composición.

En D12 no se especifica qué tipo de harina de pescado se utiliza, por lo que la selección de la harina de pescado del 70% parece ser una especulación para justificar la oposición de autos. Una persona versada en la técnica podría suponer que el alimento para peces en cuestión incluye harina de pescado del 62%, lo que aumentaría el contenido de iones de calcio.

Así, D12 se refiere a experimentos realizados en una especie diferente, el pez carpa, que no es anádromo y permanece en agua dulce durante todo su ciclo vital. Aunque esta especie puede estar expuesta a un aumento de la salinidad del agua, no se considera relevante para la invención reivindicada, que se refiere a la esmoltificación del salmón.

El oponente argumenta que D12 muestra que un alimento dentro del ámbito de la reivindicación 1 induce tolerancia al agua salada en peces carpa y que la suplementación con triptófano aumenta el cortisol basal. Sin embargo, el alimento en D12 no está dentro del ámbito de la reivindicación 1 modificada. El documento Basic (2013) indica que la esmoltificación de los peces coincide con aumentos transitorios de cortisol, lo que puede afectar su bienestar y suprimir su inmunocompetencia, haciéndolos más susceptibles a infecciones o estrés externo. No se sabe si el aumento transitorio de cortisol es un requisito previo para la esmoltificación o una consecuencia de la transformación parr. Por lo tanto, no sería recomendable alimentar a los peces con una dieta que proporcione un aumento de los niveles de cortisol.

Según Lepage (2005), el Triptófano produce diferentes efectos en los peces, aumentando el cortisol en los no estresados y disminuyéndolo en los estresados. No se sabe si un mayor nivel de Triptófano en la dieta beneficiaría la esmoltificación o los peces en general. De este modo, una persona con conocimientos técnicos en el área no podría determinar si una dieta con mayores niveles de triptófano tendría un efecto positivo en la esmoltificación y en la salud de los peces.

Luego, el solicitante responde los **Comentarios en relación al documento D5 (Basulto)**. Si bien el documento D5 tiene más de 30 años, aun así, es relevante como estado de la técnica, pero se debe tener en cuenta que el modelo de estudio y los peces utilizados son diferentes de los de la industria actual. Además, D5 estudió peces salvajes, que son más propensos al estrés y tienen una genética diferente a los peces utilizados en la acuicultura actual. Por lo tanto, D5 no puede ser considerado como el estado de la técnica más cercano y no enseña cómo los peces pueden ser esmoltificados mediante la alimentación con sal.

El estudio indica que el aumento de la sal inorgánica en la dieta podría aumentar la supervivencia en la transición del agua dulce al agua de mar. Sin embargo, el estudio tiene limitaciones, como el alcance estadístico insuficiente y la disminución del aumento de peso asociado con la alimentación salina. Se sugiere acortar el periodo de tratamiento. El estudio muestra que reducir el tratamiento a un mes demuestra que la mejor supervivencia se logra sin añadir sal a la dieta de los peces, según los datos de la tabla 6. Se realizaron dos estudios en 1974 y 1975, y los resultados de la prueba de tolerancia al agua salada del estudio de 1975 se presentan en las tablas 5 y 6 en la página 52 de D5. En el estudio experimental de 1975, crías de salmón de 2 años fueron alimentadas con diferentes dietas durante periodos similares antes de ser transferidas al agua de mar en diferentes momentos. Un total de 97 peces fueron utilizados en el estudio divididos en tres grupos.

Los peces no se esmoltificaron en abril, sino en mayo, ya que todos los grupos experimentaron un aumento en la supervivencia, independientemente del alimento suministrado. Esto indica que los peces recibieron una señal de esmoltificación diferente a la del alimento. La supervivencia de los peces expuestos al agua de mar y alimentados con sal durante un mes fue solo del 40%, lo que no es aceptable.

La invención actual tiene como objetivo la esmoltificación de los peces mediante el uso de alimento para tratar o prevenir el síndrome hemorrágico del smolt. Esto difiere del objetivo de la referencia D5, que busca facilitar la transición del agua dulce al agua salada para los peces expuestos a una señal natural de esmoltificación. Las autoridades requieren que los documentos de arte previo se refieran al mismo problema de técnica que la solicitud correspondiente para interferir con la solicitud.

En el estudio D5 se investigó si la alimentación con sal facilitarían la transición de agua dulce a agua de mar en peces expuestos a señales naturales de smolt, concluyendo que fue una señal natural de smolt la que indujo la metamorfosis, no el alimento.

El solicitante señala que D5 cuestiona la efectividad de la alimentación con sal para mejorar la supervivencia en la industria acuícola, debido a los resultados variables y la reducción del crecimiento y conversión alimenticia. Se concluye que se necesita más investigación para comprender mejor los efectos de la alimentación con sal. En contraste, los resultados de las pruebas de campo de la presente patente muestran una mejora en la esmoltificación con el alimento adecuado para salmonidae, en comparación con lo logrado en Basulto. Se afirma que los peces en Basulto esmoltifican, pero no debido al alimento.

D5 muestra que el aumento de sal en la alimentación de ciertas especies acuáticas reduce el crecimiento y la eficiencia alimentaria. Aunque se sugiere reducir el período de tratamiento para mejorar el crecimiento, esto también disminuye la supervivencia. En conclusión, un documento sobre un alimento con alto contenido de sal no afecta el nivel inventivo de una solicitud de patente.

Respecto a los ***Comentarios del documento Espe et al., (2014)***, señala que este documento investigó la posibilidad de reemplazar las fuentes de proteínas intactas con mezclas de aminoácidos libres para la síntesis de proteínas musculares en el salmón del Atlántico. La reivindicación 1 de las reivindicaciones concedidas establece que el alimento para salmones debe contener 2-10 g/kg en peso de un modulador del receptor de cationes polivalentes (PVCR) en la forma de triptófano, el cual está presente en la forma de aminoácidos libres. La reivindicación no está anticipada por Espe 1994 debido a la cantidad de triptófano presente en el alimento divulgado en ese estudio es de 1,74 g/kg. Además, Espe 1994 no está relacionado con la esmoltificación de salmónidos y, por lo tanto, no es relevante con

respecto a la actividad inventiva. Por otra parte, la solicitud también demuestra el efecto ventajoso del triptófano en la actividad de la ATPasa Na^+/K^+ de las branquias, según los ejemplos presentados.

Finalmente, el solicitante analiza el **Método Problema-Solución** presentado por el oponente. El estado de la técnica más cercano es aquel con características técnicas similares a la invención reivindicada. Debe estar dirigido a un mismo objetivo o efecto similar al de la invención o pertenecer al mismo campo técnico o uno relacionado. Los documentos que no tienen la misma finalidad no pueden considerarse el estado de la técnica más cercano. El oponente indica que no sólo D5, D7 y D11, sino también D12 y Espe-1994 pueden representar el estado de la técnica más cercano. El solicitante discrepa a este respecto.

El documento D5 es antiguo y menos relevante en la actualidad para la producción de smolt de agua salada. Los ensayos en D5 se realizaron con peces silvestres, que son más propensos a sufrir estrés, lo que podría explicar las altas tasas de mortalidad y aumentar el escepticismo sobre los resultados.

Una persona experta en la materia podría no dar mucha importancia a los experimentos reportados en D5 debido a que los resultados de la adición de sales al agua son contradictorios. La tabla VI muestra una tendencia similar a la tabla V, con un aumento en la supervivencia en mayo y una mejora en junio. Sin embargo, el grupo de control sin sal muestra un mejor rendimiento en términos de supervivencia, crecimiento y eficiencia alimentaria. En conclusión, D5 no es el mejor respaldo para el alimento reivindicado.

El documento D7 presenta una hoja de datos de productos del productor Skretting con información limitada sobre la prueba de un alimento para peces con sal añadida y una tasa de mortalidad reducida. Sin embargo, no se proporciona información adicional, como la cantidad y el tipo de sales utilizadas o los análisis realizados. Es difícil ver cómo este documento podría representar el estado de la técnica más cercano, ya que no proporciona información suficiente para guiar a una persona versada en la materia hacia el alimento reivindicado con una expectativa razonable de éxito.

Por su parte, el documento D12 se refiere a experimentos realizados en una especie diferente (pez carpa) y, por lo tanto, no es relevante para el análisis de nivel inventivo de la solicitud actual.

El documento Espe et al. (1994) investigó si las mezclas de aminoácidos libres podrían reemplazar fuentes de proteínas intactas para la síntesis de proteínas musculares en el salmón del Atlántico, lo que difiere del objetivo de la invención reivindicada. Por lo tanto, este documento no puede considerarse el estado de la técnica más cercano. Si el alimento para peces reivindicado es considerado un mero alimento alternativo, es válido preguntarse si una persona versada en el estado de la técnica habría tenido algún incentivo para añadir triptófano libre.

El mercado de alimentos para peces valora los costos, especialmente de las proteínas y los aminoácidos libres. Por lo tanto, no habría razón para agregar triptófano libre a menos que tenga una ventaja significativa, ya que es un ingrediente costoso. Aunque el triptófano puede proporcionarse en forma polimerizada, agregar triptófano libre solo aumentará los costos. Además, los estudios de Lepage (2002 y 2005) muestran que la adición de triptófano en la dieta de la trucha arcoíris aumenta los niveles basales de cortisol de los peces no estresados, lo que sugiere que no hay incentivo para agregar triptófano a la dieta de los peces.

Según el estudio Basic (2013), se sabe que el cortisol suprime la inmunocompetencia en los peces, lo que los hace más susceptibles a las infecciones. Aunque algunos peces pueden tener una respuesta positiva al Triptófano, no hay incentivo para agregarlo al alimento de salmonidae debido a los posibles efectos negativos relacionados con las infecciones.

El Estudio NOFIMA-2021 fue discutido en procedimientos judiciales en Noruega y presentado como prueba en un caso europeo pendiente ante las salas de apelación. Jesse Trushenski y Richard Torrison testificaron y comentaron sobre el diseño y los resultados del estudio durante el proceso judicial en Noruega. Se adjunta una Declaración de Jesse Trushenski incluyendo sus comentarios (página 10 a 12 del informe) con respecto al diseño del estudio y los resultados presentados en Estudio NOFIMA-2021.

Se destacan varios problemas con el diseño experimental presentado en el Estudio NOFIMA-2021, siendo el principal que los peces ya estaban esmoltificando al inicio del experimento. Por lo tanto, no se pueden extraer conclusiones significativas de los resultados comunicados en el mismo. Esto ha sido confirmado por Jesse Trushenski y Richard Torrison en sus respectivas declaraciones. El experimento no pretendía inducir la esmoltificación en el salmón atlántico, sino estudiar el crecimiento y mantener el estado de esmoltificación en agua dulce con diferentes dietas de prueba para luego comparar el crecimiento tras la transferencia al mar entre los diferentes grupos de tratamiento.

Además, en la página 35, segundo párrafo de la decisión de los tribunales de Noruega se afirma que: “El Tribunal de Apelación considera que dos de los experimentos realizados por Biomar en 2016 (experimento Sterling) y 2021 (Nofima) no dan pie a una evaluación diferente de los requisitos de efecto técnico. Que la esmoltificación también pueda lograrse con una composición diferente, por ejemplo, utilizando aminoácidos distintos del triptófano libre, no significa que el PE'290 carezca de efecto técnico”. También confirma también que no se puede llegar a ninguna conclusión sobre el efecto de la dieta de prueba en la esmoltificación sobre la base de los resultados presentados en Estudio NOFIMA-2021.

Finalmente, se presenta un ensayo realizado por el solicitante en noviembre de 2021 en la Cuarta Declaración del Dr. William Harris, en el que se evalúa la fase de agua dulce en la esmoltificación del salmón atlántico con varios alimentos experimentales, incluyendo triptófano libre. Los resultados sugieren que el triptófano tiene un efecto sorprendente en el desarrollo de la hipoosmorregulación en el salmón del Atlántico. Los detalles del ensayo y los alimentos analizados se encuentran en la sección 5 de la declaración.

Como información adicional, el solicitante señala que el 21 de febrero de 2020, el Tribunal de la ciudad de Oslo confirmó la validez de la patente NO/EP3197290B1 referente a un alimento para peces enriquecido con sodio, calcio, magnesio y triptófano libre bajo luz constante. El tribunal consideró que la invención no carece de actividad inventiva y concluyó que las reivindicaciones no son obvias. También se adjunta la decisión del Comité de Apelación del Tribunal Supremo de Noruega del 12 de julio de 2022 y su traducción.

TÉNGASE PRESENTE DEL Oponente: 26-04-2023

(I) Falta del examinador interno del INAPI

En primer lugar, el oponente discute la falta de consideración de documentos presentados por una parte en la solicitud de un privilegio por parte del examinador interno del INAPI. Aunque la Ley de

Propiedad Industrial no indica normas claras sobre la presentación de pruebas fuera del término probatorio, se entiende que si se presentan antes de la citación a oír sentencia, son oportunamente presentados. Además, la ley permite que las partes formulen observaciones a los informes periciales y los sustenten con documentos. En este caso, el examinador interno del INAPI no consideró documentos relevantes presentados por la parte (D5 y D12), lo que llevó a una conclusión errónea y a la concesión errónea de la solicitud.

(II) D12 (Hoseini) en combinación con D13 (Sauvant)

La solicitud de patente se refiere a un alimento para salmónidos que contiene sales de sodio, sales de magnesio, sales de calcio y triptófano en la forma de aminoácidos libres. El solicitante sostiene que el documento D12 no es relevante para el caso, ya que se refiere a un alimento para peces, específicamente carpas, y no describe un alimento adecuado para salmónidos. Sin embargo, la contraparte argumenta que el documento D12 anticipa los contenidos de iones de sales de sodio, sales de magnesio, sales de calcio y triptófano en la forma de aminoácidos libres descritos en la solicitud de patente. Además, el documento D13 ilustra tres tipos de harina de pescado con diferentes contenidos de proteína que anticipan una cantidad de calcio dentro del rango declarado en la reivindicación principal de la solicitud de patente. Por lo tanto, la solicitud de patente carece de novedad y nivel inventivo en vista de D12 en combinación con D13.

(III) D5 (Basulto)

El documento D5 afecta los requisitos de patentabilidad de la presente solicitud, ya que aborda el mismo problema técnico que la presente solicitud, que es mejorar la tolerancia al agua salada del salmón parr al inducir la metamorfosis de parr a smolt en agua dulce. El documento D5 muestra una mayor tolerancia al agua salada en salmones alimentados con una dieta enriquecida en sal. El solicitante planteó una serie de argumentos para desestimar el documento D5, pero dichos argumentos pueden descartarse en virtud de los siguientes argumentos:

1. El solicitante afirmó que D5 utiliza "fotomanipulación" en lugar de alimentos enriquecidos con sal para inducir la esmoltificación, lo cual es incorrecto. El término "fotomanipulación" es poco común y confuso en la literatura sobre esmoltificación. Durante la transformación parr-smolt, los salmones juveniles necesitan señales ambientales, conocidas como "zeitgebers", para completar el proceso. El fotoperíodo, que es la duración del día, es el principal regulador a largo plazo y es necesario para sincronizar la transformación. Si el salmón juvenil se cría sin un cambio en la duración del día, el sistema endocrino no se activa y la transformación se ve comprometida. Esto resulta en un desarrollo deficiente de la Na-K-ATPasa branquial, lo que reduce la capacidad de regular los iones de plasma y el crecimiento en el agua de mar. D5 no utiliza un régimen lumínico con secuencias cortas y largas de luz para evitar la esmoltificación y evaluar la tolerancia al agua salada sin otras señales ambientales. En su lugar, aplican un fotoperíodo constante de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad para evaluar los efectos de la alimentación de prueba. D5 muestra que la adición de sales en el alimento estimula la tolerancia a la salinidad típica de la transformación parr-smolt.
2. El solicitante argumentó incorrectamente que D5 no se ocupa de la esmoltificación. El título de D5 se refiere específicamente a la esmoltificación y la tolerancia al agua salada en relación con las sales inorgánicas, lo que demuestra que están relacionados.
3. El solicitante argumentó que los resultados sobre la tolerancia al agua salada de D5 son cuestionables, pero los resultados son claros y muestran una mayor supervivencia en salmones

alimentados con una dieta enriquecida en sal y transferidos al agua de mar después de la alimentación.

Por lo tanto, D5 es similar a la invención reivindicada, con cambios estructurales mínimos para alcanzar los mismos resultados.

Por ejemplo, el texto describe la dieta B de D5, un alimento para peces que contiene proteínas, grasas, carbohidratos, vitaminas y minerales. Se menciona que la cantidad de iones de sodio, magnesio y calcio en la dieta se puede calcular según lo dispuesto en la página 47 de D5. Los cálculos muestran que la dieta B cumple con los rangos reivindicados en la cláusula principal. Se indica que las cantidades reales pueden ser ligeramente más altas debido a la sal natural en el alimento en polvo, pero aún dentro de los rangos reivindicados.

El oponente discute la efectividad de agregar triptófano al alimento para la esmoltificación en salmónidos. La adición de triptófano no muestra efectos sorprendentes según la evidencia experimental, y el informe de Nofima concluye que el triptófano libre tiene poco o ningún efecto en la inducción de la esmoltificación en salmónidos. El informe examina el efecto de diferentes dietas en la esmoltificación de peces. Las dietas incluyen cloruro de sodio añadido, triptófano, y cloruro de calcio. Los ensayos se realizaron en agua dulce y se midió el índice de smolt y la expresión de ATPasa Na-K. Los resultados se proporcionan en la tabla 10.

Según el informe de Nofima, no se encontró un efecto significativo en el índice de smolt en las tres dietas de prueba en comparación con la dieta de control, excepto para el período FW4. Además, la dieta con triptófano tuvo un índice de smolt más bajo que la dieta con cloruro de sodio. Los resultados de la medición de la esmoltificación mediante la expresión génica de Na-K ATPasas también fueron similares. En resumen, no se pudo establecer ningún efecto del triptófano de forma aislada o en comparación con D5. Se concluye que D5 es un documento relevante del estado del arte, ya que aborda el mismo problema técnico y solo requiere mínimas modificaciones para alcanzar el alimento reivindicado en autos.

(IV) D2 (WO 02/301182)

El documento D2 estudia alimentos para peces que incluyen NaCl y triptófano libre, y un alimento al que se agrega MgCl₂. La diferencia con la reivindicación 1 es la presencia de cationes divalentes de Mg y Ca en cantidades específicas. Las dietas de la presente solicitud se describen en la página 18, siendo la "dieta de prueba 2" la única según la invención.

En primer lugar, no se ha demostrado el efecto de añadir iones de Ca y los datos presentados son insuficientes para respaldar cualquier efecto de los iones de Mg y Ca. Los estudios presentados no comparan la dieta de prueba 1 con la dieta de prueba 2 en el mismo experimento y cualquier efecto de agregar MgCl₂ y/o CaCl₂ a la alimentación de D2 no puede ser sustentado en la solicitud presentada.

En segundo lugar, la solicitud presentada solo prueba un alimento para peces con la adición de ciertas sales y aminoácidos. La única dieta descrita en la solicitud comprende sales en cantidades mayores a las reivindicadas, lo que pone en duda la efectividad de las cantidades mínimas reivindicadas en la cláusula principal.

Los rangos de activadores y desactivadores de PVCR en la invención no concuerdan con los amplios rangos de sales y aminoácidos descritos en las reivindicaciones, que permiten combinaciones en

cualquier proporción, incluso grandes excesos de Na⁺. En la "dieta de prueba 2", la relación entre desactivadores y activadores de PVCR es de 6:1,4. Esto contrasta con los rangos declarados en la cláusula principal, que permiten una relación de hasta 100:2,2, lo que no parece plausible para activar PVCR o esmoltificación.

El solicitante afirma que su solución de aportar sales a través del alimento es más económica y menos laboriosa que hacerlo a través del agua. Sin embargo, esta afirmación es incorrecta ya que ninguna reivindicación excluye la adición de iones de Ca y Mg al agua. Además, esta solución solo sería válida si se mantienen o mejoran la esmoltificación, la supervivencia y el crecimiento de los peces. No hay pruebas de que esto suceda ya que no se han comparado los alimentos del documento D2 y de la presente invención en el mismo ensayo para probar las mejoras alegadas.

El índice de smolt no varió entre los diferentes grupos de alimentos, excepto para los peces alimentados con sal pura que tuvieron un índice de smolt más alto que los alimentados con una combinación de sodio y calcio. Todos los alimentos de prueba funcionaron mejor que el control en términos de niveles de expresión génica, pero el alimento que contenía calcio solo tuvo un efecto menor en comparación con el alimento de prueba de sal y solo en algunos muestreos en agua dulce. Estas diferencias se eliminaron por completo en los muestreos de agua salada debido a la variación individual. Los alimentos de prueba afectaron los marcadores genéticos de esmoltificación clave en agua dulce, pero esta diferencia se eliminó en el grupo retrasado.

