

LLORED A & CIA. S. A.

ABOGADOS

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 03-066821- -00009-0000

Fecha: 2008-07-15 16:02:21 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 9

BOGOTA - COLOMBIA
OFICINA FUNDADA EN 1941
APARTADO AEREO 12304
TEL: 57-1-3264270 57-1-6069700
FAX: 57-1-3264271 57-1-6069701
CABLES: LLORED A
CALLE 72 No. 5-83 5º. PISO
www.lloredacamacho.com
jlcco@lloredacamacho.com

Señor

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____ D. _____

Re: P1.-SOCIÉTÉ DES PRODUITS NESTLÉ S.A.-Solicitud de Patente de
Invencción en Fase Nacional PCT para "ENLACE DE ENDOTOXINA
POR BACTERIA Y BIFIDOBACTERIA DE ÁCIDO LÁCTICO".-Clase
A61K 35/74.-Expediente número 03-066.821.-

1. Me refiero al auto dictado por ese Despacho notificado por fijación en lista de 18 de Abril de 2008.

2. Con el fin de dar respuesta a las objeciones expuestas por el señor Examinador en su Concepto Técnico número **891** en relación con la claridad de las reivindicaciones, la inclusión de materia no considerada como invención y el requisito de novedad, me permito dirigir su atención a las siguientes modificaciones y argumentos técnicos, por medio de los cuales se superan completamente dichas objeciones.

3. **MATERIA NO PATENTABLE**

El señor Examinador manifiesta en su concepto técnico No **891** que la materia objeto de las reivindicaciones 1 a 10 originalmente presentadas no se considera una invención bajo la legislación colombiana dado que corresponde al aislamiento de cepas bacterianas.

presentadas, con lo cual la objeción correspondiente a la inclusión de materia no patentable en las reivindicaciones queda plenamente superada.

4. CLARIDAD DE LAS REIVINDICACIONES

Por otra parte el señor Examinador en su concepto técnico manifiesta que el capítulo reivindicatorio originalmente presentado carece de claridad y de concisión asegurando que:

- (i) *"No todas las cepas reclamadas cuentan con sustento probado suficiente (cláusulas 1-10)";*
- (ii) *"Se caracteriza la invención de manera imprecisa a partir de términos vagos"; y*
- (iii) *Se definen las cepas y las composiciones por su actividad o su resultado a alcanzar (p.e. cláusulas 1, 2, 3, 6, 7, 8, 16)".*

Con el fin de dar respuesta a las anteriores objeciones presentadas por el señor Examinador, me permito manifestar que es deseo del solicitante presentar un nuevo capítulo reivindicatorio en el cual han sido eliminados los términos vagos, las reivindicaciones dirigidas a las cepas y las reivindicaciones que definen las cepas y las composiciones por su resultado final.

De conformidad con lo anterior, el nuevo capítulo reivindicatorio está constituido por 4 reivindicaciones, las cuales están plenamente sustentadas en la descripción, en el capítulo reivindicatorio originalmente presentado, y tienen la siguiente estructura:

Nueva reivindicación 1: Esta reivindicación corresponde a la reivindicación 13 originalmente presentada y ha sido modificada con el fin de proporcionar una característica específica a las cepas presentes en la composición alimenticia reivindicada mediante la inclusión de la expresión

LLORED A & CIA. S. A.

solicitud, donde se expresa claramente que preferiblemente la cepa bacteriana tiene un %H desde 85% hasta 100%.

Nueva reivindicación 2: Esta reivindicación corresponde a la reivindicación 12 originalmente presentada en la cual se ha modificado su dependencia de tal forma que ahora depende de la nueva reivindicación 1.

Nueva reivindicación 3: Esta reivindicación corresponde a la reivindicación 14 originalmente presentada en la cual se ha modificado su dependencia de manera que ahora depende de las nuevas reivindicaciones 1 y 2.

Nueva reivindicación 4: Esta reivindicación corresponde a la reivindicación 15 originalmente presentada en la cual se ha modificado su dependencia de tal forma que ahora depende de las nuevas reivindicaciones 1 a 3.

De conformidad con lo anterior, queda claro que las objeciones presentadas por el señor Examinador en contra de la claridad del capítulo reivindicatorio han sido plenamente superadas mediante la presentación del nuevo capítulo reivindicatorio cuya estructura fue expuesta en los párrafos precedentes.