En conclusión, el calcio añadido no tiene efectos significativos y no se puede atribuir a los rangos de calcio declarados. Un estudio muestra que la adición de 5 g/kg de cloruro de calcio no induce significativamente la esmoltificación en comparación con un alimento suplementado con NaCl correspondiente. Por lo tanto, tampoco tendría efectos significativos un alimento con solo 0,1 g/kg de sal de calcio añadida.

El alimento para peces reivindicado en el documento D2 sugiere agregar cationes divalentes como Mg o Ca al agua o al alimento para modular la PVCR. El "agente que es suficiente para contribuir a un nivel significativamente mayor de moduladores de PVCR en suero de pescado" es preferentemente NaCl. La sugerencia de agregar cationes divalentes a la alimentación también se encuentra en la sección de ejemplo del documento D2.

La Tabla 19 de la página 120 muestra que los peces que consumen Ca y Mg se adaptan mejor al agua salada. La entrada 6, que incluye MgCl₂, es la alimentación más efectiva. Por lo tanto, la solución al problema técnico en cuestión es obvia según el conocimiento general y no requiere de inventiva.

(V) D2 (WO 02/301182) en combinación con D5 (Basulto)

Además, el experto podría combinar la información de D2 y D5 para abordar el mismo problema y enseñar que la adición de iones de Ca y Mg es beneficiosa para la supervivencia de los smolts. La "sal" añadida en D5 es un suplemento mineral "oceánico instantáneo" que proporciona alimentos de prueba con iones de Na, Mg y Ca. También se establece en D5 que las dietas enriquecidas con sal pueden reemplazar efectivamente la adaptación que se produce cuando los peces están sujetos a una salinidad creciente en el agua en la que nadan y beben. Se propone adaptar las divulgaciones de D2 para alcanzar la materia reivindicada en la cláusula principal de autos, lo que sugiere que la invención es obvia a partir de D2 en combinación con D5.

(VI) D2 (WO 02/301182) en combinación con la Declaración de Deacon

El oponente señala que el documento D2 incluye un alimento que cumple con las características de la reivindicación 1, excepto por la presencia de iones de calcio. La dieta utilizada para crear este alimento en D2 incluye 2,4% de iones de calcio, según se confirma en la Declaración de Deacon. Por lo tanto, el alimento de autos estaría anticipado por D2.

(VII) Espe et al., 2014

El oponente señala que este documento describe las ventajas de proporcionar aminoácidos libres en la dieta del salmón atlántico, incluyendo triptófano, y comprender sodio, calcio y magnesio en la alimentación. La única diferencia con la solicitud actual es el rango de las cantidades de sales y triptófano libre. No hay evidencia que los rangos citados en la solicitud proporcionen efectos adicionales. Por lo tanto, la solicitud carece de originalidad en comparación con el documento Espe.

(VIII) Decisiones en el caso europeo NO/EP3197290B1

Finalmente, el oponente indica que la decisión tomada en Noruega no se aplica directamente a la práctica chilena, ya que se basó en reivindicaciones diferentes a las pendientes en Chile. La reivindicación confirmada en Europa y Noruega se limita a un alimento para inducir la esmoltificación en salmónidos, lo cual es más estrecho que la cláusula principal de la solicitud chilena. Además, en Noruega se requieren iones agregados como sales, mientras que en Chile no se especifica el origen de los iones. La decisión noruega no puede aplicarse directamente al caso chileno y aún está pendiente el resultado del procedimiento de apelación en la EPO.

MEDIDA PARA MEJOR RESOLVER: 04-04-2023

V.- Pliego de Reivindicaciones

Se considerará el último pliego de reivindicaciones válidamente presentado al TDPI, el 22-03-2023.

1. Un alimento adecuado para salmonidae que comprende proteína, grasa, carbohidratos, vitaminas, minerales y agua, CARACTERIZADO porque el alimento adecuado para salmonidae además comprende de 10-100 g/kg en peso de sales de sodio (Na^+), de 0,1-100 g/kg en peso de sales de magnesio (Mg^+), y 0,1-100 g/kg en peso de sales de calcio (Ca^{2+}), donde el alimento para peces comprende de 3,934 – 39,340 g/kg en peso de Na^+ , de 2-10 g/kg en peso de un modulador del receptor de cationes polivalentes (PVCR) en la forma de triptófano, de 0,026 – 25,530 g/kg en peso de Mg^{2+} , y de 0,036 – 36,110 g/kg en peso de Ca^{2+} , de 6,202 – 199,020 g/kg en peso de Cl^- , en donde el modulador del receptor de cationes polivalentes está en la forma de aminoácidos libres.
2. El alimento para peces de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque las sales de sodio son NaCl .
3. El alimento para peces de acuerdo con la reivindicación 2, CARACTERIZADO porque las sales de magnesio son MgCl_2 .
4. El alimento para peces de acuerdo con la reivindicación 2, CARACTERIZADO porque las sales de calcio son CaCl_2 .

5. El alimento para peces de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, CARACTERIZADO porque comprende 6% en peso de NaCl, 0,75% en peso de CaCl₂, 0,25% en peso de MgCl₂ y 0,4% en peso de L-triptófano.

VI.- Requerimiento del Tribunal de Propiedad Industrial

- 1. Ilustrar al Tribunal sobre las características esenciales de la patente objeto de la solicitud de autos, considerando siempre el último pliego de reivindicaciones válidamente presentado en autos. Analizar si dicho pliego constituye una ampliación del contenido original y de los pliegos presentados con posterioridad, especialmente el pliego analizado por el resolutor de primer grado y si éste se encuentra debidamente sustentado en la memoria descriptiva. Desde los antecedentes que existen en la Memoria Descriptiva, determinar cuál era el problema técnico que se buscaba resolver.***

R.- Desde los antecedentes que existen en la memoria descriptiva, se tiene que el problema técnico que se buscaba resolver era proveer un alimento para peces y un método que elimina o reduce las desventajas del método de esmoltificación de peces SuperSmolt®, permitiendo mantener a los salmones en agua dulce por más tiempo, sin que estos se desesmoltifiquen, mueran, reduzcan su tasa de crecimiento, pierdan escamas o padezcan del síndrome hemorrágico de smolt.

El pliego que fue aceptado a registro por INAPI, de fecha 09-11-2020, está compuesto por 8 cláusulas, donde la R1 enseña un alimento para peces que comprende proteína, grasa, carbohidratos, vitaminas, minerales y agua, y además contiene de 10-100 g/kg en peso de sales de sodio (Na⁺), de 0,1-100 g/kg en peso de sales de magnesio (Mg²⁺), y 0,1-100 g/kg en peso de sales de calcio (Ca²⁺), y, en forma más específica, contiene 3,934– 39,340 g/kg en peso de Na⁺, de 2-10 g/kg en peso de un modulador del receptor de cationes polivalentes (PVCR) en la forma de triptófano o fenilalanina (en forma de aminoácidos libres), de 0,026 – 25,530 g/kg en peso de Mg²⁺, y de 0,036 – 36,110 g/kg en peso de Ca²⁺, de 6,202 – 199,020 g/kg en peso de Cl⁻. Las cláusulas 2-6 son especificaciones de este alimento, y las cláusulas 7 y 8 hacen referencia a la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención del síndrome hemorrágico de smolt en salmonidae.

Con fecha 22-03-2023, el solicitante adjunta un nuevo pliego, compuesto por 5 reivindicaciones, el cual básicamente consiste en una limitación del pliego otorgado por INAPI, y donde se ha eliminado toda referencia a medicamento para el síndrome hemorrágico de smolt, por lo tanto la invención queda reducida solo a un alimento adecuado para salmonidae. Además, se ha restringido el modulador del receptor de cationes polivalentes solo a triptófano. Este será el pliego analizado en el presente informe pericial.

En virtud de lo anteriormente expuesto, el último pliego válidamente presentado por el solicitante no presenta ampliación de contenidos respecto al pliego concedido por INAPI, ni respecto al pliego de la solicitud original, compuesto por 23 cláusulas. Sin embargo, la solicitud presenta problemas de suficiencia técnica ya que no indica claramente en su pliego de reivindicaciones la composición precisa de las fuentes de proteínas, carbohidratos, grasas, vitaminas y minerales. Esto tendrá consecuencias en los análisis que se realizarán a continuación en el presente informe pericial.

- 2. Ilustrar al Tribunal sobre cuáles son las características especiales -en el evento de tenerlas- que posee la invención presentada a patentamiento respecto del estado del arte conocido, especialmente de los documentos D11, D12, D13, D5, D7, D2 y declaración documento Deacon.***

R.- El documento **D2 (WO 02/30182)** protege un método para mejorar la cría de peces anádromos preadultos (salmones, los cuales se mantienen en agua dulce antes de transferirlos al agua de mar) que comprende: a) agregar al menos un modulador del receptor de detección de cationes polivalente (PVCR, los modulares son calcio 2-10 mM y magnesio 0,5-10 mM) al agua dulce en un cantidad suficiente para modular la expresión y/o sensibilidad de al menos un PVCR; y b) agregar alimento para el consumo de pescado al agua dulce, y que contiene un agente (NaCl al menos 1% en peso) que contribuye a un nivel significativamente mayor de dicho modulador PVCR en el suero del pez anádromo preadulto (reivindicaciones 1-5). En términos de reivindicaciones, D12 se diferencia de la solicitud en que los cationes Ca y Mg son agregados al agua donde se mantienen los peces, mientras que en la solicitud se agregan al alimento. Sin embargo, analizaremos este punto en profundidad en las preguntas 6 y 7.

El documento **D5 (Basulto)** describe la alimentación de salmones del Atlántico con cuatro dietas diferentes (AD) para estudiar la tolerancia al agua salada. Se describe una mezcla de sales compuesta por NaCl 65,2%, MgSO₄ 16,3%, MgCl₂ 12,8%, CaCl₂ 3,3%, KCl 1,7% y NaHCO₃ 0,5% como suplemento mineral. Las dietas incluyen proteínas, grasas, carbohidratos, vitaminas, minerales y agua. D5 no informa sobre concentraciones de aminoácidos en el alimento tales como triptófano o fenilalanina, lo que lo diferencia respecto de la presente solicitud.

El documento **D7** es un catálogo comercial **que** enseña un alimento llamado “React Ionic”. Al respecto, señala que en algunas instalaciones de producción de smolts no es posible ni deseable utilizar agua de mar. Sin embargo, en las instalaciones que utilizan exclusivamente agua dulce, la enfermedad del síndrome hemorrágico del smolt (HSS) es un problema frecuente que se caracteriza por anemia y hemorragias extensas en varios órganos. Una de las hipótesis sobre la enfermedad es que aparece en instalaciones con agua poco ionizada. Para ello, Skretting ha desarrollado un pienso con sal añadida, el cual también ha mostrado un efecto positivo en el uso preventivo. Dado que el documento no aporta información respecto a la composición de este alimento, no coincide en nada conocido con la presente solicitud.

El documento **D11** es un artículo que enseña que truchas arco iris con un peso corporal inicial de 1144 g fueron alimentadas con dos dietas de alta (alimento A) o baja (alimento B) estabilidad del agua durante 6 semanas. Durante las 2 últimas semanas se introdujeron valores estables o fluctuantes de saturación de oxígeno, salinidad y temperatura. La alta estabilidad del agua del pienso se asoció con gránulos más duros, menos formación de polvo y menos gránulos rotos en comparación con el pienso con baja estabilidad del agua. Durante las primeras 4 semanas, la ingesta de alimento fue un 23% mayor en las truchas alimentadas con la dieta B que en las alimentadas con la dieta A. La fluctuación del medio ambiente provocó una fuerte caída de la ingesta de alimento en ambos grupos dietéticos. Al final del ensayo, los estómagos de las truchas alimentadas con la dieta B contenían pellets triturados y agua y aceite libres. Los estómagos de las truchas alimentadas con el pienso A contenían más pellets intactos y poco líquido. La digestibilidad aparente de la proteína, el almidón, la materia seca y la energía fue mayor en el pienso A. La digestibilidad aparente del P y el Zn fue mayor en ambiente estable, y la absorción de P fue mayor a partir del pienso A. En conclusión, la calidad física afectó al valor nutricional de los piensos, y las diferencias en el valor nutricional en ambiente estable o fluctuante parecían estar relacionadas con la ingesta de pienso.

En su tabla 1 se proporciona una descripción detallada de dos composiciones alimenticias para peces que contienen distintas fuentes nutritivas, harina de pescado, harina de alubias o de trigo, y en su

tabla 2 se indica la composición en lípidos, azúcares, proteínas, y varios nutrientes esenciales, como Ca (19.435 y 20.958 mg/kg), Mg (2.076 y 2.180 mg/kg), Na (5.160 y 5.602 mg/kg), y aminoácidos (Trp 3,5, y 3,6 g/kg). Al respecto, se puede observar que la composición de las dietas de D11 coinciden con la reivindicada en la solicitud de autos, considerando los valores de los cationes y Trp, así como el hecho de que la composición de las fuentes nutritivas en la solicitud son vagas, por lo que cualquier alimento coincidirá en este aspecto. D11 se diferencia de la solicitud en su objetivo, esto es, estudiar el valor nutricional de los piensos y sus diferencias en ambientes estables o fluctuantes.

El documento **D12 (Hoseini)** es un artículo científico que estudia el efecto del triptófano dietético sobre la tolerancia al estrés osmótico en peces juveniles de carpa común (*Cyprinus carpio*). Los peces fueron alimentados con dos tipos de dieta (control: 0,1% de triptófano y TRP: 0,6% de triptófano) durante 15 días. A continuación, ambos grupos fueron sometidos directamente a un estrés osmótico (de 0 a 10 ppt) durante 168 h. Se tomaron muestras de sangre a las -240, 0, 6, 24, 72 y 168 h después del estrés. Se midieron la supervivencia y los niveles séricos de cortisol, glucosa, sodio y cloruro para determinar la respuesta al estrés y el estado de osmorregulación. Los resultados indican que la suplementación con triptófano mejora la tolerancia de la carpa al agua salada, lo que se debe al aumento del cortisol basal y al efecto antiestrés del triptófano y, posiblemente, al aumento de la actividad serotoninérgica.

En su Tabla 1, el documento D12 enseña los ingredientes de la dieta, entre los que destacan harina de pescado (50%) y harina de soya (16%). También se especifica el porcentaje de proteínas, lípidos, y carbohidratos crudos, cenizas y humedad.

El documento **D13 (Sauvant)** corresponde a un libro que presenta tablas de composición y valor nutricional de alimentos animales. Particularmente, se presentan tablas para harina de pescado y solubles, para cereales, subproductos del trigo, semillas de legumbres y oleaginosas, harina de semillas oleaginosas y otros subproductos animales. Este documento como tal, no enseña la composición reivindicada, pues solo es material de referencia para determinar la composición de distintas materias usadas en alimentación animal. Por tanto, la solicitud presenta novedad respecto a este documento.

El documento **Deacon** es una declaración del Sr. Greg Deacon, nutricionista en Skretting (antes llamado Moore-Clark) entre los años 1990 y 2007, y luego nutricionista senior part-time para Skretting. El testimonio señala que la composición de cualquiera de los alimentos Moore Clark que podrían incluirse dentro de una “dieta estándar para salmónidos de agua dulce de Moore-Clark” de la tabla 19 de D2 comprenderían calcio en una cantidad aproximada de 2,4% (o 24 g/kg), lo cual se encuentra dentro del rango de 0,036-36,011 g/kg reivindicado en autos. A modo de ejemplo, se adjunta la hoja técnica del alimento “Moore-Clark’s Select 6 + 6 Freshwater Extruded Smolt Feed”, y en la cual se comprueba efectivamente este contenido de 2,4% de calcio.

3. Explicar al Tribunal, si los documentos D12 en combinación con D13, anticipan o no las características de la reivindicación 1, y si estos documentos se dirigen o no al mismo problema objetivo de la esmoltificación y al mismo tipo de peces.

R.- En estricto rigor, el análisis del documento D12 en combinación con D13 no permite anticipar las características de la reivindicación 1, particularmente en lo referente a la composición del alimento enseñado. El oponente enseña en su respuesta al informe pericial de fecha 7-2-2020 una planilla de cálculo, donde combina la información nutricional para distintas fuentes de alimento animal de D13 con los ingredientes de la dieta del documento D12 (Tabla 1), obteniendo concentraciones

coincidentes de los distintos iones que caracterizan a la reivindicación 1 de la presente solicitud. Sin embargo, no queda claro cuál es el criterio que utilizo para asignar, por ejemplo, que la harina de pescado utilizada en el cálculo fuera la de 65% y no la de 70 o 62% de proteína, que también son enseñadas en el documento. Sin embargo, en términos de lo reivindicado por la presente solicitud, dado que la composición base que enseña se caracteriza por comprender proteína, grasa, carbohidratos, vitaminas, minerales y agua, eventualmente cualquier fuente de alimento animal que se utilice para formular la invención cumpliría con lo reivindicado, y esto hace, por consecuencia, válidos los cálculos realizados por el oponente, anticipando las características de la presente solicitud.

Respecto al tipo de peces a los que está dirigido particularmente D12 y la presente solicitud (para D13 no corresponde este análisis), se observa que en el documento D12 estudia carpas comunes juveniles (*Cyprinus carpio*), que en términos de tolerancia a la sal son clasificadas como peces estenohalinos (capaces de vivir en un estrecho rango salino), y la solicitud está dirigida a salmónidos (*Salmo* sp., *Onchorhynchus* sp. y *Salvelinus* sp.), que corresponden a peces anádromos, es decir peces que viven en el mar y que remontan los ríos para desovar, y, en consecuencia, los peces jóvenes viven la primera etapa de su vida en condiciones de agua dulce. En este tipo de peces, cuando los individuos jóvenes van a migrar al mar, deben sufrir el proceso fisiológico conocido como esmoltificación, que genera todos los cambios necesarios para la adaptación al nuevo entorno. Por lo tanto, existe diferencia respecto al tipo de peces a los que está dirigido.

Respecto a si el problema objetivo es el mismo, la esmoltificación de los peces, la respuesta no es tan evidente como pareciera por la simple clasificación de los peces recién señalada. Si bien las carpas comunes son estenohalinas, en ocasiones pueden estar sometidas a ambientes salinos por alguna razón como es la crianza de juveniles en granjas marinas. Esto hace que, en términos de clasificación por migración, quede determinada como una especie semianádroma. Aunque en estos programas, los juveniles de carpa común se liberan en la desembocadura del río que no es salina, a veces la salinidad de la desembocadura aumenta de forma inesperada. De este modo, se produce cierto grado de superposición del problema objetivo. En términos moleculares, tanto la esmoltificación en anádromos, como la respuesta al estrés osmótico en estos casos particulares de estenohalinos semianádromos, está relacionado con un aumento de cortisol, hormona que regula la actividad de la Na⁺-K⁺-ATPasa, que regula el intercambio de agua y electrolitos en los tejidos. En este sentido D12 muestra en carpas lo mismo que es conocido para salmónidos, esto es, que una alimentación suplementada con triptófano ayuda a aumentar los niveles basales de cortisol, y con eso aumentando la respuesta antiestrés de los peces. Por lo tanto, dado que se compromete a nivel molecular la actividad de la Na⁺-K⁺-ATPasa, no se puede sostener que el documento D12 no esté destinado a resolver el mismo problema objetivo que la presente solicitud.

4. Explicar al Tribunal, si la única diferencia entre el documento D5 y la solicitud es la adición de triptófano o fenilalanina libres al alimento, y si de ser así, tal diferencia conlleva o no algún efecto frente al estado del arte citado.

R.- Para poder responder esta pregunta debemos analizar las dietas que son enseñadas en D5. Este documento ensaya cuatro dietas donde los pellets son construidos a base de un alimento en polvo húmedo descrito por Fowler y Burrows (1971), carboximetilcelulosa (CMC) como agente aglutinante y el suplemento mineral.

En primer lugar, analicemos el alimento en polvo. De Fowler y Burrows (1971) tenemos la tabla 1 que describe los constituyentes del alimento:

TABLE 1.--Formula for the Abernathy dry diet

Ingredient	Percent	Type
Fish carcass meal ¹ ---	44.5	Salmon, dogfish, hake, herring, or turbot.
Dried whey product---	17.0	Not less than 15 percent protein (Foremost or equal).
Wheat germ meal-----	16.5	Not less than 25 percent protein and 8 percent lipid.
Cottonseed meal-----	15.0	Not less than 50 percent protein.
Soybean oil-----	6.0	Fully refined soybean oil (National Soybean Processors Association Code) with 0.01 percent BHA and 0.01 percent BHT added.
Vitamin supplement---	1.0	See table 2.

¹To have protein content of more than 70 percent, lipid less than 12 percent, water less than 7 percent, and a T.B.A. value of less than 40.

Dada esta información, que es la única que aparece en el documento respecto a su composición, y a la definición dada por el solicitante en su reivindicación 1, que solo menciona que el alimento comprende proteína, grasa, carbohidratos, vitaminas, minerales y agua, no es posible hacer diferenciaciones precisas, y por consecuencia, se concluye que ambos documentos coinciden en este aspectos, ya que al ser lo reivindicado por el solicitante una composición absolutamente general de un alimento, lo descrito en D5 (usando como alimento base a Fowler y Burrows, 1971) también cumple con la misma descripción.

El siguiente paso entonces es analizar el suplemento mineral que se describe en ambos documentos. Para ello se calculará la composición mineral que poseen cada una de las 4 dietas ensayadas en D5. En las siguientes tablas se detalla el proceso de cálculo (independiente al realizado por el oponente):

- Determinación de la masa atómica (MA) de los elementos analizados:

MA	g/mol
Na	22,990
Cl	35,453
Mg	24,305
S	32,065
O	15,999
Ca	40,078
K	39,098
C	12,011
H	1,008

- Determinación de la composición porcentual de cada elemento analizado dentro de la molécula que lo contiene:

	PM (g/mol)	% Na de la molécula	% Mg de la molécula	% Ca de la molécula	% K de la molécula	% Cl de la molécula
NaCl	58,4	39,3				60,7
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246,4		9,9			
MgCl ₂ · 6H ₂ O	203,2		12,0			34,9
CaCl ₂	111,0			36,1		63,9
KCl	74,6				52,4	47,6
NaHCO ₃	84,0	27,4				

- Determinación de la composición porcentual de cada elemento analizado dentro de la composición total del suplemento mineral “Instant Ocean”:

	% del suplemento	% Na del suplemento	% Mg del suplemento	% Ca del suplemento	% K del suplemento	% Cl del suplemento
NaCl	65,2	25,65				39,55
MgSO ₄ · 7H ₂ O	16,3		1,61			
MgCl ₂ · 6H ₂ O	12,8		1,53			4,47
CaCl ₂	3,3			1,19		2,11
KCl	1,7				0,89	0,81
NaHCO ₃	0,5	0,14				
TOTAL	99,80	25,78	3,14	1,19	0,89	46,94

- Determinación de la composición en g/kg de cada elemento analizado dentro las dietas ensayadas en D5:

	Polvo de alimento	CMC	Suplemento mineral	Concentración (g/kg)				
				Na	Mg	Ca	K	Cl
Dieta A	98	2	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Dieta B	94	2	4	10,3	1,3	0,5	0,4	18,8
Dieta C	90	2	8	20,6	2,5	1,0	0,7	37,5
Dieta D	86	2	12	30,9	3,8	1,4	1,1	56,3

- Comparación de los rangos entre la solicitud y el documento D5:

	Reivindicación 1	D5 (Basulto)
Na	3,934 – 39,340	10,3-30,9
Mg	0,026 – 25,530	1,3-3,8
Ca	0,036 – 36,110	0,5-1,4
Cl	6,202 – 199,020	18,8-56,3

En consecuencia, tal como podemos ver en la última tabla presentada, los rangos que se enseñan en D5 coinciden con los de la reivindicación 1. Por tanto, este perito coincide con que la única diferencia existente entre D5 y la solicitud es que, en esta última, se agrega triptófano o fenilalanina.

Respecto a si esta diferencia conlleva alguna diferencia respecto al estado del arte, debemos considerar que el documento apunta a mejorar la tolerancia al agua salada de salmónes par, induciendo su metamorfosis a smolt, según se describe en el resumen, introducción y materiales y métodos de D5. En consecuencia, el documento si se refiere a esmoltificación. Los resultados de la investigación sugieren que los salmónes alimentados con dietas enriquecidas con sales inorgánicas tienen una mayor tolerancia al agua salada en comparación con los salmónes alimentados con dietas sin sales

inorgánicas. Por otra parte, las concentraciones de sales inorgánicas utilizadas en el estudio no parecen tener efectos adversos en la salud de los salmones, y se sugiere que las concentraciones diarias de sal inorgánica de hasta el 12% del peso del alimento consumido no parecen ser perjudiciales para los salmones. También se sugiere que la alimentación con sales inorgánicas puede mejorar la eficiencia alimentaria de los salmones, lo que podría tener implicaciones económicas para la industria de la acuicultura, y que una duración más corta del "tratamiento" con sales inorgánicas podría ser mejor, teniendo en cuenta la interferencia negativa entre la alimentación con sales inorgánicas y la utilización de alimentos.

Respecto a si esta diferencia existente entre ambos documentos (esto es la adición de triptófano) confiere alguna ventaja, este perito coincide con la opinión del oponente de que no existe prueba alguna en la solicitud de que la adición de triptófano mejore el proceso de esmoltificación respecto a los procesos logrados solamente con sales (como D5), debido a que el solicitante nunca compara la composición de alimentos reivindicada (sales + triptófano) con la composición equivalente pero solo con sales. De los 6 ensayos de campo enseñados en la solicitud, los cinco que prueban la "dieta 2" (correspondiente a lo reivindicado) lo hacen comparándola con la "dieta control a" (alimento de crecimiento para peces parr y smolt producido por Skretting AS, ensayos de campo 2 y 3) o "dieta control b" (alimento de crecimiento para peces parr y smolt producido por Ewos AS, ensayos de campo 4, 5 y 6). En consecuencia, esta diferencia no aporta ventaja comprobable respecto al arte.

5. Ilustrar al tribunal si las cantidades mínimas de iones de calcio reivindicados en la cláusula principal proporcionan algún efecto en comparación con los datos experimentales entregados en la solicitud y si las cantidades entregadas son o no más altas y si esto se considera o no una ventaja frente al estado del arte citado.

R.- Tal como se ha planteado en la respuesta a la pregunta anterior, la "dieta 2", correspondiente a la composición reivindicada, nunca es probada contra un control equivalente, que, en este caso, solo omite la presencia de iones divalentes de calcio. De este modo, no se puede sustentar que las cantidades de calcio reivindicadas proporcionen algún efecto respecto a formulaciones que no tengan este catión.

Por otra parte, tal como plantea el oponente, la "dieta 2" que es la formulación que ejemplifica la realización de la solicitud reivindicada, contiene un 0,75% de CaCl_2 agregado, lo que efectivamente corresponde a la adición de 2,7 g/kg de Ca. El rango protegido en la reivindicación es 1 parte en 0,036 g/kg, y si bien 2,7 g/kg cae dentro del rango protegido (0,036-36,11 g/kg), es claro que el solicitante no ha dado antecedentes que fundamenten que el uso de un contenido de calcio 2 órdenes de magnitud inferiores al ensayado vaya a generar un efecto ventajoso respecto al estado del arte.

6. Explicar el alcance del técnico del documento D2, si incluye o no evidencia experimental sobre la dieta de prueba de los peces, su alimentación y rango reivindicado.

R.- Cómo ha sido indicado anteriormente, el documento D2 protege un método para mejorar la cría de peces anádromos preadultos (salmones, los cuales se mantienen en agua dulce antes de transferirlos al agua de mar) que comprende: a) agregar al menos un modulador del receptor de detección de cationes polivalente (PVCR, los modulares son calcio 2-10 mM y magnesio 0,5-10 mM) al agua dulce en una cantidad suficiente para modular la expresión y / o sensibilidad de al menos un PVCR; y b) agregar alimento para el consumo de pescado al agua dulce, y que contiene un agente (NaCl al menos 1% en peso) que contribuye a un nivel significativamente mayor de dicho modulador PVCR en el suero del pez

anádromo preadulto (reivindicaciones 1-5). La base para el alimento de consumo se describe en el ejemplo 8 del documento, y corresponde a la dieta estándar de salmónidos de agua dulce de Moore Clark (dato importante para responder la pregunta 7).

Uno de los métodos derivados de este método general incluye agregar al agua calcio y magnesio en cantidades suficientes para modular la expresión y/o sensibilidad de al menos un PVCR, y al alimento NaCl (al menos 1% en peso), y triptófano (1-10 g/kg). También incluye exponer a los peces preadultos a un fotoperiodo (reivindicaciones 9-13).

De este modo, el documento coincide con la presente solicitud en que ambos agregan al alimento NaCl en un rango de concentración coincidente (**D2** >1%_{p/p}, **solicitud** 1-10 %_{p/p}) y triptófano en un rango coincidente (**D2** 1-10 g/kg, **solicitud** 2-10 g/kg). En términos de reivindicaciones, se diferencian en que en D2, los cationes Ca y Mg son agregados al agua donde se mantienen los peces, mientras que en la solicitud se agregan al alimento. Sin embargo, en el ejemplo 17 de D2, al alimento (que contiene NaCl 7% y triptófano 2 g/kg) también se le agrega Mg en una concentración de 2%_{p/p} (20 g/kg, que coincide con el rango de 0,026-25,53 g/kg de la solicitud). De este modo, el documento D2 enseña un alimento que solo se diferencia de la presente solicitud en que no posee calcio. Es importante notar que los resultados enseñados en D2 señalan que la adición de Mg al alimento (NaCl + Trp) no mejora la sobrevivencia de los salmónidos respecto al alimento sin Mg, tal como se observa en la Tabla 19 de dicho documento. También es importante notar que un factor clave en este experimento es que los peces que se encuentran en agua que contiene calcio (3 mM) y magnesio (1mM), tienen una tasa de sobrevivencia mucho más alta que los peces con dieta control, en agua sin los cationes mencionados.

7. Señalar y explicar el alcance del documento Deacon, su combinación con D2 y lo reivindicado en autos y cuáles sus efectos frente a las especies.

R.- Tal como se señaló en la pregunta anterior, el documento **D2** en su ejemplo 8 enseña dos métodos generales para preparar los piensos para el consumo de los peces como parte de los Procesos I y II de AquaBio Products Sciences® (APS). En el caso de la preparación del alimento para el proceso APS II, se añadió NaCl 7%_{p/p} a la dieta estándar de salmónidos frescos de Moore Clark a un volumen de agua del grifo aproximadamente 3-4 veces el peso del NaCl. La mezcla se calentó a 60-70 °C con mezclado mediante el uso de una barra agitadora magnética para disolver la sal. Se añadió L-triptófano al agua a razón de 2 o 4 g/kg de “dieta estándar de salmónidos de agua dulce de Moore Clark”, dependiendo de las necesidades de la formulación. Se añadió HCl diluido al agua con agitación hasta que el triptófano se disolvió y el pH de la solución fue de aproximadamente 4,0. A continuación, se vertió la solución de NaCl+triptófano en un pulverizador manual y se aplicó a continuación a la dieta estándar de salmónidos de agua dulce Moore Clark dando vueltas dentro de una hormigonera.

Por consecuencia, el alimento base (Na+Trp), más magnesio, tal como se enseña en el ejemplo 17 de D2 (y tabla 19), contiene en su composición a la dieta estándar de salmónidos frescos de Moore Clark. Es aquí donde la declaración del Sr. **Deacon** cobra importancia, ya que, según su testimonio, la composición de cualquiera de los alimentos Moore Clark que podrían incluirse dentro de una “dieta estándar para salmónidos de agua dulce de Moore-Clark” de la tabla 19 de D2 comprenderían calcio en una cantidad aproximada de 2,4% (o 24 g/kg), lo cual se encuentra dentro del rango de 0,036-36,011 g/kg reivindicado en autos. A modo de ejemplo, se adjunta la hoja técnica del alimento “Moore-Clark’s Select 6 + 6 Freshwater Extruded Smolt Feed”, y en la cual se comprueba efectivamente este contenido de 2,4% de calcio.

8. Si, teniendo presente la conclusión de los puntos anteriores y el análisis de lo divulgado en el arte previo, la solicitud de invención, a su juicio, presenta novedad, nivel inventivo y aplicación industrial, explicando cómo y por qué llega a esa conclusión.

R.- En virtud de los puntos anteriormente analizados, particularmente considerando el documento **D2** junto al documento **Deacon**, y en menor medida por lo divulgado por **D11**, se concluye que la solicitud de invención no cumple con el requisito de novedad, y por consecuencia tampoco el de nivel inventivo, el cual, de todos modos, podría ser deducido desde el arte previo por una persona normalmente versada en el área, combinando **D12** con **D13**, según se ha analizado en la respuesta a las pregunta 3. La aplicación industrial es evidente en cuanto este alimento puede ser utilizado en la industria de la acuicultura, para la producción de salmónidos.

VII.- Conclusión

En virtud de los argumentos expuestos, a juicio de este perito, la solicitud de patente .º 201700674 para “Alimento para peces que comprende sales de sodio, magnesio y calcio y un modulador del receptor de cationes polivalentes (PVCR) en la forma de triptófano o fenilalanina; y uso para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico del síndrome hemorrágico del smolt (HSS) en salmonidae” no cumple con el requisito de novedad, ni nivel inventivo, aunque si con el de aplicación industrial.

Santiago, 16 de octubre de 2023.

Dr. Pablo Cañón Amengual

Bioquímico – Enólogo

Perito en Biotecnología TDPI



Santiago, dieciséis de octubre del año dos mil veintitrés

A sus autos el informe pericial presentado con esta fecha. Póngase en conocimiento de la(s) parte(s) por el plazo de cinco días hábiles, a contar de la notificación de ésta resolución.

ROL TDPI N°: 001489-2021

Resolución dictada por el Presidente del Tribunal de Propiedad Industrial Ministro Sr. Marco Arellano Quiroz.

AMTV

RESOLUCION ANOTADA EN EL ESTADO DIARIO CON ESTA FECHA

This document is digitally signed

Signer: MARCO ANTONIO ARELLANO
QUIROZ
Date: lun, oct 16, 2023 12:47:18 CLT
Location: PUNE

This document is digitally signed

Signer: Marta Beatriz Araya Fernandez
Date: lun, oct 16, 2023 13:40:51 CLT
Location: PUNE

Solicitud de Patente de Invención N° **201700674**

Titular: **EUROPHARMA AS**

ROL TPI N° **1489-2021**

OBSERVA INFORME PERICIAL.

H. Tribunal de Propiedad Industrial

JUAN FRANCISCO PERALTA INDA, abogado, domiciliado en Avenida Andrés Bello 2711, piso 19, Las Condes, Santiago, en representación de **EUROPHARMA AS**, en los antecedentes relativos a la solicitud de patente de invención N° **201700674**, a este H. Tribunal de Propiedad Industrial respetuosamente digo:

Con fecha 16 de octubre de 2023, el Sr. Perito don Pablo Cañón Amengual emitió un **informe pericial** respecto de la solicitud de patente de invención N° **201700674**.

En dicho informe, notificado a esta parte con fecha 16 de octubre de 2023, el Sr. Perito ha señalado que la presente solicitud no cumpliría, con los requisitos de patentabilidad establecidos en la Ley y el Reglamento, específicamente novedad y nivel inventivo, en razón de las siguientes consideraciones:

“En virtud de los puntos anteriormente analizados, particularmente considerando el documento D2 junto al documento Deacon, y en menor medida por lo divulgado por D11, se concluye que la solicitud de invención no cumple con el requisito de novedad, y por consecuencia tampoco el de nivel inventivo, el cual, de todos modos, podría ser deducido desde el arte previo por una persona normalmente versada en el área, combinando D12 con D13, según se ha analizado en la respuesta a la pregunta 3.

La aplicación industrial es evidente en cuanto este alimento puede ser utilizado en la industria de la acuicultura, para la producción de salmónidos.”

En relación con el informe planteado, mi mandante me ha instruido hacer las siguientes observaciones:

1. En relación al requisito de novedad:

Es menester señalar respecto del requisito de este requisito de patentabilidad, sobre el cual se refiere el informe pericial emitido en autos, que nunca fue ventilado en primera instancia.

En efecto, en su demanda de oposición, la demandante argumenta que la solicitud de autos adolecería de falta de claridad, de ausencia de nivel inventivo y que se pretendería proteger materia excluida de patentabilidad según la Ley 19.039. En ningún pasaje de dicha demanda se encuentra el incumplimiento al requisito de novedad como un obstáculo para INAPI ni para la oponente a la solicitud de autos. No corresponde entonces, que se introduzca en segunda instancia el debate sobre este requisito.

A mayor abundamiento, en el último punto (N°8) se menciona que la combinación de dos documentos permitiría concluir que no se cumple con dicho requisito, sin desarrollarse en detalle dicha conclusión previamente, ni las razones que permitieron llegar a afirmar lo anterior.

De todas formas, subsidiariamente a lo recién expuesto y en el improbable caso que nuestras alegaciones vertidas en los párrafos anteriores sean desestimadas, aun así, se debe afirmar que el requisito de novedad se cumple cabalmente por la solicitud de autos.

Respecto de este requisito, la regla consiste en que para considerar que un invento no cumple con el requisito de novedad, todas y cada una de las características de la solicitud deben estar anticipadas en un solo documento del arte previo. Dicha regla se conoce como el Principio de Identidad.

Es más, existe abundante jurisprudencia que señala en forma expresa que respecto del requisito de la novedad es necesario aplicar el criterio de identidad.¹ Este criterio ha sido aplicado en forma constante y uniforme por el Tribunal de Propiedad Industrial

Al respecto, estimamos que el informe pericial no logra acreditar que algún documento divulgado en el arte previo anticipe la novedad el invento de autos, cumpliendo con dicho principio. Al contrario, el perito en su informe, intenta combinar dos o más documentos para

¹ Sentencia del Tribunal de Propiedad Industrial Rol 886-2016, solicitud 1508-2003, emitida el 9 de enero de 2018. *Idem* Sentencia del Tribunal de Propiedad Industrial Rol N° 864-2017 emitida el 30 de agosto de 2018; Sentencia del Tribunal de Propiedad Industrial Rol N° 886-2016 emitida el 9 de enero de 2018; Sentencia del Tribunal de Propiedad Industrial Rol N° 633-2017 emitida el 7 de septiembre de 2018. ² Sentencia del Tribunal de Propiedad Industrial, Rol N° 176-2017, emitida el 2 de agosto de 2018; Sentencia del Tribunal de Propiedad Industrial, Rol N° 42-2017, emitida el 1 de agosto de 2018; Sentencia del Tribunal de Propiedad Industrial, Rol N° 2577-2016, emitida el 18 de julio de 2018; Sentencia del Tribunal de Propiedad Industrial, Rol N° 2572-2016, emitida el 20 de junio de 2018; Sentencia del Tribunal de Propiedad Industrial, Rol N° 2302-2016, emitida el 15 de mayo de 2018; Sentencia del Tribunal de Propiedad Industrial, Rol N° 305-2018, emitida el 23 de diciembre de 2019; Sentencia del Tribunal de Propiedad Industrial, Rol N° 1254-2018, emitida el 16 de diciembre de 2019; Sentencia del Tribunal de Propiedad Industrial, Rol N° 2124-2017, emitida el 7 de junio de 2019; Sentencia del Tribunal de Propiedad Industrial, Rol N° 42-2017, emitida el 1 de agosto de 2018.

argumentar el incumplimiento del requisito de novedad. En efecto, en su respuesta al punto 8 instruido por el Tribunal, el Perito responde lo siguiente:

“En virtud de los puntos anteriormente analizados, particularmente considerando el documento D2 junto al documento Deacon, y en menor medida por lo divulgado por D11, se concluye que la solicitud de invención no cumple con el requisito de novedad, y por consecuencia tampoco el de nivel inventivo...” (el subrayado es nuestro).

Lo anterior no solo no logra cumplir con el principio de identidad, si no que no logra acreditar la ausencia de novedad del invento de autos en la forma en que nuestro ordenamiento jurídico lo establece.

Además, debemos mencionar respecto de la declaración de Deacon, o documento Deacon, esta NO puede ser considerada como parte del arte previo, y sin embargo fue considerada de esa manera para afirmar que la solicitud de autos carece de novedad en el informe pericial.

El artículo 33 de la Ley 19.039 es claro en disponer que el estado de la técnica comprenderá todo lo que haya sido divulgado o hecho accesible al público antes de la fecha de presentación de la solicitud de patente en Chile o de la prioridad reclamada según el artículo 34. Muy por el contrario, este documento fue producido a propósito de solicitudes equivalentes a la de autos en el extranjero, sin especificar fecha cierta y por lo mismo, solo erróneamente podría considerarse parte del arte previo a la hora de realizar un análisis de novedad. En consecuencia, cabe desestimarlos derechamente.

A mayor abundamiento, respecto del documento Deacon en particular y de este tipo de medio de prueba en general, que las declaraciones o testimonios, más parecen ser pruebas testimoniales que pruebas documentales.

En efecto, se trata de personas ajenas a las partes que declaran sobre hechos controvertidos que pueden ayudar a un juez a dictar sentencia, es decir, testigos.

El artículo 12 de la Ley de Propiedad Industrial que regula los medios de prueba, en su inciso primero dispone que “En estos procedimientos las partes podrán hacer uso de todos los medios de prueba habituales en este tipo de materias, y de los señalados en el Código de Procedimiento Civil con exclusión de la testimonial.” (el subrayado es nuestro).

De lo anterior, es posible concluir que dicho medio de prueba (documento Deacon) aportado por la demandada en autos en realidad se corresponden a declaraciones testimoniales explícitamente excluidas como medio de prueba por la Ley de Propiedad Industrial, y que en consecuencia no pueden ser admitidos en el presente juicio

Es por lo anterior que se debe concluir que el requisito de novedad se cumple cabalmente en la solicitud de patente de invención de autos.

2. En relación al requisito de nivel inventivo:

Respecto de D12 en combinación con D13

En respuesta al requerimiento 3, el perito menciona que el problema objetivo de D12 y de la solicitud sería la esmoltificación de peces.

Sin embargo, se hace notar que D12 no menciona la esmoltificación, toda vez que D12 se refiere a peces carpa que no sufren la transformación fisiológica de la esmoltificación como ocurre con los peces anádmomos, no abordando D12 el mismo problema técnico abordado por la solicitud.

D12 divulga un alimento para carpas, las carpas no son salmónidos y no se esmoltifican, por lo que no sería relevante para un experto en acuicultura de salmónidos. Además, D12 no revela la presencia de los iones dentro de los rangos reivindicados.

El Perito menciona que se produce cierto grado de superposición del problema técnico objetivo, relacionado con el aumento del cortisol, indicando que una alimentación suplementada con triptófano ayuda a aumentar los niveles basales de cortisol, y con eso aumentando la respuesta antiestrés de los peces.

Sin embargo, se hace notar que que no es el objetivo de la presente invención el aumento de los niveles de cortisol.

Tal como fue mencionado en el informe del perito (ver página 20 del informe del perito), y en el téngase presente de fecha 3 de abril de 2023.

El documento Basic (2013) indica que la esmoltificación de los peces coincide con aumentos transitorios de cortisol, lo que puede afectar su bienestar y suprimir su inmunocompetencia, haciéndolos más susceptibles a infecciones o estrés externo. No se sabe

si el aumento transitorio de cortisol es un requisito previo para la esmoltificación o una consecuencia de la transformación parr.

De este modo, una persona con conocimientos técnicos en el área no podría determinar si una dieta con mayores niveles de triptófano tendría un efecto positivo en la esmoltificación y en la salud de los peces, y no estaría motivada a agregar triptófano al alimento de salmones debido a los posibles efectos negativos relacionados con suprimir la inmunocompetencia en los peces, lo que los haría más susceptibles a las infecciones. Aunque algunos peces pueden tener una respuesta positiva al Triptófano, no hay ningún incentivo para agregarlo al alimento.

De acuerdo a lo anterior, se puede afirmar que la combinación de D12 con D13 no anticiparía las características de la reivindicación 1. Los documentos D12 y D13 no están dirigidos al mismo problema técnico que la presente invención y, además, se refieren a peces distintos.

El Perito también menciona en respuesta al requerimiento 8 que: ***“considerando el documento D2 junto al documento Deacon, y en menor medida por lo divulgado por D11, se concluye que la solicitud de invención no cumple con el requisito de novedad, y por consecuencia tampoco el de nivel inventivo”.***

Respecto de D11.

Hacemos notar que en el análisis de D11 el perito indica que D11 se diferencia de la solicitud en su objetivo.

D11 se refiere a alimentos para truchas. D11 no revela triptófano libre dentro del intervalo reivindicado. En D11 el triptófano se midió tras la hidrólisis básica de las proteínas. No hay indicación de la cantidad de triptófano libre agregado al alimento. Los peces en D11 eran grandes (1144 g), no parr (de 10 g a 150 g) como se indica en la presente solicitud.

Por lo tanto, se puede afirmar que D11 no afectaría la novedad y no sería indicado como documento de partida para el análisis de nivel inventivo toda vez que se refiere a un problema técnico distinto.

Respecto de D2 junto con Deacon

En respuesta al Requerimiento 8, el perito también menciona: “considerando D2 junto con Deacon, como un intento de objeción de novedad y nivel inventivo.

Al respecto es necesario hacer notar que D2 no revela un alimento para peces que contenga los iones y triptófano libre dentro de los rangos reivindicados. El único alimento especificado que contiene Ca^{2+} y Mg^{2+} no menciona el triptófano ni el cloruro sódico (véase D2, página 43, líneas 10 a 18).

En el Ejemplo 8 en D2 revela la posibilidad de formular una dieta base utilizando "30% de calamar", aunque se conocen numerosas especies de calamar, en D2 no se especifica ninguna. Por consiguiente, aún se desconoce la composición real del calamar "licuado en batidora", mencionado en D2.

En particular, el Ejemplo 8 en D2 revela:

"Otros ingredientes incluyendo NaCl o compuestos activos PVCRC fueron mezclados en la dieta base por peso de acuerdo a lo que el experimento requería". Por lo tanto, D2 está lejos de revelar un alimento que comprenda las sales como los moduladores PVCRC dentro de los rangos reivindicados.

D2 advierte en contra de la dieta $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ basándose en los datos de la Tabla 1: que muestra sólo un 6% de supervivencia en agua de mar.

La explicación también se articula en la página 43, líneas 10 a 12:

"La inclusión de calcio (10 mM) y magnesio (5 mM) en el alimento ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ diet) redujo la supervivencia en comparación con los controles tanto en agua dulce (51% frente a 67%) como tras la transferencia al agua de mar (1% frente a 50%)".

En vista de lo anterior, se puede afirmar que no existe ningún incentivo para llegar al alimento reivindicado en autos a partir de lo divulgado en D2.

Por otra parte, la declaración de Deacon no se refiere a los alimentos mencionados en el ejemplo 8 de D2.

Uno de los alimentos mencionados en D2 es una dieta estándar para salmónidos de agua dulce de Moore-Clark, mientras que el alimento mencionado en la declaración de Deacon es

un alimento extrusionado para smolt de agua dulce 6+6 de More-Clark, por lo que se trata de alimentos diferentes.

Además, el alimento mencionado en la declaración de Deacon es de 1992 y la fecha de prioridad de D2 es octubre de 2000. Por lo tanto, se trata de alimentos diferentes producidos en momentos distintos.

En este sentido es necesario mencionar además que las fuentes de ingredientes de los alimentos para peces han ido cambiando sustancialmente desde la década de 1990, como ha revelado Aas et al 2019, se reproduce aquí figura 1 ilustrativa de Aas et al 2009 y el documento completo se encuentra en el link: <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2019.100216>

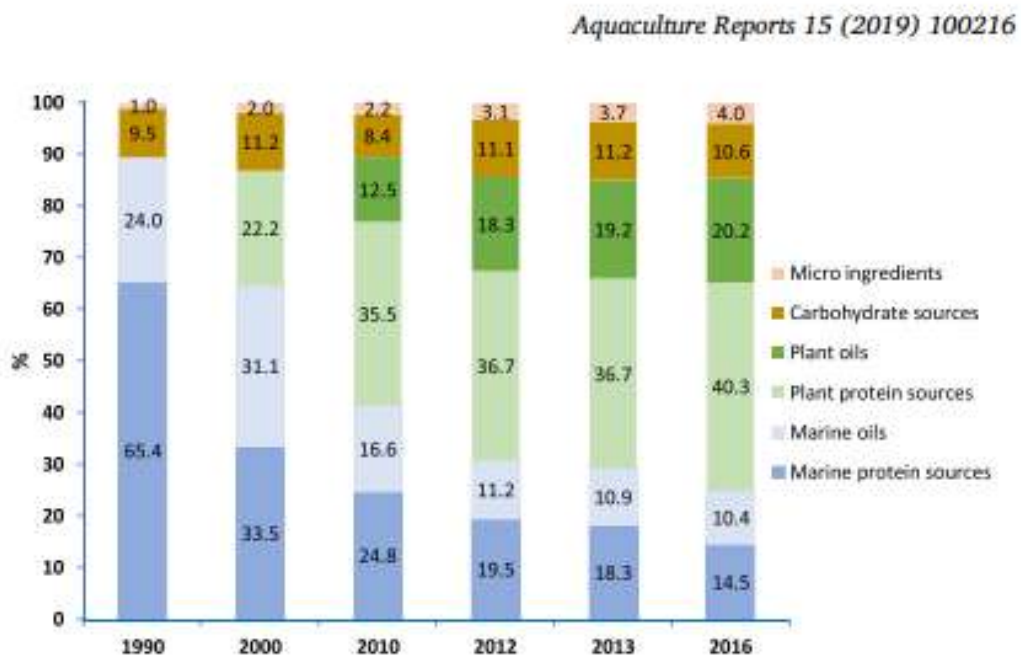


Fig. 1. Ingredient sources (% of feed) in Norwegian salmon feed in 2016 compared to previous years, which were given by Ytrestøyl et al., 2015.

En vista de lo anterior, se puede afirmar que ninguno de los documentos D2 o Deacon interfiere con la novedad de la solicitud. Además, D2 divulga en contra de agregar sales de calcio y magnesio al alimento, por lo que no existe ningún incentivo para llegar a la presente invención a partir de D2. Asimismo, lo divulgado en Deacon no suple las deficiencias de D2, por lo que no existe ninguna motivación para llegar a la presente invención a partir de la combinación de ambos documentos.

A la luz de lo expuesto, solicitamos respetuosamente al Sr. Perito que retire las objeciones formuladas y que, en definitiva, recomiende la concesión del derecho asociado a la presente solicitud de patente de invención ya que cumple con todos los requisitos exigidos por la Ley y su Reglamento, particularmente los requisitos de novedad y nivel inventivo.

POR TANTO,

RUEGO a este Honorable Tribunal de Propiedad Industrial tener por observado el Informe Pericial en los términos expuestos.

Santiago, veinticuatro de octubre del año dos mil veintitrés.

Téngase presente las observaciones al informe pericial.

Se fija para el día treinta y uno de octubre del presente, a las 09:00 horas, como fecha para la audiencia pública, a través de video conferencia, en la que se dará cuenta a la Sala correspondiente del Tribunal de Propiedad Industrial del informe pericial dictado en estos autos.

ROL TDPI N° 001489-2021

Resolución dictada por el Presidente del Tribunal de Propiedad Industrial Ministro Sr. Marco Arellano Quiroz.

RESOLUCION ANOTADA EN EL ESTADO DIARIO CON ESTA FECHA

AMTV

This document is digitally signed

Signer: MARCO ANTONIO ARELLANO
QUIROZ
Date: mar, oct 24, 2023 20:38:07 CLT
Location: PUNE

This document is digitally signed

Signer: Marta Beatriz Araya Fernandez
Date: mar, oct 24, 2023 20:38:14 CLT
Location: PUNE

Santiago, veinticinco de octubre del dos mil veintitrés.

No habiéndose notificado la resolución de fecha 24-10-2023, en la referida fecha por estado diario, procédase a su notificación conjuntamente con la presente resolución.

Nº Rol: 001489-2021

Resolución dictada por el Presidente del Tribunal de Propiedad Industrial Ministro Sr. Marco Arellano Quiroz.

RESOLUCION ANOTADA EN EL ESTADO DIARIO CON ESTA FECHA

AMTV

Solicitud Nº 674-2017 “ALIMENTO PARA PECES QUE COMPRENDE SALES DE SODIO, MAGNESIO Y CALCIO Y UN MODULADOR DEL RECEPTOR DE CATIONES POLIVALENTES (PVCR) EN LA FORMA DE TRIPTÓFANO O FENILALANINA; Y USO PARA EL TRATAMIENTO PROFILÁCTICO Y/O TERAPÉUTICO DEL SÍNDROME HEMORRÁGICO DEL SMOLT (HSS) EN SALMONIDAE”

Rol Nº 1489-2021

Audiencia Pericial

Martes 31 de octubre del 2023

EN LO PRINCIPAL: SE ANUNCIA PARA AUDIENCIA PERICIAL; **OTROSÍ:** SOLICITUD QUE INDICA.

H. TRIBUNAL DE PROPIEDAD INDUSTRIAL.

JUAN FRANCISCO PERALTA INDA, en representación de **EUROPHARMA AS**, a este H. Tribunal de Propiedad Industrial respetuosamente digo:

Vengo en anunciarme para asistir por el solicitante **EUROPHARMA AS** en esta causa cuya audiencia pericial fue fijada para el día 31 de octubre de 2023.

POR TANTO,

A ESTE H. TRIBUNAL DE PROPIEDAD INDUSTRIAL PIDO: tener por anunciado.

OTROSÍ: De conformidad con el auto acordado de este H. Tribunal de Propiedad Industrial de fecha 24 de marzo de 2020 sobre audiencias por sistema de video conferencia, vengo en hacer presente que haré uso del sistema de videoconferencia y que para estos efectos mi dirección de e-mail es jfperalta@sargent.cl y mi teléfono +56968441866.

POR TANTO,

A ESTE H. TRIBUNAL DE PROPIEDAD INDUSTRIAL PIDO: tenerlo presente y acceder a lo solicitado.

AUDIENCIA PÚBLICA

Fecha 31-10-2023, 9:00 A.M.

Solicitud : 201700674

Rol : 1489-2021

Patente de Invención

Se anuncia para asistir a audiencia pública.

H. TRIBUNAL DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

María Trinidad Rojas Wünkhaus, en representación de la oponente y apelante **Biomar Chile S.A.**, en el expediente de la solicitud de patente de invención N° 201700674, rol N° **1489-2021**, al H. Tribunal de Propiedad Industrial respetuosamente digo:

Por medio del presente escrito, vengo en anunciarme para asistir a la audiencia pública, de fecha 31 de octubre de 2023, programada para las 9:00 horas.

Al respecto, hago presente que mi dirección de correo electrónico es trojas@claro.cl y que mi teléfono de contacto para el día de la audiencia es el +56991384001.

POR TANTO,

al H. Tribunal de Propiedad Industrial respetuosamente pido: Se sirva tenerme por anunciada para la audiencia pública.



Santiago, treinta y uno de octubre del año dos mil veintitrés.

A las presentaciones de fecha 30-10-2023 Códigos 13808 y 13814: Como se pide.

ROL TDPI N° 1489-2021

Proveído por el Presidente del Tribunal de Propiedad Industrial Sr. Marco Arellano Quiroz.

NOTIFICADA POR EL ESTADO DIARIO CON ESTA FECHA

MTG

This document is digitally signed

Signer: MARCO ANTONIO ARELLANO
QUIROZ
Date: mar, oct 31, 2023 09:10:08 CLT
Location: PUNE

This document is digitally signed

Signer: Marta Beatriz Araya Fernandez
Date: mar, oct 31, 2023 09:19:49 CLT
Location: PUNE



Santiago, treinta y uno de octubre del año dos mil veintitrés

Con la cuenta pública y lo informado por el perito Sr. Pablo Cañón Amengual se tiene por evacuado el informe pericial en los términos ordenado en autos. Rija el estado de acuerdo.

Ofíciase para efectos del pago de los honorarios.

Rol TDPI N°1489-2021

Pronunciada por el Ministro Sr. Marco Arellano Quiroz, las Ministras Sra. Carmen Iglesias Muñoz y Sra. Pamela Fitch Rossel.

ANOTADO EN EL ESTADO DIARIO DE ESTA FECHA.

Santiago, siete de diciembre de dos mil veintitrés

VISTOS:

Que, en autos se ha presentado la solicitud de patente de invención N°201700674, Rol TDPI N°001489-2021, para: "ALIMENTO PARA PECES QUE COMPRENDE SALES DE SODIO, MAGNESIO Y CALCIO Y UN MODULADOR DEL RECEPTOR DE CATIONES POLIVALENTES (PVCR) EN LA FORMA DE TRIPTÓFANO O FENILALANINA; Y USO PARA EL TRATAMIENTO PROFILÁCTICO Y/O TERAPÉUTICO DEL SÍNDROME HEMORRÁGICO DEL SMOLT (HSS) EN SALMONIDAE", cuyo solicitante es EUROPHARMA AS.

Que, con fecha siete de octubre de dos mil veintiuno, se dictó sentencia definitiva en la causa, rechazando la oposición presentada por BIOMAR CHILE S.A., aceptando a registro la invención de autos, solicitada por EUROPHARMA AS., por cumplir con los requisitos de patentabilidad.

Que, con fecha veintinueve de octubre de dos mil veintiuno, el oponente BIOMAR CHILE S.A., interpone recurso de apelación basado en que la solicitud no cumple con los requisitos de patentabilidad, fundándose en los artículos 17 bis b), 5, 31, 32, 33 y 35 de la Ley de Propiedad Industrial, argumentando que carece de novedad y nivel inventivo.

Que, el veintiséis de noviembre del año dos mil veintiuno, se dictó resolución de autos en relación.

Que, durante el estado de acuerdo, se acordó al efecto realizar una medida para mejor resolver, para lo cual se realizó un comparendo de estilo para la designación del perito designándose al Sr. Pablo Cañón Amengual, de profesión

Bioquímico, para que informe, a fin de que verificar si la solicitud de autos cumple o no con los requisitos legales para ser otorgada.

PRIMERO: Como medida para mejor resolver requiérase informe pericial, a fin de que el perito informe:

1. Ilustrar al Tribunal sobre las características esenciales de la patente objeto de la solicitud de autos, considerando siempre el último pliego de reivindicaciones válidamente presentado en autos. Analizar si dicho pliego constituye una ampliación del contenido original y de los pliegos presentados con posterioridad, especialmente el pliego analizado por el resolutor de primer grado y si éste se encuentra debidamente sustentado en la memoria descriptiva. Desde los antecedentes que existen en la Memoria Descriptiva, determinar cuál era el problema técnico que se buscaba resolver.

2. Ilustrar al Tribunal sobre cuáles son las características especiales -en el evento de tenerlas- que posee la invención presentada a patentamiento respecto del estado del arte conocido, especialmente de los documentos D11, D12, D13, D5, D7, D2 y declaración documento Dicon.

3. Explicar al Tribunal, si los documentos D12 en combinación con D13, anticipan o no las características de la reivindicación 1, y si estos documentos se dirigen o no al mismo problema objetivo de la smoltificación y al mismo tipo de peces.

4. Explicar al Tribunal, si la única diferencia entre el documento D5 y la solicitud es la adición de triptófano o fenilalanina libres al alimento y si de ser así, tal diferencia conlleva o no algún efecto frente al estado del arte citado.

5. Ilustrar al tribunal si las cantidades mínimas de iones de calcio reivindicados en la cláusula principal proporcionan algún efecto en comparación con los datos experimentales entregados en la solicitud y si las cantidades entregadas son o no más altas y si esto se considera o no una ventaja frente al estado del arte citado.

6. Explicar el alcance del técnico del documento D2, si incluye o no evidencia experimental sobre la dieta de prueba de los peces, su alimentación y rango reivindicado.

7. Señalar y explicar el alcance del documento Dicon, su combinación con D2 y lo reivindicado en autos y cuáles sus efectos frente a las especies.

8. Si, teniendo presente la conclusión de los puntos anteriores y el análisis de lo divulgado en el arte previo, la solicitud de invención, a su juicio, presenta novedad, nivel inventivo y aplicación industrial, explicando cómo y por qué llega a esa conclusión.

Que, el perito en audiencia pública presentó su informe en forma remota el día treinta y uno de octubre del año dos mil veintitrés, con la participación de los abogados María Trinidad Rojas Wünkaus en representación de BIOMAR CHILE S.A. y del abogado Juan Francisco Peralta Inda, en representación de EUROPHARMA AS.

CON LO RELACIONADO Y CONSIDERANDO:

PRIMERO: Que, el centro de la discrepancia entre el apelante y oponente de autos BIOMAR CHILE S.A., radica en que, a su juicio, la solicitud de autos concedida a EUROPHARMA AS., no cumple con los requisitos de patentabilidad de novedad y nivel inventivo frente al estado del arte de conformidad con la Ley de Propiedad Industrial, por lo que solicita se rechace la patente solicitada.

SEGUNDO: Que, el problema técnico de la solicitud consiste en proveer un alimento para peces y un método que elimina o reduce las desventajas del método de esmoltificación de peces SuperSmolt®, permitiendo mantener a los salmones en agua dulce por más tiempo, sin que estos se desesmoltifiquen, mueran, reduzcan su tasa de crecimiento, pierdan escamas o padezcan del síndrome hemorrágico de smolt.

TERCERO: Que, el pliego de reivindicaciones concedido por INAPI, constante de 8 cláusulas, enseña en la R1 un alimento para peces que comprende proteína, grasa, carbohidratos, vitaminas, minerales, agua y además contiene 10-100 g/kg de sales de sodio, 0,1-100 g/kg de sales de magnesio, y 0,1-100 g/kg de sales de calcio (específicamente 3,934– 39,340 g/kg de Na⁺ , 2-10 g/kg de un modulador del receptor de cationes polivalentes (PVCR, triptófano o fenilalanina como aa. libre), 0,026 – 25,530 g/kg de Mg²⁺ , y 0,036 – 36,110 g/kg de Ca²⁺ , 6,202 – 199,020 g/kg de Cl⁻ . R2-6 son especificaciones de este alimento y las R7-8 hacen referencia a la preparación de un medicamento para el síndrome hemorrágico de smolt en salmonidae.

Que, el solicitante presentó nuevo pliego de reivindicaciones en esta instancia, con fecha 22 de marzo de 2023, constante de 5 Reivindicaciones, en que limita pliego anterior, eliminando referencia a medicamento para el síndrome hemorrágico de smolt y los aminoácidos se limitan solo a triptófano. Este pliego es más bien una limitación, no explica una ampliación del pliego concedido por INAPI, ni del pliego de la solicitud original.

CUARTO: Que, forman parte del estado del arte los documentos D11, D12, D13, D5, D7, D2 y la declaración documento Deacon.

Que, el documento más cercano es D2 (W O 02/30182), que protege un método para mejorar la cría de peces anádromos pre adultos (salmones, los cuales se mantienen en agua dulce antes de transferirlos al agua de mar), D2 se diferencia de la solicitud en que los cationes calcio (Ca) y magnesio (Mg) son agregados al agua donde se mantienen los peces, mientras que, en la solicitud de autos, se agregan al alimento.

Que, el documento Greg Deacon, corresponde a una declaración del nutricionista en Skretting (antes llamado Moore-Clark) que señala que la composición de cualquiera de los alimentos Moore Clark que podrían incluirse dentro de una “dieta estándar para salmónidos de agua dulce de Moore-Clark” de

la tabla 19 de D2 comprenderían calcio en una cantidad aproximada de 2,4% (o 24 g/kg), lo cual se encuentra dentro del rango de 0,036-36,011 g/kg reivindicado en autos. Adjunta hoja técnica del alimento "Moore-Clark's Select 6 + 6 Freshwater Extruded Smolt Feed" y en la cual se comprueba efectivamente este contenido de 2,4% de calcio.

QUINTO: Que, D2, protege un método para mejorar la cría de peces anádromos preadultos (salmones, los cuales se mantienen en agua dulce antes de transferirlos al agua de mar). La base para el alimento de consumo se describe en el ejemplo 8 del documento y corresponde a la dieta estándar de salmónidos de agua dulce de Moore Clark. En que uno de los métodos derivados de este método general incluye agregar al agua calcio y magnesio en cantidades suficientes para modular la expresión y/o sensibilidad de al menos uno de los receptores -PVCR- y al alimento NaCl (al menos 1% en peso), y Trp (1-10 g/kg). También incluye exponer a los peces pre adultos a un fotoperiodo (reivindicaciones 9-13).

De este modo, D2 coincide con la solicitud en que ambos se agregan al alimento NaCl en un rango de concentración concordante (D2 >1%p/p, solicitud 1-10 %p/p) y triptófano (Trp) también en un rango coincidente (D2 1-10 g/kg, solicitud 2-10 g/kg). En cuanto a las reivindicaciones, se diferencian en que en D2, los cationes calcio (Ca) y magnesio (Mg) son agregados al agua donde se mantienen los peces, mientras que en la solicitud de autos se agregan al alimento.

Sin embargo, en el ejemplo 17 del documento D2, el alimento (que contiene cloruro de sodio y triptófano (NaCl 7% y triptófano 2 g/kg) también se le agrega magnesio -Mg- en una concentración de 2%p/p (20 g/kg, que coincide con el rango de 0,026-25,53 g/kg de la solicitud). Por lo que estamos frente a un alimento, donde hay cloruro de sodio, triptófano y además hay un ejemplo donde se agrega magnesio.

De este modo, el documento D2 enseña un alimento que solo se diferencia de la presente solicitud en que no posee calcio. Es importante notar que los

resultados enseñados en D2 señalan que la adición de magnesio (Mg) al alimento (NaCl + Trp) no mejora la sobrevivencia de los salmones respecto al alimento sin magnesio (Mg), tal como se observa en la Tabla 19 de dicho documento. También es relevante, que un factor clave en este experimento es que los peces que se encuentran en agua que contiene calcio (3 mM) y magnesio (1mM), tienen todos, una tasa de sobrevivencia mucho más alta que los peces con dieta control, en agua sin los cationes mencionados.

SEXTO: Que, en cuanto al alcance del documento Deacon y su combinación con D2, a juicio del perito, hay que señalar que D2 en su ejemplo 8 enseña dos métodos generales para preparar los piensos para el consumo de los peces como parte de los Procesos I y II de AquaBio Products Sciences® (APS). En el caso de la preparación del alimento para el proceso APS II, se añadió cloruro de sodio NaCl 7%p/p a la dieta estándar de salmónidos frescos de Moore Clark a un volumen de agua del grifo aproximadamente 3- 4 veces el peso del cloruro de sodio NaCl. La mezcla se calentó a 60-70 °C con mezclado mediante el uso de una barra agitadora magnética para disolver la sal. Se añadió L-triptófano al agua a razón de 2 o 4 g/kg de "dieta estándar de salmónidos de agua dulce de Moore Clark", dependiendo de las necesidades de la formulación.

En consecuencia, el alimento base que tiene sodio más triptófano (Na+Trip), más magnesio, tal como se enseña en el ejemplo 17 de D2 (y tabla 19), contiene en su composición a la "dieta estándar de salmónidos frescos de Moore Clark".

Que, la declaración del Sr. Deacon, según su testimonio, la composición de cualquiera de los alimentos Moore Clark que podrían incluirse dentro de una "dieta estándar para salmónidos de agua dulce de Moore-Clark" de la tabla 19 de D2 comprenderían calcio en una cantidad aproximada de 2,4% (o 24 g/kg), lo cual se encuentra dentro del rango de 0,036-36,011 g/kg reivindicado en autos. Además, de la declaración del Sr. Deacon, se adjunta la hoja técnica del alimento "Moore-

Clark's Select 6 + 6 Freshwater Extruded Smolt Feed" y en la cual se comprueba efectivamente este contenido de 2,4% de calcio.

Por lo tanto, esto implica que, la solicitud queda completamente divulgada en D2, considerando que las composiciones de Moore-Clark's, poseen calcio en este porcentaje.

SÉPTIMO: Que, en virtud de los puntos anteriormente analizados, particularmente considerando el documento D2, referente al problema técnico que es la esmoltificación, que protege un método para mejorar la cría de peces anádromos preadultos (salmones, los cuales se mantienen en agua dulce antes de transferirlos al agua de mar, que se refiere a la esmoltificación), junto al documento Deacon y en menor medida por lo divulgado por D11, a juicio del perito designado en esta instancia, la solicitud no cumple con el requisito de novedad ni nivel inventivo, el cual, de todos modos, podría ser deducido desde el arte previo por una persona normalmente versada en el área, combinando los documentos D12 con D13. Efectivamente, D2, en su aspecto más técnico, posee en su composición el alimento base de Moore – Clark's, que hasta antes de la presentación de la Declaración Deacon, que tiene cloruro de sodio, triptófano y un ejemplo, donde se agrega magnesio. Por lo que, todo eso va sugiriendo la solución al mismo problema técnico, si a eso se le agrega la solución del Documento Deacon donde aparece la presencia del calcio se tendría el idéntico resultado a la solicitud, para solucionar el mismo problema técnico.

OCTAVO: Que, a juicio de estos sentenciadores, si bien la explicación del perito ha sido ilustrativa para entender la invención en su conjunto y se comprende como desde su punto de vista que llega a la conclusión sobre carencia de novedad, sin embargo, no existe la identidad de base y estructural entre los documentos del arte previo y la solicitud como para imputar falta de novedad a la invención de autos, lo que se confirma al apreciar que el perito emitió su informe combinando más de un documento, así las cosas, no hay suficiente descripción en un único

Signer: Marta Beatriz Araya Fernandez
Date: jue, dic 7, 2023 15:09:07 CLT
Location: PUNE

documento como para llegar a la conclusión que se afecta dicho requisito por la invención solicitada.

Que, en lo que se refiere a nivel inventivo, este Tribunal comparte las conclusiones que ha arribado el perito, en el sentido de estimar que la solicitud carece de dicho requisito.

NOVENO: Que, por las consideraciones efectuadas estos sentenciadores estiman parcialmente atendibles los fundamentos del recurso de apelación de fecha veintinueve de octubre de dos mil veintiuno, presentado por el oponente BIOMAR CHILE S.A., en la forma que se dirá en lo resolutive de este fallo.

SE RESUELVE:

Atendido lo expuesto precedentemente y teniendo presente, además, lo previsto en los artículos 6, 7, 16, 17 bis B, 31, 33 y 35 de la Ley 19.039, artículos 170, 186 y siguientes del Código de Procedimiento Civil pertinentes, se revoca parcialmente la resolución de fecha siete de octubre de dos mil veintiuno, por estimar que la solicitud carece de nivel inventivo, en lo demás se confirma la sentencia, por considerar que cumple con el requisito de novedad requerido en la Ley del ramo.

Déjese constancia que procede la devolución al apelante BIOMAR CHILE S.A., de la suma consignada para la interposición del recurso.

Anótese la sentencia y devuélvanse los autos.

ROL TPI N°001489-2021

Pronunciada por los ministros Sr. Marco Arellano Quiroz, Sra. Carmen Iglesias Muñoz y Sra. Pamela Fitch Rossel.

Signer: MARCO ANTONIO ARELLANO
QÚIROZ
Date: jue, dic 7, 2023 12:19:45 CLT
Location: PUNE

Signer: CARMEN GABRIELA IGLESIAS
MÚNOZ
Date: jue, dic 7, 2023 12:25:33 CLT
Location: PUNE

Signer: PAMELA FRANCISCA FITCH ROSSEL
Date: jue, dic 7, 2023 14:45:47 CLT
Location: PUNE

Materia : Patente de Invención

Solicitud : 201700674

Rol : 1489-2021

RECURSO DE ACLARACIÓN, RECTIFICACIÓN O ENMIENDA.

H. TRIBUNAL DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

María Trinidad Rojas Wüinkhaus, en representación de la oponente y apelante Biomar Chile S.A., en el expediente de la solicitud de patente de invención N° 201700674, rol N° 1489-2021, al H. Tribunal de Propiedad Industrial respetuosamente digo:

Vengo en interponer recurso de Aclaración, Rectificación o Enmienda respecto al fallo de revocación parcial emitido con fecha 7 de diciembre de 2023, con el objeto de que se precise el siguiente punto:

En la parte dispositiva del fallo se señala lo siguiente: *“se revoca parcialmente la resolución de fecha siete de octubre de dos mil veintiuno, por estimar que la solicitud carece de nivel inventivo, en lo demás se confirma la sentencia, por considerar que cumple con el requisito de novedad requerido en la Ley del ramo”*.

Si bien se infiere que la falta de nivel inventivo debiese llevar al rechazo de una solicitud, de la lectura del párrafo recién citado no queda claro si la revocación parcial decretada conlleva o no el rechazo de la solicitud de autos. A fin de evitar cualquier duda

futura, respetuosamente solicito que se aclare el punto anterior, señalado expresamente que se rechaza la solicitud de patente de autos, N° 201700674.

POR TANTO,

al H. Tribunal de Propiedad Industrial respetuosamente pido: Se sirva tener por interpuesto recurso de Aclaración, Rectificación o Enmienda respecto al fallo de revocación parcial emitido con fecha 7 de diciembre de 2023, acogerlo y, en virtud de lo anterior, aclarar que la revocación parcial conlleva el rechazo de la solicitud de patente de autos.

P00195 RecursoAclaración_TPI 4865-2974-5046 v.1

María
Trinidad
Rojas
Wunkhaus

Firmado
digitalmente por
María Trinidad
Rojas Wunkhaus
Fecha: 2023.12.11
13:47:21 -03'00'

Santiago, doce de diciembre del año dos mil veintitrés.

A la presentación de fecha 11-12-2023 Código 14560: Dese cuenta en sala del recurso de aclaración rectificación o enmienda.

ROL TDPI N° 1489-2021

Proveído por el Presidente del Tribunal de Propiedad Industrial Sr. Marco Arellano Quiroz.

NOTIFICADA POR EL ESTADO DIARIO CON ESTA FECHA

MTG

This document is digitally signed

Signer: MARCO ANTONIO ARELLANO
QUIROZ
Date: mar, dic 12, 2023 14:33:08 CLT
Location: PUNE

This document is digitally signed

Signer: Marta Beatriz Araya Fernandez
Date: mar, dic 12, 2023 14:40:34 CLT
Location: PUNE

Solicitud de patente N° **674-2017**

De: **EUROPHARMA AS**

Rol TPI: **1489-2021**

EN LO PRINCIPAL : DEDUCE RECURSO DE CASACIÓN EN EL FONDO;

PRIMER OTROSÍ : CASACIÓN DE OFICIO;

SEGUNDO OTROSÍ : ASUME PATROCINIO Y PODER;

TERCER OTROSÍ : ACOMPAÑA DOCUMENTOS, CON CITACION.

HONORABLE TRIBUNAL DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

CRISTIAN BARROS MICHELL, abogado, cédula de identidad 13.658.156-2, domiciliado en Avda. Andrés Bello 2711, piso 19, Las Condes, Santiago, en representación de EUROPHARMA AS, persona jurídica extranjera, todos con domicilio para estos efectos en Avda. Andrés Bello 2711, piso 19, Las Condes, Santiago, en autos relativos a la solicitud de patente de invención N° **674-2017**, **Rol TPI 1489-2021**, al Honorable Tribunal de Propiedad Industrial respetuosamente digo:

En la representación que invisto y encontrándome dentro del plazo legal de 15 días establecido en el artículo 770 del Código de Procedimiento Civil, en relación con los artículos 5, 11, 16, 17 bis letra B, 31, 32 y 35 de la Ley N° 19.039, interpongo recurso de casación en el fondo para ante la Excelentísima Corte Suprema, en contra de la sentencia definitiva de segunda instancia notificada por el H. Tribunal de Propiedad Industrial con fecha 7 de diciembre de 2023 (cuyos considerandos pertinentes se transcriben más adelante), por medio

de la que se aceptó parcialmente el recurso de apelación presentado por el oponente y resolvió que la solicitud de autos no cumple con el requisito de nivel inventivo contemplado en el artículo 35 de la Ley 19.039 sobre Propiedad Industrial y por ende se rechazó a registro la solicitud de autos.

El presente recurso de casación en el fondo se interpone en razón que la sentencia de segunda instancia ha sido dictada con infracción de ley, lo que ha influido substancialmente en lo dispositivo del citado fallo, todo ello según las consideraciones de hecho y fundamentos de derecho que paso a exponer a continuación.

1.-

ANTECEDENTES DE HECHO

La solicitud de autos fue presentada el 20 de marzo de 2017, invocando como prioridad la solicitud US 62/053,826 de 23 de septiembre de 2014 y fue publicada en el Diario Oficial el 26 de enero de 2018. Dentro del plazo legal, la solicitud de autos fue objeto de una demanda de oposición interpuesta por Biomar Chile S.A., la cual fue debidamente contestada con fecha 16 de agosto de 2018. Luego, la solicitud fue objeto de varios informes periciales y de un Informe Técnico del Examinador antes de ser aceptada a registro por INAPI.

El primer informe pericial fue emitido el 9 de agosto de 2019 y notificado el 13 de agosto de 2019. En dicho informe, el Sr. Perito Claudio Allard sostuvo que las reivindicaciones 1-10 y 12 no cumplían con el requisito de novedad y que las reivindicaciones 1-12 y 12 y 13 no cumplían con el requisito de nivel inventivo. Además, se sostuvo que la reivindicación 11 presentaría doble protección y falta de claridad. Con fecha 12 de noviembre de 2019 se presentó el escrito contestando el informe pericial y acompañando un nuevo pliego de reivindicaciones.

Luego, el segundo informe pericial se emitió el 14 de mayo de 2020 y fue notificado el 18 de mayo de 2020. En dicho informe el perito señaló que las reivindicaciones 1 a 10 no cumplirían con el requisito de nivel inventivo. Con fecha 9 de noviembre de 2020 se presentó el escrito de respuesta del informe pericial y se acompañó un nuevo pliego de reivindicaciones.

Posteriormente, con fecha 31 de agosto de 2021 se emitió el Informe Técnico del Examinador en el cual tras analizar las modificaciones al pliego de reivindicaciones presentado por nuestro mandante además de nuestros argumentos, se consideró que la solicitud de autos sí cumplía con todos los requisitos de patentabilidad y se recomendó su aceptación.

Finalmente, el 7 de octubre de 2021, el Instituto Nacional de Propiedad Industrial emitió su sentencia de aceptación a registro y de rechazo de la oposición de Biomar Chile S.A, la cual se fundó en el Informe Técnico del Examinador. Específicamente, en sus considerandos la resolución de aceptación señala lo siguiente:

“CONSIDERANDO:

- 1.- Que, de acuerdo con el mérito de los antecedentes, cabe concluir que el Informe Técnico del Examinador señala que la solicitud cumple con los requisitos de patentabilidad establecidos en el artículo 32 de la Ley N°19.039.*
- 2.- Que, en consecuencia, este Tribunal, apreciando los antecedentes de acuerdo a las normas de la sana crítica, hace suyas las fundamentaciones expuestas por el Examinador, en el sentido de que la solicitud cumple con los requisitos de patentabilidad de novedad, nivel inventivo y aplicación industrial establecidos en el artículo 32 de la Ley N°19.039.*
- 3.- Que, asimismo, procede rechazar la demanda de oposición de BIOMAR CHILE S.A., atendido que de acuerdo al informe técnico del examinador los documentos fundantes de la*

oposición, carecen de mérito y no permiten acreditar la falta de claridad, de nivel inventivo y la exclusión de patentabilidad alegada.

4.- Que, se tuvo por evacuado el Informe Técnico del Examinador y se citó a las partes a oír sentencia.

5.- Que, de acuerdo al mérito de los antecedentes, se deja expresa constancia que la solicitud no infringe lo dispuesto en el artículo 38 de la Ley N° 19.039.

Por las consideraciones antes expuestas, y teniendo presente lo dispuesto en la Ley N° 19.039, en sus artículos 31, 32, 33, 35, 36 y las disposiciones pertinentes del Reglamento.

RESUELVO: Rechazar la oposición y conceder la solicitud de patente de invención N° 20170674, conforme al pliego de reivindicaciones de fecha 9 de noviembre de 2020”.

Posteriormente, y dentro del plazo legal, el oponente de autos presentó un recurso de apelación en contra de la sentencia de aceptación emitida por el Instituto Nacional de Propiedad Industrial. En dicho recurso de apelación, el oponente presentó sus argumentos de porque según ellos la solicitud de autos no cumple con los requisitos correspondientes de patentabilidad contemplados en la Ley de Propiedad Industrial.

Durante la tramitación ante el Tribunal de Propiedad Industrial, nuestro mandante presentó distintos escritos y acompañó una serie de pruebas documentales que permiten acreditar las razones por las cuales el invento de la solicitud de autos sí cumple con el requisito de nivel inventivo.

No obstante, el Tribunal de Propiedad Industrial con fecha 7 de diciembre de 2023 emitió una sentencia revocatoria parcial, que en lo esencial consideró que la solicitud de autos no cumplía con el requisito de nivel inventivo y que por ende no debía ser aceptada a registro. En su parte pertinente, la sentencia del Tribunal de Propiedad Industrial señaló:

“CON LO RELACIONADO Y CONSIDERANDO:

PRIMERO: *Que, el centro de la discrepancia entre el apelante y oponente de autos BIOMAR CHILE S.A., radica en que, a su juicio, la solicitud de autos concedida a EUROPHARMA AS., no cumple con los requisitos de patentabilidad de novedad y nivel inventivo frente al estado del arte de conformidad con la Ley de Propiedad Industrial, por lo que solicita se rechace la patente solicitada.*

SEGUNDO: *Que, el problema técnico de la solicitud consiste en proveer un alimento para peces y un método que elimina o reduce las desventajas del método de esmoltificación de peces SuperSmolt®, permitiendo mantener a los salmones en agua dulce por más tiempo, sin que estos se desesmoltifiquen, mueran, reduzcan su tasa de crecimiento, pierdan escamas o padezcan del síndrome hemorrágico de smolt.*

TERCERO: *Que, el pliego de reivindicaciones concedido por INAPI, constante de 8 clausulas, enseña en la Reivindicación 1 un alimento para peces que comprende proteína, grasa, carbohidratos, vitaminas, minerales, agua y además contiene 10100 g/kg de sales de sodio, 0,1-100 g/kg de sales de magnesio, y 0,1-100 g/kg de sales de calcio (específicamente 3,934– 39,340 g/kg de Na⁺, 2-10 g/kg de un modulador del receptor de cationes polivalentes (PVCR, triptófano o fenilalanina como aa. libre), 0,026 – 25,530 g/kg de Mg²⁺, y 0,036 – 36,110 g/kg de Ca²⁺, 6,202 – 199,020 g/kg de Cl⁻. Las reivindicaciones 2-6 son especificaciones de este alimento y las reivindicaciones 7 y 8 hacen referencia a la preparación de un medicamento para el síndrome hemorrágico de smolt en salmonidae. Que, el solicitante presentó nuevo pliego de reivindicaciones en esta instancia, con fecha 22 de marzo de 2023, constante de 5 Reivindicaciones, en que limita el pliego anterior, eliminando referencia a medicamento para el síndrome hemorrágico de smolt y los aminoácidos se*

limitan solo a triptófano. Este pliego es más bien una limitación, no explica una ampliación del pliego concedido por INAPI, ni del pliego de la solicitud original.

CUARTO: *Que, forman parte del estado del arte los documentos D11, D12, D13, D5, D7, D2 y la declaración documento Deacon. Que, el documento más cercano es D2 (W O 02/30182), que protege un método para mejorar la cría de peces anádromos pre adultos (salmones, los cuales se mantienen en agua dulce antes de transferirlos al agua de mar), D2 se diferencia de la solicitud en que los cationes calcio (Ca) y magnesio (Mg) son agregados al agua donde se mantienen los peces, mientras que, en la solicitud de autos, se agregan al alimento. Que, el documento Greg Deacon, corresponde a una declaración del nutricionista en Skretting (antes llamado Moore-Clark) que señala que la composición de cualquiera de los alimentos Moore Clark que podrían incluirse dentro de una “dieta estándar para salmónidos de agua dulce de Moore-Clark” de la tabla 19 de D2 comprenderían calcio en una cantidad aproximada de 2,4% (o 24 g/kg), lo cual se encuentra dentro del rango de 0,036-36,011 g/kg reivindicado en autos. Adjunta hoja técnica del alimento “Moore-Clark’s Select 6 + 6 Freshwater Extruded Smolt Feed” y en la cual se comprueba efectivamente este contenido de 2,4% de calcio.*

QUINTO: *Que, D2, protege un método para mejorar la cría de peces anádromos preadultos (salmones, los cuales se mantienen en agua dulce antes de transferirlos al agua de mar). La base para el alimento de consumo se describe en el ejemplo 8 del documento y corresponde a la dieta estándar de salmónidos de agua dulce de Moore Clark. En que uno de los métodos derivados de este método general incluye agregar al agua calcio y magnesio en cantidades suficientes para modular la expresión y/o sensibilidad de al menos uno de los receptores - PVCR- y al alimento NaCl (al menos 1% en peso), y Trp (1-10 g/kg). También incluye exponer a los peces pre adultos a un fotoperiodo (reivindicaciones 9-13). De este modo, D2*

coincide con la solicitud en que ambos se agregan al alimento NaCl en un rango de concentración concordante (D2 >1%p/p, solicitud 110 %p/p) y triptófano (Trp) también en un rango coincidente (D2 1-10 g/kg, solicitud 2-10 g/kg). En cuanto a las reivindicaciones, se diferencian en que en D2, los cationes calcio (Ca) y magnesio (Mg) son agregados al agua donde se mantienen los peces, mientras que en la solicitud de autos se agregan al alimento. Sin embargo, en el ejemplo 17 del documento D2, el alimento (que contiene cloruro de sodio y triptófano (NaCl 7% y triptófano 2 g/kg) también se le agrega magnesio -Mg- en una concentración de 2%p/p (20 g/kg, que coincide con el rango de 0,026-25,53 g/kg de la solicitud). Por lo que estamos frente a un alimento, donde hay cloruro de sodio, triptófano y además hay un ejemplo donde se agrega magnesio. De este modo, el documento D2 enseña un alimento que solo se diferencia de la presente solicitud en que no posee calcio. Es importante notar que los resultados enseñados en D2 señalan que la adición de magnesio (Mg) al alimento (NaCl + Trp) no mejora la sobrevivencia de los salmones respecto al alimento sin magnesio (Mg), tal como se observa en la Tabla 19 de dicho documento. También es relevante, que un factor clave en este experimento es que los peces que se encuentran en agua que contiene calcio (3 mM) y magnesio (1mM), tienen todos, una tasa de sobrevivencia mucho más alta que los peces con dieta control, en agua sin los cationes mencionados.

SSEXTO: Que, en cuanto al alcance del documento Deacon y su combinación con D2, a juicio del perito, hay que señalar que D2 en su ejemplo 8 enseña dos métodos generales para preparar los piensos para el consumo de los peces como parte de los Procesos I y II de AquaBio Products Sciences® (APS). En el caso de la preparación del alimento para el proceso APS II, se añadió cloruro de sodio NaCl 7%p/p a la dieta estándar de salmónidos frescos de Moore Clark a un volumen de agua del grifo aproximadamente 3- 4 veces el peso

del cloruro de sodio NaCl. La mezcla se calentó a 60-70 °C con mezclado mediante el uso de una barra agitadora magnética para disolver la sal. Se añadió L-triptófano al agua a razón de 2 o 4 g/kg de “dieta estándar de salmónidos de agua dulce de Moore Clark”, dependiendo de las necesidades de la formulación. En consecuencia, el alimento base que tiene sodio más triptófano (Na+Trip), más magnesio, tal como se enseña en el ejemplo 17 de D2 (y tabla 19), contiene en su composición a la “dieta estándar de salmónidos frescos de Moore Clark”. Que, la declaración del Sr. Deacon, según su testimonio, la composición de cualquiera de los alimentos Moore Clark que podrían incluirse dentro de una “dieta estándar para salmónidos de agua dulce de Moore-Clark” de la tabla 19 de D2 comprenderían calcio en una cantidad aproximada de 2,4% (o 24 g/kg), lo cual se encuentra dentro del rango de 0,036-36,011 g/kg reivindicado en autos. Además, de la declaración del Sr. Deacon, se adjunta la hoja técnica del alimento “MooreClark’s Select 6 + 6 Freshwater Extruded Smolt Feed” y en la cual se comprueba efectivamente este contenido de 2,4% de calcio. Por lo tanto, esto implica que, la solicitud queda completamente divulgada en D2, considerando que las composiciones de Moore-Clark’s, poseen calcio en este porcentaje.

SÉPTIMO: *Que, en virtud de los puntos anteriormente analizados, particularmente considerando el documento D2, referente al problema técnico que es la esmoltificación, que protege un método para mejorar la cría de peces anádromos preadultos (salmones, los cuales se mantienen en agua dulce antes de transferirlos al agua de mar, que se refiere a la esmoltificación), junto al documento Deacon y en menor medida por lo divulgado por D11, a juicio del perito designado en esta instancia, la solicitud no cumple con el requisito de novedad ni nivel inventivo, el cual, de todos modos, podría ser deducido desde el arte previo por una persona normalmente versada en el área, combinando los documentos D12 con D13. Efectivamente, D2, en su aspecto más técnico, posee en su composición el alimento base de*

Moore – Clark´s, que hasta antes de la presentación de la Declaración Deacon, que tiene cloruro de sodio, triptófano y un ejemplo, donde se agrega magnesio. Por lo que, todo eso va sugiriendo la solución al mismo problema técnico, si a eso se le agrega la solución del Documento Deacon donde aparece la presencia del calcio se tendría el idéntico resultado a la solicitud, para solucionar el mismo problema técnico.

OCTAVO: *Que, a juicio de estos sentenciadores, si bien la explicación del perito ha sido ilustrativa para entender la invención en su conjunto y se comprende como desde su punto de vista que llega a la conclusión sobre carencia de novedad, sin embargo, no existe la identidad de base y estructural entre los documentos del arte previo y la solicitud como para imputar falta de novedad a la invención de autos, lo que se confirma al apreciar que el perito emitió su informe combinando más de un documento, así las cosas, no hay suficiente descripción en un único documento como para llegar a la conclusión que se afecta dicho requisito por la invención solicitada. Que, en lo que se refiere a nivel inventivo, este Tribunal comparte las conclusiones que ha arribado el perito, en el sentido de estimar que la solicitud carece de dicho requisito.*

NOVENO: *Que, por las consideraciones efectuadas estos sentenciadores estiman parcialmente atendibles los fundamentos del recurso de apelación de fecha veintinueve de octubre de dos mil veintiuno, presentado por el oponente BIOMAR CHILE S.A., en la forma que se dirá en lo resolutivo de este fallo.*

SE RESUELVE:

Atendido lo expuesto precedentemente y teniendo presente, además, lo previsto en los artículos 6, 7, 16, 17 bis B, 31, 33 y 35 de la Ley 19.039, artículos 170, 186 y siguientes del Código de Procedimiento Civil pertinentes, se revoca parcialmente la resolución de fecha siete de octubre de dos mil veintiuno, por estimar que la solicitud carece de nivel inventivo,

en lo demás se confirma la sentencia, por considerar que cumple con el requisito de novedad requerido en la Ley del ramo”.

Por las razones que expondremos a continuación, la sentencia recién transcrita, al rechazar la solicitud de autos por considerar que la invención no cumple con el requisito de nivel inventivo contemplado en el artículo 35 de la Ley 19.039 sobre Propiedad Industrial, incurre en diversas infracciones a la Ley de Propiedad Industrial, las cuales influyeron sustancialmente en lo dispositivo del fallo.

2.-

INFRACCIONES DE LEY INCURRIDAS POR LA SENTENCIA RECURRIDA

2.1. Infracción al artículo 16 de la Ley N° 19.039 sobre Propiedad Industrial. No se analizaron las reivindicaciones ni los argumentos esgrimidos ni documentos acompañados por el solicitante que acreditan que la solicitud de autos sí cumple con el requisito de nivel inventivo.

El artículo 16 de la Ley N° 19.039 citado establece o siguiente:

“En los procedimientos a que se refiere este Párrafo, la prueba se apreciará según las reglas de la sana crítica”.

En efecto, en los considerandos transcritos del fallo recurrido, puede advertirse que el Tribunal de Propiedad Industrial erra en su análisis del último pliego de reivindicaciones presentado por el solicitante y que consta en el expediente al igual que respecto de los documentos aportados por nuestro mandante al respecto y que no ponderó la prueba de acuerdo a las reglas de la sana crítica.

En este sentido, es necesario destacar que la reivindicación 1 del pliego de reivindicaciones señala expresamente que *“Un alimento adecuado para salmonidae que comprende proteína, grasa, carbohidratos, vitaminas, minerales y agua, CARACTERIZADO*

porque el alimento adecuado para salmonidae además comprende de 10-100 g/kg en peso de sales de sodio (Na+), de 0,1-100 g/kg en peso de sales de magnesio (Mg+), y 0,1-100 g/kg en peso de sales de calcio (Ca2+), donde el alimento para peces comprende de 3,934 39,340 g/kg en peso de Na+, de 2-10 g/kg en peso de un modulador del receptor de cationes polivalentes (PVCR) en la forma de triptófano, de 0,026 25,530 g/kg en peso de Mg2+, y de 0,036 36,110 g/kg en peso de Ca2+, de 6,202 199,020 g/kg en peso de Cl-, en donde el modulador del receptor de cationes polivalentes está en la forma de aminoácidos libres”.

En este capítulo explicaremos las razones por las cuales es evidente que la sentencia recurrida de autos incurrió en una infracción a las reglas de la sana crítica (y por ende, al artículo 16 de la Ley de Propiedad Industrial).

En primer lugar, en la sentencia del Tribunal de Propiedad Industrial al igual que en el deficiente informe pericial emitido ante dicho Tribunal es evidente que los sentenciadores no revisaron ni examinaron la prueba aportada por nuestro mandante.

Nuestro mandante acompañó debidamente en autos el documento titulado “Nutrient Requirements off Fish and Shrimp; The National Academies Press” el cual acredita que los peces de agua dulce cultivados, como la carpa, simplemente no toleran niveles elevados de lípidos en la dieta. Además, los alimentos adecuados para las carpas suelen incluir un nivel de carbohidratos que no es adecuado para los salmónidos. Por lo tanto, una persona normalmente versada en la materia reconocería en virtud de este documento acompañado en autos que **el invento de autos contiene una ventaja técnica respecto del arte previo** y por ende cumple con el requisito de nivel inventivo.

Luego, **en segundo lugar**, en autos también fueron debidamente acompañadas una serie de documentos titulados “Declaraciones del Dr. William Harris” que no fueron considerados ni mencionados siquiera en la sentencia recurrida en autos. Lo que más llama

la atención respecto de estos documentos, es que la sentencia sí considera y menciona el documento “declaración Deacon” pero no lo hace con las declaraciones acompañadas por nuestro mandante, sin siquiera esgrimir un atisbo de fundamento del trato diferenciado que estos documentos símbiles recibieron. Es del caso, que si los sentenciadores hubiesen revisado debidamente los documentos “Declaraciones del Dr. William Harris” acompañados por nuestro mandante habrían concluido que el alimento divulgado en el arte previo que comprende un 7.4% de lípidos y un 21,1% de carbohidratos, no sería adecuado en un alimento para salmónidos y para la esmoltificación de salmónidos y que por ende la solicitud de autos si cumple con el requisito de nivel inventivo.

Además, **en tercer lugar**, los sentenciadores no consideraron el documento Basic 2013 (Aquaculture 388-391: páginas 8-13) debidamente acompañado en autos en el cual se acredita que aunque se produce un aumento transitorio del cortisol durante la esmoltificación, no se sabe si este aumento transitorio del cortisol es un requisito previo para la esmoltificación o una consecuencia de la transformación parr. Si el aumento transitorio del cortisol es un prerrequisito para la esmoltificación, simplemente no sería una buena idea alimentar a los peces con una dieta que proporcione un aumento de los niveles de cortisol. Además, también se sabe que el cortisol suprime la inmunocompetencia, lo que hace que los peces sean potencialmente más susceptibles a las infecciones u otros factores de estrés externos, lo que apunta en la dirección de no añadir nada a la alimentación que pueda aumentar los niveles de cortisol.

En cuarto lugar, la sentencia de autos recurrida en autos no considera que en el documento Lepage 2005 acompañado en autos se acredita que parece que el Triptófano induce un aumento del cortisol en los peces no estresados y produce una disminución del cortisol en los peces estresados. Por lo tanto, el Triptófano parece tener efectos diferentes en

los peces no estresados y en los estresados y también acredita que el invento de la solicitud de autos sí cumple con el requisito de nivel inventivo.

En quinto lugar, la sentencia de autos recurrida en autos no considera ni menciona los documentos con las declaraciones de Jesse Trushenski y Richard Torrisen, ambos documentos debidamente acompañados en autos y que acreditan que el invento de la solicitud de autos sí cumple con el requisito de nivel inventivo.

Ahora, el artículo 16 de la Ley de Propiedad Industrial señala que el análisis de la prueba debe hacerse de acuerdo a la sana crítica. Bueno, como bien sabe esta Excma. Corte Suprema, la base de la sana crítica son la experiencia, la lógica y la ciencia.

El diccionario de la Real Academia Española define a la “experiencia” como el *“Hecho de haber sentido, conocido o presenciado alguien algo. La práctica prolongada que proporciona conocimiento o habilidad para hacer algo”*. Los Jueces del Tribunal de Propiedad Industrial han desarrollado una práctica prolongada en propiedad industrial, por lo que evidentemente tienen el conocimiento y la habilidad para revisar y analizar los documentos debidamente acompañados por nuestro mandante y entender que todos ellos acreditan que el invento de autos sí cumple con el requisito de nivel inventivo. Es evidente que, al no revisar los documentos debidamente acompañados por nuestro mandante, se iba a necesariamente concluir erróneamente que la solicitud de autos no cumplía con el requisito de nivel inventivo y por ende, se incurrió en una infracción a la experiencia lo cual constituye una infracción a la sana crítica.

A su vez, el Diccionario de la Real Academia define el concepto de “lógico” como *“conforme o perteneciente a la lógica”*. En este sentido, si no se analizan todos los documentos, o en este caso, cualquiera de los documentos mencionados en este apartado, es evidente que no se puede haber realizado un análisis de la solicitud y la prueba de

acuerdo a la lógica y se incurrió en una infracción a la lógica lo cual constituye una infracción a la sana crítica.

Además, la sentencia recurrida, al solo considerar la prueba aportada por el oponente y no considerar ninguna de las pruebas aportadas por nuestro mandante, claramente ha vulnerado también a la “experiencia”, la cual señala que se debe considerar toda la prueba aportada por las partes y la lógica, que evidentemente requiere que las pruebas aportadas por las partes sean debidamente consideradas; por lo que la sentencia recurrida incurrió en una infracción a la sana crítica y el artículo 16 de la Ley de Propiedad Industrial.

2.2. Infracción al artículo 35 de la Ley N° 19.039 sobre Propiedad Industrial

La sentencia recurrida en autos en definitiva resuelve acoger parcialmente el recurso de apelación de Biomar Chile S.A. en relación al requisito de nivel inventivo y por esta razón se rechaza la concesión de la solicitud de autos.

El artículo 35 de la Ley N° 19.039 dispone que:

“Se considera que una invención tiene nivel inventivo, si para una persona normalmente versada en la materia técnica correspondiente, ella no resulta obvia ni se habría derivado de manera evidente del estado de la técnica”.

Por las razones que explicaremos en este acápite es que es evidente que la sentencia recurrida en autos incurre en una infracción al artículo 35 de la Ley de Propiedad Industrial.

En efecto, **en primer lugar**, la sentencia recurrida del Tribunal de Propiedad Industrial no consideró la abundante prueba detallada en el acápite anterior de este recurso (y que por razones de economía administrativa no replicaremos) que acreditaban sin lugar a dudas que la solicitud de autos sí tiene ventajas técnicas sobre el arte previo y que por ende cumple con el requisito de nivel inventivo.

A su vez, **en segundo lugar**, y respecto del documento “declaración Deacon” es necesario señalar que los alimentos señalados en el ejemplo 8 del documento del arte previo D2 NO se encuentran divulgados en los anexos de la “declaración Deacon” (por lo tanto, no existía razón alguna para que una persona normalmente versada en el estado de la técnica juntara estos dos documentos para realizar su análisis). Asimismo, uno de los alimentos divulgados en D2 es una “dieta salmonides Moore Clark standard” mientras que en la “declaración Deacon” es simplemente otro alimento, siendo este último “Moore Clark Select 6+6 Freshwater Extruded Smolt Feed”. Es decir, la sentencia al unir estos dos documentos del arte previo erra respecto de las divulgaciones de estos documentos del arte previo. Luego, es necesario señalar que la “declaración Deacon” es de 1992, mientras que la divulgación del documento D2 es del año 2000 y dicho producto no estaba disponible comercialmente el 2014. La razón que esto es relevante es que es bien difícil concluir que un invento es obvio y evidente si las divulgaciones no están en el mercado al momento de la prioridad de la solicitud de autos.

En tercer lugar, la sentencia recurrida en autos no hace mención alguna al Informe Técnico del Examinador emitido con fecha 31 de agosto de 2021 que en su considerando cuarto señala que el Examinador Interno (que es un perito de nivel senior de INAPI), Sr. Mauricio Aguilera, concluye que la solicitud sí cumple con el requisito de nivel inventivo. En este sentido, es esencial considerar que en el caso de autos, la opinión de los peritos no han sido uniformes considerando que existe un informe pericial que sí consideró que la solicitud de autos cumple con el requisito de nivel inventivo.

En conclusión, es evidente que la sentencia recurrida de autos incurrió en una infracción al artículo 35 de la Ley de Propiedad Industrial, considerando que no es lógico ni

de acuerdo a la experiencia concluir que el invento de la solicitud de autos es obvia y evidente para una persona normalmente versada en el estado de la técnica.

2.3. Infracción al artículo 32 de la Ley N° 19.039.

El artículo 32 de la Ley N° 19.039 sobre Propiedad Industrial establece que *“Las patentes podrán obtenerse para todas las invenciones, sean de productos o de procedimientos, en todos los campos de la tecnología, siempre que sean nuevas, tengan nivel inventivo y sean susceptibles de aplicación industrial”*.

Como se puede observar, y en virtud de los argumentos esgrimidos en los apartados anteriores de esta presentación, siendo que el invento de la solicitud de autos cumple con todos los requisitos legales para ser concedida, es evidente que la sentencia del Honorable Tribunal de Propiedad Industrial infringió este artículo al rechazar a registro la solicitud de autos.

3.

FORMA EN COMO LAS INFRACCIONES A LA LEY INFLUYERON SUSTANCIALMENTE EN LO DISPOSITIVO DEL FALLO.

De acuerdo a lo establecido en el artículo 767 del Código de Procedimiento Civil, las infracciones a la ley en que incurrió la sentencia recurrida deben haber influido sustancialmente en lo dispositivo del fallo.

Todas las disposiciones legales citadas, cuya infracción justifica la interposición del presente recurso de casación en el fondo, han influido substancialmente en lo dispositivo de la sentencia, las que de haberse respetado tendrían que haber confirmado la resolución de primera instancia en su integridad y haber rechazado el recurso de apelación del oponente y por ende haber aceptado la solicitud de autos a registro.

En efecto:

3.1. La infracción de la norma del artículo 16 de la Ley N° 19.039 influyó sustancialmente en lo dispositivo del fallo, considerando que, de haberse seguido las normas de la sana crítica, especialmente aquellas relacionadas con la experiencia y la lógica, el Tribunal habría hecho un análisis razonado del pliego de reivindicaciones y los antecedentes debidamente acompañados por mi mandante en autos (documentos tales como: “Nutrient Requirements off Fish and Shrimp; The National Academies Press”; “Declaraciones del Dr. William Harris”; “Basic 2013” (Aquaculture 388-391: páginas 8-13; “Lepage 2005” y las declaraciones de Jesse Trushenski y Richard Torrison) y habría concluido que el invento de autos sí cumple con el requisito de nivel inventivo y que por ende correspondía ser aceptada a registro.

3.2. La infracción de la norma del artículo 35 de la Ley N° 19.039 influyó sustancialmente en lo dispositivo del fallo, ya que de haberse analizado íntegramente el pliego de reivindicaciones en conjunto con los argumentos esgrimidos por el solicitante y los documentos debidamente acompañados además del Informe Técnico del Examinador se habría concluido necesariamente que el pliego de reivindicaciones de la solicitud de autos sí cumple con el requisito de nivel inventivo. De haber arribado a dicha conclusión, necesariamente se debió haber resuelto aceptar a registro la solicitud de autos.

3.3. La infracción de la norma del artículo 32 de la Ley N° 19.039 influyó sustancialmente en lo dispositivo del fallo, ya que se habría llegado a la conclusión que el invento de la solicitud de autos cumple con todos los requisitos legales, incluyendo cumplir con el requisito de nivel inventivo, por lo que la solicitud de autos debió aceptarse.

POR TANTO,

En virtud de lo expuesto y de conformidad a los artículos 767, 770 del Código de Procedimiento Civil, artículos 5, 11, 16, 17 bis letra B, 31, 32 y 35 de la Ley N° 19.039 sobre Propiedad Industrial y demás normas legales pertinentes y aplicables en la especie,

A ESTE H. TRIBUNAL DE PROPIEDAD INDUSTRIAL PIDO: tener por interpuesto Recurso de Casación en el Fondo en contra de la sentencia definitiva de segunda instancia dictada y notificada con fecha 7 de diciembre de 2023, declararlo admisible y concederlo para ante la Excelentísima Corte Suprema de Justicia, a fin de que dicho Tribunal: **invalide el fallo recurrido y dicte la correspondiente sentencia de reemplazo que acepte a registro la solicitud N° 674-2017.**

PRIMER OTROSÍ: De conformidad con lo establecido en el artículo 785 inciso segundo del Código de Procedimiento Civil y artículo 17 bis B de la Ley N° 19.039 y, en subsidio de lo solicitado en lo principal de esta presentación, y para el evento que el recurso de casación en el fondo deducido no prospere, solicito que S.S. Excelentísima, en ejercicio de la facultad que le confieren las disposiciones citadas, invalide de oficio el fallo impugnado por las mismas razones en que se funda el recurso de casación interpuesto, atendido el hecho objetivo e inequívoco que en los presentes autos se ha dictado una sentencia definitiva de segunda instancia con infracción a la ley, la que ha influido sustancialmente en lo dispositivo del fallo.

POR TANTO,

Conforme lo expuesto y lo dispuesto por el artículo 785 del Código de Procedimiento Civil y artículo 17 bis letra B de la Ley N° 19.039, y de las demás normas legales que resulten aplicables en la especie,

A ESTE H. TRIBUNAL DE PROPIEDAD INDUSTRIAL PIDO: que, en subsidio de lo solicitado en lo principal de esta presentación, y para el evento que el recurso

de casación en el fondo allí deducido no prosperare, solicito que el Excelentísimo Tribunal Ad Quem proceda a casar de oficio la sentencia notificada con fecha 7 de diciembre de 2023.

SEGUNDO OTROSÍ: Hago presente que en mi calidad de abogado habilitado para el ejercicio de la profesión (RUT 13.658.156-2) asumo personalmente el patrocinio del presente recurso de casación en el fondo, en el que actuaré personalmente, conforme me autorizan los poderes foliados ante el Instituto Nacional de Propiedad Industrial bajo el número **87957** y la delegación de poder de Sargent & Krahn foliada bajo el número **38562** y **77764** (todos también acompañados en autos), en el cual consta además que mi mandante corresponde a una persona jurídica extranjera, rigiendo en su totalidad lo dispuesto en el artículo 2 de la Ley 19.039.

POR TANTO,

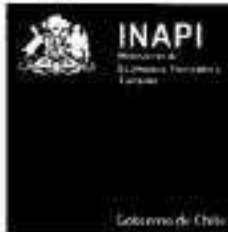
A ESTE H. TRIBUNAL DE PROPIEDAD INDUSTRIAL PIDO: Tenerlo presente.

TERCER OTROSÍ: A Ud. pido se sirva tener por acompañados, con citación, los siguientes documentos:

1. Copia del poder otorgado por **EUROPHARMA AS.** en favor de **SARGENT & KRAHN**, inscrito bajo el registro de custodia de poder o personería N° **87957**.
2. Copia delegación de poder de **SARGENT & KRAHN** en mi favor enrolada en INAPI bajo el N° **38562**.
3. Copia de delegación y revocación de poderes de **SARGENT & KRAHN** enrolada en INAPI bajo el folio N° **77764**.

POR TANTO,

A ESTE H. TRIBUNAL DE PROPIEDAD INDUSTRIAL PIDO: Tener por acompañados, con citación, los documentos anteriormente individualizados.



RECIBO DE CUSTODIA DE PODER O PERSONERIA

N° de Poder: 87957

Santiago, 11 de mayo de 2017

El Instituto Nacional de Propiedad Industrial - INAPI - acredita haber recibido con esta fecha el documento que el solicitante ha registrado como Poder con la siguiente información:

Solicitante o Titular

RUT	: No disponible
Nombre	: EUROPHARMA AS
País	: NORUEGA
E-mail	: sargent@sargent.cl

Representante

RUT	: 79.713.300-0
Nombre	: SARGENT & KRAHN
E-mail	: sargent@sargent.cl

El número asignado deberá ser indicado por el interesado en el casillero "N° de Poder" en el Formulario de cada solicitud impresa o electrónica. Es responsabilidad del solicitante o del titular informar a INAPI todo cambio en la persona de su representante.

Este recibo no certifica la validez del poder ni su pertinencia a ellos caso(s) en que posteriormente se desee invocar. En consecuencia, INAPI revisará caso a caso el cumplimiento de los requisitos formales y de fondo según el tipo de actuación de que se trate.



INSTITUTO NACIONAL DE PROPIEDAD INDUSTRIAL, Santiago, 11 de mayo de 2017 (10:17:19)

A-38391

MANDATO ESPECIAL / SPECIAL POWER OF ATTORNEY

PARA / TO

SARGENT & KRAHN

El (los) suscrito(s) _____

(The undersigned)

en representación de EUROPHARMA AS

(on behalf of)

("the Company")

domiciliado(s) en P.O Box 344, N-8376 Leknes, Noruega

(with its domicile at)

conferen mandato especial a la firma SARGENT & KRAHN, quien ejercerá este mandato a través de sus apoderados, para que represente a la Compañía en CHILE en todos los asuntos relacionados con marcas comerciales, patentes, modelos de utilidad, diseños y dibujos industriales, esquemas de trazado o topografías de los circuitos integrados, indicaciones geográficas y denominaciones de origen, secretos empresariales y de la información no divulgada, variedades vegetales, derechos de autor y nombres de dominio (en adelante referidos colectivamente como "Derechos de Propiedad Industrial e Intelectual"), facultando a SARGENT & KRAHN especialmente para:

A.- 1) solicitar y tramitar ante las autoridades correspondientes la obtención, renovación, modificación y transferencia de Derechos de Propiedad Industrial e Intelectual;

2) deducir oposiciones y demandas de nulidad o cancelación;

3) Presentar solicitudes de anotación de todo tipo, incluyendo pero no limitadas a transferencias, cambios de nombre, cambios de domicilio, gravámenes, prohibiciones, cancelaciones o limitaciones voluntarias, licencias;

4) presentar toda clase de peticiones, declaraciones, protestas, reclamos y toda clase de recursos;

5) presentar evidencias de uso y explotaciones;

6) pagar impuestos, derechos fiscales, honorarios y anualidades;

7) recibir documentos, títulos y certificados;

grant(s) special power of attorney to the firm SARGENT & KRAHN to execute this power of attorney through its attorneys, to represent the Company in CHILE in all matters concerning trademarks, patents, utility models, industrial designs and drawings, layout-designs or topographies of integrated circuits, geographical indications and denominations of origin, protection of trade secrets and undisclosed information, plant varieties, copyrights and domain names (hereinafter collectively referred to as "Industrial and Intellectual Property Rights"), empowering SARGENT & KRAHN, in particular to:

A.- 1) file and prosecute applications before the competent authorities to obtain, renew, modify and transfer Industrial and Intellectual Property Rights;

2) lodge oppositions and cancellation or invalidation proceedings;

3) file applications to record all kind of annotations including but not limited to assignments, change of name, change of domicile, liens, encumbrances, prohibitions, voluntary cancellations or restrictions and licenses;

4) file all kind of petitions, declarations, protests, complaints and all kind of recourses;

5) file evidences of use and exploitations;

6) pay taxes, government fees, fees and annuities;

7) receive documents, titles and certificates;

8) limit, modify and withdraw, totally or partially,

8) limitar, modificar y desistir, total o parcialmente, solicitudes en trámite;

9) actuar ante autoridades y/o tribunales administrativos, judiciales, ordinarios, especiales y arbitrales, con facultad para entablar toda clase de acciones y recursos civiles y criminales, desistir de las acciones deducidas, contestar y aceptar demandas, renunciar los recursos y los términos legales, transigir, comprometer, otorgar a los árbitros facultades de arbitrajes;

10) designar abogado patrocinante, otorgar mandato judicial y revocar dichas designaciones y mandatos;

11) Delegar total o parcialmente este poder o ejercerlo por medio de delegados designados anteriormente o que se designen en lo futuro;

12) conferir al delegado facultades para subdelegar y revocar las delegaciones; y

B.- 1) comprar, aceptar y adquirir Derechos de Propiedad Industrial e Intelectual en representación de la Compañía;

2) vender, ceder y transferir, total o parcialmente, Derechos de Propiedad Industrial e Intelectual de la Compañía;

3) constituir gravámenes y prohibiciones sobre Derechos de Propiedad Industrial e Intelectual de la Compañía;

4) otorgar licencias y celebrar toda clase de contratos relacionados con Derechos de Propiedad Industrial e Intelectual de la Compañía;

5) pagar, cobrar y percibir los precios de cesiones y las regalías provenientes de licencias relacionadas con Derechos de Propiedad Industrial e Intelectual de la Compañía.

Los mandatarios, delegados y subdelegados ("los Apoderados") deberán obrar de acuerdo con las instrucciones por escrito que les otorgue la Compañía. Dichas instrucciones mirarán sólo a las relaciones de ésta con aquéllos, pues los Apoderados se entenderán autorizados para obrar libremente ante terceros.

pending applications;

9) act before administrative, judicial, ordinary, special and arbitrator authorities and/or courts (law courts and courts of arbitration), with power to institute all kind of proceedings, civil and criminal actions and recourses, withdraw the referred actions and recourses, respond actions, accept actions, waive recourses and legal terms, settle, to accept and/or appoint arbitrators, convey upon arbitrators the authority to act *ex aequo et bono*;

10) appoint legal attorneys, grant judicial powers and revoke such appointments and powers;

11) delegate all or part of this power of attorney or act through substitutes previously appointed or being appointed in the future;

12) empower substitutes to subdelegate and to revoke the substitutions; and

B.- 1) purchase, accept and acquire Industrial and Intellectual Property Rights on behalf of the Company;

2) sell, assign and transfer, totally or in part, Industrial and Intellectual Property Rights of the Company;

3) accept liens, encumbrances and prohibitions on Industrial and Intellectual Property Rights of the Company;

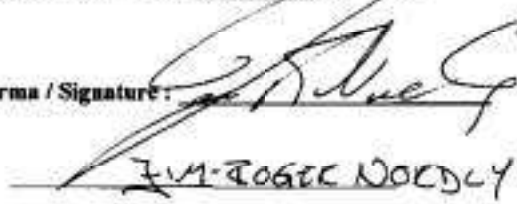
4) grant licenses and execute all kind of contracts in connection with Industrial and Intellectual Property Rights of the Company;

5) pay, collect and receive the assignment prices and the royalties on licenses in connection with Industrial and Intellectual Property Rights of the Company.

The attorneys, their substitutes and subdelegates ("the Attorneys") must act in accordance with written instructions given to them by the Company. These instructions shall concern only the relations between the Company and the Attorneys, since the Attorneys shall be considered as authorized to proceed freely before third parties

Fecha / Date: 28.04.2017

Firma / Signature:


F.M. ROGER NOEDLY

NOTA 1: La Compañía puede borrar en todo o parte las facultades del párrafo B.-, no así las del párrafo A.- que son indispensables.

NOTE 1: The Company may delete all or some of the powers of paragraph B.-, but not the powers included in paragraph A.- which are essential.

EDUARDO AVELLO CONCHA
NOTARIO PÚBLICO
Orrego Luco 0153 Fono 26200400
Providencia
aconvonas@notaria-avello.cl




REPERTORIO: 2.706-2.014

DESIGNACIÓN DE APODERADOS

Y

REVOCACIÓN DE PODERES

SARGENT & KRAHN y otros



En Santiago de Chile, a treinta de enero de dos mil catorce, ante mí, EDUARDO AVELLO CONCHA, Abogado, Notario Público Titular de la Vigésimo Séptima Notaría de Santiago, con oficio en calle Orrego Luco cero ciento cincuenta y tres, Providencia, comparecen: JOSÉ LUIS LETELIER AZZARI, chileno, casado, abogado, cédula nacional de identidad número seis millones ochocientos noventa mil sesenta guión tres y ALFREDO DOMINGO MONTANER LEWIN, chileno, soltero, abogado, cédula nacional de identidad número seis millones novecientos ochenta y nueve mil seiscientos noventa y ocho guión siete, ambos por sí y en su calidad de socios y en representación de SARGENT & KRAHN; GERARDO VARELA ALFONSO, chileno, casado, abogado, cédula nacional de identidad número seis millones trescientos cincuenta y seis mil novecientos setenta y dos guión cero; SERGIO DIEZ ARRIAGADA, chileno, casado, abogado, cédula nacional de identidad número seis millones seiscientos cincuenta y cinco mil trescientos setenta y ocho guión siete; SEBASTIAN OBACH GONZALEZ, chileno, casado, abogado, cédula nacional de identidad número cuatro millones novecientos

cincuenta mil novecientos cincuenta y dos guión nueve y **CARLOS PEREZ-COTAPOS SUBERCASEAUX**, chileno, casado, abogado, cédula nacional de identidad número siete millones diecisiete mil doscientos ochenta y ocho guión siete, todos domiciliados para estos efectos en Avenida Andrés Bello número dos mil setecientos once, piso diecinueve, de la Comuna de Las Condes, Región Metropolitana; mayores de edad, quienes acreditan su identidad con las cédulas ya citadas y exponen: **PRIMERO:** La firma **SARGENT & KRAHN PROCURADORES INTERNACIONALES DE PATENTES Y MARCAS LIMITADA**, cuyo nombre de fantasía es "SARGENT & KRAHN", es la mandataria de sus clientes para representarlos en asuntos relacionados con marcas comerciales, patentes, modelos de utilidad, diseños y dibujos industriales, esquemas de trazado o topografías de los circuitos integrados, indicaciones geográficas y denominaciones de origen, secretos empresariales y de la información no divulgada, variedades vegetales, derechos de autor, nombres de dominio y otras materias relacionadas directa o indirectamente con propiedad intelectual (en adelante referidos colectivamente como "Derechos de Propiedad Industrial e Intelectual"), mandato que se debe ejercer a través de los apoderados de **SARGENT & KRAHN**. **SEGUNDO:** Por este acto **JOSÉ LUIS LETELIER AZZARI** y **ALFREDO DOMINGO MONTANER LEWIN**, ambos en representación de **SARGENT & KRAHN**, vienen en designar apoderados a los señores **JOSÉ LUIS LETELIER AZZARI**, **ALFREDO DOMINGO MONTANER LEWIN**, **CARLOS PUELMA ALLENDE**, **MARIA LUISA VALDES STEEVES**, **JUAN PABLO EGAÑA BERTOGLIA**, **RODRIGO**

EDUARDO AVELLO CONCHA
NOTARIO PÚBLICO
Orrego Luco 0153 Fono 26200400
Providencia
aavconca@notaria-avello.cl


SEBASTIAN LAVADOS MACKENZIE, MATIAS SOMARRIVA LABRA, EDUARDO ALEJANDRO LOBOS VAJOVIC, PABLO CARIOLA CUBILLOS, MARIA JOSEFINA MORA ARIAS y CRISTIAN KENNETH BARROS MICHELL, quienes podrán actuar conjunta o indistintamente, para los efectos de representar a los mandantes y clientes actuales o futuros de SARGENT & KRAHN y a ésta última, ante el Instituto Nacional de Propiedad Industrial INAPI, el Tribunal de Propiedad Industrial, Tribunales ordinarios, inclusive Cortes de Apelaciones y Corte Suprema, Tribunales especiales, Tribunales arbitrales, Servicio Agrícola y Ganadero, Instituto de Salud Pública, Departamento de Ciencias de la Computación de la Universidad de Chile y ante cualquier otra autoridad, tribunal u organismo público o privado, que fuere necesario, sea en tramitaciones administrativas o en cuestiones contenciosas relacionadas con Derechos de Propiedad Industrial e Intelectual, salvo aquellas materias a que se refiere la cláusula tercera del presente instrumento. En el ejercicio de la designación a que se refiere esta cláusula, estos apoderados estarán facultados, sin que la enumeración siguiente sea taxativa, para: Uno) solicitar y tramitar ante las autoridades correspondientes la obtención, renovación, modificación y transferencia de Derechos de Propiedad Industrial e Intelectual; Dos) deducir oposiciones y demandas de nulidad o cancelación; Tres) presentar solicitudes de anotación de todo tipo, incluyendo pero no limitadas a transferencias, cambios de nombre, cambios de domicilio, gravámenes, prohibiciones, cancelaciones o limitaciones voluntarias, licencias; Cuatro) presentar toda clase de peticiones,



declaraciones, protestas, reclamos y toda clase de recursos; Cinco) presentar evidencias de uso y explotaciones; Seis) pagar impuestos, derechos fiscales, honorarios y anualidades; Siete) recibir documentos, títulos y certificados; Ocho) limitar, modificar y desistir, total o parcialmente, solicitudes en trámite; Nueve) actuar ante autoridades y/o tribunales administrativos, judiciales, ordinarios, especiales y arbitrales, con facultad para entablar toda clase de acciones y recursos civiles y criminales, desistir de las acciones deducidas, contestar y aceptar demandas, renunciar los recursos y los términos legales, transigir, comprometer, otorgar a los árbitros facultades de arbitradores; Diez) designar abogado patrocinante, otorgar mandato judicial y revocar dichas designaciones y mandatos; Once) Delegar total o parcialmente este poder o ejercerlo por medio de delegados designados anteriormente o que se designen en lo futuro; Doce) revocar las delegaciones. TERCERO: Por este acto JOSÉ LUIS LETELIER AZZARI y ALFREDO DOMINGO MONTANER LEWIN ambos en representación de SARGENT & KRAHN, vienen en designar apoderados a los señores JOSÉ LUIS LETELIER AZZARI, ALFREDO DOMINGO MONTANER LEWIN, CARLOS PUELMA ALLENDE, MARIA LUISA VALDES STEEVES, JUAN PABLO EGAÑA BERTOGLIA y RODRIGO SEBASTIAN LAVADOS MACKENZIE quienes podrán actuar conjunta o indistintamente, para los efectos de representar a los mandantes y clientes actuales y futuros de SARGENT & KRAHN, en los siguientes actos y contratos: Uno) comprar, aceptar y adquirir Derechos de Propiedad Industrial e Intelectual; Dos) vender, ceder y transferir, total o parcialmente, Derechos de Propiedad Industrial e

Intelectual; Tres) constituir gravámenes y prohibiciones sobre Derechos de Propiedad Industrial e Intelectual; Cuatro) otorgar licencias y celebrar toda clase de contratos relacionados con Derechos de Propiedad Industrial e Intelectual; Cinco) pagar, cobrar y percibir los precios de cesiones y las regalías provenientes de licencias relacionadas con Derechos de Propiedad Industrial e Intelectual. CUARTO: JOSÉ LUIS LETELIER AZZARI y ALFREDO DOMINGO MONTANER LEWIN, ambos en representación de SARGENT & KRAHN, declaran que las designaciones de apoderados a que se refieren las cláusulas segunda y tercera del presente instrumento no revocan designaciones anteriores, a excepción de aquellas mencionadas en la cláusula siguiente. QUINTO: Uno. Por este acto, JOSÉ LUIS LETELIER AZZARI y ALFREDO DOMINGO MONTANER LEWIN, ambos por sí y en representación de SARGENT & KRAHN y los señores SEBASTIAN OBACH GONZALEZ y GERARDO VARELA ALFONSO, actuando éstos últimos por sí, vienen en revocar los mandatos y poderes conferidos por escritura pública de uno de junio de mil novecientos noventa y nueve ante el Notario Público de Santiago don Raul Undurraga Laso a Sebastián Oddó Gómez, Oscar Ferrari García, Luis Felipe Bahamondez Prieto, Andrés Fernandez Alemany, Ignacio Arteaga Echeverría, Alvaro Ramírez Molina, María Gracia Cariola Cubillos, Alvaro Cuevas Marríquez, Isabel Sainz Lobo, José Miguel Gana Eguiguren, Nicolai Bakovic Hudig, Matias Zegers Ruiz-Tagle, Diego Valenzuela Dellafori, Sebastián Vivanco Silva, Tomás Lange Guillén, Jorge Martínez Cornejo y Andrés Correa



Rosado. Dos. Por este acto, JOSÉ LUIS LETELIER AZZARI y ALFREDO DOMINGO MONTANER LEWIN, ambos por sí y en representación de SARGENT & KRAHN y los señores SEBASTIAN OBACH GONZALEZ, GERARDO VARELA ALFONSO, SERGIO DIEZ ARRIAGADA y CARLOS PEREZ-COTAPOS SUBERCASEAUX actuando éstos últimos por sí, vienen en revocar los mandatos y poderes conferidos por escritura pública de catorce de enero de dos mil ante el Notario Público de Santiago don Iván Torrealba Acevedo a Sebastián Oddó Gómez, Ignacio Arteaga Echeverría, Isabel Sainz Lobo, José Miguel Gana Eguiguren, Matías Zegers Ruiz-Tagle, Diego Valenzuela Dellafiore, Jorge Martínez Cornejo, Carmen Paz Alvarez Enriquez y Patricio de la Barra Gil. SEXTO: Se faculta al portador de copia autorizada de la presente escritura para requerir las inscripciones y anotaciones que procedan. La personería de José Luis Letelier Azzari y Alfredo Domingo Montaner Lewin para representar a Sargent & Krahn consta de la escritura pública de dos de noviembre de dos mil seis otorgada ante el Notario Público de Santiago Eduardo Avello Concha Escritura redactada conforme a minuta del Abogado Alfredo Montaner Lewin. En comprobante y previa lectura, firman los comparecientes. Se da copia. DOY FE. 


JOSÉ LUIS LETELIER AZZARI  
ALFREDO DOMINGO MONTANER LEWIN 

Ambos por sí y p.p.SARGENT & KRAHN

EDUARDO AVELLO CONCHA
NOTARIO PÚBLICO
Orrego Laco 0153 Fono 26200400
Providencia
ecorcosse@notaria-avello.cl

GERARDO VARELA ALFONSO



SERGIO DIEZ ARRIAGADA



SEBASTIAN OBACH GONZALEZ



CARLOS PEREZ-COTAPOS SUBERCASEAUX



Repertorio: 2706-2014
O.T. 614028



ESTA COPIA ES TESTIMONIO FIEL DEL ORIGINAL

Santiago, 5 FEB 2014



A-38192

TESTIMONIO DE LA ESCRITURA DE

(R.M.S.)

REPERTORIO: 3
O.T

REVOCACIÓN DE PODERES

Y

DESIGNACIÓN DE APODERADOS

SARGENT & KRAHN PROCURADORES

INTERNACIONALES DE PATENTES Y MARCAS LIMITAD

A

MARIA LUCA VALDES STEEVES Y CITROS

EDUARDO AVELLO CONCHA
NOTARIO PUBLICO

ORREGO LUCO NORTE 0153 FON0: 226200400 - FAX: 226200437
PROVIDENCIA - SANTIAGO - CHILE



REPERTORIO: 31.463-2.016
O.T. 1.015.203

REVOCACIÓN DE PODERES

Y

DESIGNACIÓN DE APODERADOS

SARGENT & KRAHN PROCURADORES



INTERNACIONALES DE PATENTES Y MARCAS LIMITADA

A

MARIA LUISA VALDES STEEVES Y OTROS

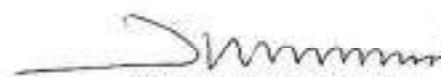
En Santiago de Chile, a dieciocho de octubre de dos mil dieciséis, ante mí, EDUARDO AVELLO CONCHA, Abogado, Notario Público Titular de la Vigésimo Séptima Notaría de Santiago, con oficio en calle Orrego Luco cero ciento cincuenta y tres, Providencia, comparecen: JOSÉ LUIS LETELIER AZZARI, chileno, casado, abogado, cédula nacional de identidad número seis millones ochocientos noventa mil sesenta guión tres y ALFREDO DOMINGO MONTANER LEWIN, chileno, soltero, abogado, cédula nacional de identidad número seis millones novecientos ochenta y nueve mil seiscientos noventa y ocho guión siete, en su calidad de socios y en representación de SARGENT & KRAHN PROCURADORES INTERNACIONALES DE PATENTES Y MARCAS LIMITADA Rol Único Tributario setenta y nueve millones setecientos trece mil trescientos guión cero, todos domiciliados para estos efectos en Avenida Andrés Bello número dos mil setecientos once, piso diecinueve, de la Comuna de Las Condes, Región Metropolitana; mayores de edad,






quienes acreditan su identidad con las cédulas ya citadas y exponer: PRIMERO: La firma SARGENT & KRAHN PROCURADORES INTERNACIONALES DE PATENTES Y MARCAS LIMITADA, cuyo nombre de fantasía es "SARGENT & KRAHN", es la mandataria de sus clientes para representarlos en asuntos relacionados con marcas comerciales, patentes, modelos de utilidad, diseños y dibujos industriales, esquemas de trazado o topografías de los circuitos integrados, indicaciones geográficas y denominaciones de origen, secretos empresariales y de la información no divulgada, variedades vegetales, derechos de autor, nombres de dominio y otras materias relacionadas directa o indirectamente con propiedad intelectual (en adelante referidos colectivamente como "Derechos de Propiedad Industrial e Intelectual"), mandato que se debe ejercer a través de los apoderados de SARGENT & KRAHN. Mediante escritura pública de treinta de enero de dos mil catorce ante este mismo Notario, Repertorio dos mil setecientos seis dos mil catorce, SARGENT & KRAHN designó a diversos apoderados según consta en las cláusulas SEGUNDO y TERCERO de la referida escritura, para las materias que en cada caso se indican. SEGUNDO: Por este acto JOSÉ LUIS LETELIER AZZARI y ALFREDO DOMINGO MONTANER LEWIN, ambos en representación de SARGENT & KRAHN, vienen en revocar las designaciones de los siguientes apoderados que se indican en las cláusulas SEGUNDO y TERCERO de la escritura referida en la cláusula anterior del presente instrumento: a) respecto de los apoderados de la cláusula SEGUNDO, se revocan las designaciones de los señores MARIA LUISA VALDES STEEVES, MATIAS SOMARRIVA LABRA,

EDUARDO AVELLO CONCHA
NOTARIO PÚBLICO
Orrego Luco 0153 Fono 26200400
Providencia
eservmca@notaria-avello.cl

MARIA JOSEFINA MORA ARIAS y b) respecto de los apoderados de la cláusula TERCERO, se revoca la designación de MARIA LUISA VALDES STEEVES. En consecuencia, a contar de esta fecha se revocan los poderes y mandatos otorgados a las personas que se indican en la presente cláusula. **TERCERO:** Por este acto JOSÉ LUIS LETELIER AZZARI y ALFREDO DOMINGO MONTANER LEWIN, ambos en representación de SARGENT & KRAHN vienen en designar apoderado al señor Felipe Fernández González, con las facultades de la cláusula SEGUNDO de la escritura pública a que se refiere la cláusula primera del presente instrumento, quien deberá actuar en la misma forma que los restantes apoderados allí designados. **CUARTO:** Se faculta al portador de copia autorizada de la presente escritura para requerir las inscripciones y anotaciones que procedan. La personería de José Luis Letelier Azzari y Alfredo Domingo Montaner Lewin para representar a Sargent & Krahn consta de la escritura pública de dos de noviembre de dos mil seis otorgada ante el Notario Público de Santiago Eduardo Avello Concha Escritura redactada conforme a minuta del Abogado Alfredo Montaner Lewin. En comprobante y previa lectura, firman los comparecientes. Se da copia. DOY FE.-




JOSÉ LUIS LETELIER AZZARI


ALFREDO DOMINGO MONTANER LEWIN

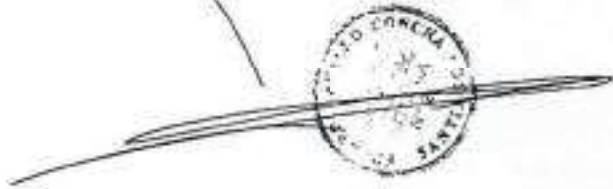
Ambos por sí y p.p. SARGENT & KRAHN

(S-06040504M/A/1)

Pepe Jones 63-215

ESTA COPIA ES TESTIMONIO FIEL DEL ORIGINAL
19 OCT. 2016
Santiago,



This document is digitally signed

Signer: Marta Beatriz Araya Fernandez
Date: vie, dic 29, 2023 09:13:30 CLT
Location: PUNE



Santiago, veintiocho de diciembre del año dos mil veintitrés.

Resolviendo el recurso de 11-12-2023;

Ha lugar al recurso y en consecuencia agréguese en la parte resolutive de la sentencia de fecha siete diciembre del año dos mil veintitrés, a continuacion del punto final lo siguiente: "En definitiva, se otorga la patente pedida por cuanto posee novedad y nivel inventivo".

Téngase la presente resolución como parte integrante de la sentencia antes individualizada.

Devuélvanse los autos como está ordenado.

ROL TPI N° 1489-2021

Dictada por el Ministro Sr. Marco Arellano Quiroz y las Ministras Sra. Carmen Iglesias Muñoz y Sra. Pamela Fitch Rossel.

This document is digitally signed

Signer: MARCO ANTONIO ARELLANO
QÚIROZ
Date: jue, dic 28, 2023 11:49:48 CLT
Location: PUNE

This document is digitally signed

Signer: PAMELA FRANCISCA FITCH ROSSEL
MUNOZ
Date: jue, dic 28, 2023 11:51:27 CLT
Location: PUNE

This document is digitally signed

Signer: CARMEN GABRIELA IGLESIAS
MUNOZ
Date: vie, dic 29, 2023 06:25:28 CLT
Location: PUNE

Santiago, veintiocho de diciembre del año dos mil veintitrés.

A la presentación de fecha 26-12-2023 Código 14806: Dese cuenta en sala del recurso de casación en el fondo.

ROL TDPI N° 1489-2021

Proveído por el Presidente del Tribunal de Propiedad Industrial Sr. Marco Arellano Quiroz.

NOTIFICADA POR EL ESTADO DIARIO CON ESTA FECHA

MTG

This document is digitally signed

Signer: MARCO ANTONIO ARELLANO
QUIROZ
Date: jue, dic 28, 2023 10:10:46 CLT
Location: PUNE

This document is digitally signed

Signer: Marta Beatriz Araya Fernandez
Date: jue, dic 28, 2023 11:31:03 CLT
Location: PUNE

Materia : Patente de Invención

Solicitud : 201700674

Rol : 1489-2021

RECURSO DE ACLARACIÓN, RECTIFICACIÓN O ENMIENDA.

H. TRIBUNAL DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

María Trinidad Rojas Wüinkhaus, en representación de la oponente y apelante Biomar Chile S.A., en el expediente de la solicitud de patente de invención N° 201700674, rol N° 1489-2021, al H. Tribunal de Propiedad Industrial respetuosamente digo:

Vengo en interponer recurso de Aclaración, Rectificación o Enmienda respecto a la resolución de fecha 28 de diciembre de 2023, que se pronuncia respecto al recurso de Aclaración, Rectificación o Enmienda presentado por esta parte con fecha 11 de diciembre de 2023 que solicitaba corregir el fallo de revocación parcial emitido con fecha 7 de diciembre de 2023.

En la parte dispositiva del fallo de fecha 7 de diciembre de 2023 se señaló lo siguiente: *“se revoca parcialmente la resolución de fecha siete de octubre de dos mil veintiuno, por estimar que la solicitud carece de nivel inventivo, en lo demás se confirma la sentencia, por considerar que cumple con el requisito de novedad requerido en la Ley del ramo”*.

Si bien se infiere que la falta de nivel inventivo debiese llevar al rechazo de una solicitud, de la lectura del párrafo recién citado no queda claro si la revocación parcial decretada conlleva o no el rechazo de la solicitud de autos, por lo cual esta parte presentó un recurso de Aclaración, Rectificación o Enmienda solicitando a este H. Tribunal señalar expresamente que se rechaza la solicitud de patente de autos, N° 201700674, por falta de nivel inventivo.

Mediante la resolución de fecha 28 de diciembre de 2023 se da lugar recurso antedicho, agregando la siguiente frase al fallo: *“En definitiva, se otorga la patente pedida por cuanto posee novedad y nivel inventivo”*.

Claramente, se ha incurrido en un error, ya que este H. Tribunal concluye, al igual que el perito de autos, que la solicitud carece de nivel inventivo y que, por lo tanto, debiese ser rechazada.

POR TANTO,

al H. Tribunal de Propiedad Industrial respetuosamente pido: Se sirva tener por interpuesto recurso de Aclaración, Rectificación o Enmienda respecto a la resolución de fecha 28 de diciembre de 2023, que se pronuncia respecto al recurso de Aclaración, Rectificación o Enmienda presentado por esta parte con fecha 11 de diciembre de 2023 que solicitaba corregir el fallo de revocación parcial emitido con fecha 7 de diciembre de 2023, acogerlo y, en virtud de lo anterior, aclarar que la revocación parcial conlleva el rechazo de la solicitud de patente de autos.

Firmado
digitalmente por
María Trinidad
Rojas Wunkhaus
Fecha: 2023.12.29
12:04:27 -03'00'

Santiago, dos de enero del año dos mil veinticuatro.

A la presentación de fecha 29-12-2023 Código 14859: Dese cuenta en sala del recurso de aclaración, rectificación o enmienda.

ROL TDPI N° 1489-2021

Proveído por el Presidente del Tribunal de Propiedad Industrial Sr. Marco Arellano Quiroz.

NOTIFICADA POR EL ESTADO DIARIO CON ESTA FECHA

MTG

This document is digitally signed

Signer: MARCO ANTONIO ARELLANO
QÚIROZ
Date: mar, ene 2, 2024 10:22:47 CLT
Location: PUNE

This document is digitally signed

Signer: Marta Beatriz Araya Fernandez
Date: mar, ene 2, 2024 11:06:19 CLT
Location: PUNE



Santiago, tres de enero del año dos mil veinticuatro.

Resolviendo el recurso de 29-12-2023;

Ha lugar a la rectificación solicitada y en consecuencia se resuelve:

1. Déjese sin efecto la rectificación de fecha 28-12-2023;
2. Agréguese en la parte resolutive de la sentencia de fecha siete de diciembre del año dos mil veintitrés, a continuación del punto final lo siguiente: "En definitiva, se rechaza la patente pedida por cuanto no posee nivel inventivo".

Téngase la presente resolución como parte integrante de la sentencia antes individualizada.

ROL TPI N° 1489-2021

Dictada por el Ministro Sr. Marco Arellano Quiroz y las Ministras Sra. Carmen Iglesias Muñoz y Sra. Pamela Fitch Rossel.



Santiago, cuatro de enero del año dos mil veinticuatro.

Resolviendo la presentación de fecha 26-12-2023:

A lo principal: Atendido que el recurso de casación en el fondo deducido, lo ha sido en tiempo y patrocinado por abogado habilitado para el ejercicio de la profesión y de conformidad, además, con lo dispuesto en los artículos 770, 771, 772, y 776 del Código de Procedimiento Civil, téngase por interpuesto y concédase el recurso.

Elévense los autos a la Excm. Corte Suprema para su conocimiento y ulterior resolución.

Al primer otrosí: Ocurrase ante quien corresponda.

Al segundo otrosí: Téngase presente el patrocinio y poder.

Al tercer otrosí: Por acompañados los poderes.

Rol TDPI N° 1489-2021.

Dictada por los Ministros Sra. Carmen Iglesias Muñoz, Sr. Andrés Álvarez Piñones, y Sra. Pamela Fitch Rossel.

MAF/MTG

ORD: 003/2024
ANT: Recurso de Casación.
MAT.: Remite expediente de causa que indica con recurso de casación.

A: SR. JUAN EDUARDO FUENTES BELMAR
PRESIDENTE DE LA EXCELENTISIMA CORTE SUPREMA

DE: MARTA ARAYA FERNANDEZ
TRIBUNAL DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

En la causa que se individualiza se ha interpuesto recurso de casación en contra de la sentencia de segunda instancia dictada por este órgano jurisdiccional:

ROL TDPI	INDIVIDUALIZACION	SOLICITUD	
1489-2021	PATENTE DE INVENCION	201700674	
RECURRENTE	EUROPHARMA AS	RUT	PAIS. NORUEGA
ABOGADO	JUAN PABLO EGAÑA	RUT	8534347-5
RECURRIDO	BIOMAR CHILE S.A	RUT	96.512.650-3
ABOGADO	LUIS FELIPE CLARO SWINBURN	RUT	8394848-5

Interpuesto el recurso este fue concedido por este Tribunal de alzada ordenándose elevar los autos a la Excelentísima Corte Suprema para su conocimiento y resolución.

Por tanto, cumplo con remitir el expediente individualizado para dar curso a la tramitación del recurso correspondiente.

Saluda atentamente a usted,

MARTA ARAYA FERNANDEZ
Secretaria – Abogado

Tribunal de Propiedad Industrial

med

DISTRIBUCIÓN:

- Corte Suprema
- Archivo TDPI (Rol 1489-2021)

Información de firma electrónica:	
Firmantes	Marta Beatriz Araya Fernandez
Fecha de firma	15-01-2024
Código de verificación	357396
URL de verificación	https://tramites.economia.gob.cl