Finalmente, considero importante señalar que las modificaciones realizadas al capítulo reivindicatorio en mención **no amplían de manera alguna el alcance de la invención tal como fue originalmente presentada,** toda vez que corresponden a la eliminación de ciertas reivindicaciones con el fin de superar las objeciones presentadas por el señor Examinador, lo que evidentemente constituye una limitación de la materia.

5. OBJECCIÓN DE FALTA DE NOVEDAD

Ahora bien, el señor Examinador en su Concepto Técnico No. **891**, manifiesta que, la presente solicitud carece de novedad con base en las enseñanzas del documento US5968569 (**D1**) afirmando que:

LLOREDA & CIA. S. A.

documento US5968569 (D1) es evidente que la materia contenida es igual".

Frente a este particular, me permito en primer lugar dirigir la atención del señor Examinador al capítulo reivindicatorio ahora presentado el cual está claramente dirigido a proteger:

- Una composición alimenticia para humanos o para mascotas que contiene al menos una cepa específica de bacteria y/o bifidobacteria de ácido láctico la cual se caracteriza por tener **un porcentaje de hidrofobicidad (%H) de 85% hasta 100%.**
- Una composición de acuerdo al punto anterior, donde la cepa se utiliza en su forma viable o inactivada.

De conformidad con lo anterior, me permito señalar que al tenor del capítulo reivindicatorio modificado ahora presentado, el documento D1 citado por el señor Examinador no puede ser considerado relevante para desvirtuar el requisito de novedad de la presente solicitud, toda vez que **dicho documento no enseña en forma explícita una composición alimenticia para humanos o para mascotas que presente características técnicas esenciales idénticas a las características que exhibe la composición alimenticia ahora reivindicada.** En este sentido, me permito exponer ante el señor Examinador los siguientes argumentos técnicos con los cuales se demuestra la novedad de la invención en cuestión:

En primer lugar, considero importante señalar que el documento US5968569 (**D1**), describe un producto cereal listo para comer que contiene una matriz de almidón gelatinizada, el cual incluye un recubrimiento o relleno que contiene micro-organismos probióticos, por ejemplo cereales para el desayuno y cereales para animales domésticos de preparación rápida y sencilla. **El documento D1 no enseña que los micro-organismos contenidos en el producto cereal posean propiedades hidrofóbicas en su superficies y mucho menos que posean un porcentaje de hidrofobicidad (%H)**

LLORED A & CIA. S. A.

A diferencia del documento D1, la presente solicitud enseña una composición alimenticia para humanos o para mascotas útil en el tratamiento de trastornos asociados y/o mediados con endotoxina, la cual contiene al menos una cepa de bacteria y/o bifidobacteria de ácido láctico que posee una superficie con una hidrofobicidad porcentual(%H) desde 85% a 100%. En este sentido considero pertinente señalar que las bacterias ácido lácticas, en general no son necesariamente hidrofóbicas.

Bajo el panorama que ofrecen los argumento anteriormente presentados, es claro que el documento D1 no enseña una composición alimenticia que presente características esenciales idénticas a las que exhibe la composición reivindicada en la presente solicitud, por lo tanto el documento D1 no es un documento relevante que afecte la novedad de la presente solicitud.

Teniendo en cuenta lo anterior, me permito solicitar de manera respetuosa al señor Examinador que tenga en cuenta que el Manual Andino de Patentes indica que *"Para determinar la novedad de la invención, se debe comprobar si existen anticipaciones del estado de la técnica que contengan explícitamente todas las características técnicas esenciales de la invención."¹*

Para el caso que nos ocupa, es claro que el señor Examinador está citando un documento que no contiene explícitamente todas las características técnicas esenciales del objeto de la invención tal como ha sido definido en las reivindicaciones, toda vez que el documento D1 no enseña composiciones que contenga una cepa de bacteria y/o bifidobacteria de ácido láctico que posee una superficie con una hidrofobicidad porcentual(%H) desde 85% a 100%. En otras palabras, el señor Examinador está considerando una referencia que, si bien está relacionada con el campo técnico de la invención, no constituye una anticipación relevante para desvirtuar la novedad de la presente solicitud porque no contiene explícitamente todas las características técnicas esenciales de la invención bajo estudio.

LLORED & CIA. S. A.

En adición a los hecho anteriormente mencionados, considero conveniente resaltar que la hidrofobicidad específica de la cepa contenida en la composición ahora reivindicada le otorga un efecto sorprendente e inesperado, el cual es mencionado en la página 10, línea 31 a la página 11, línea 5, y dice explícitamente que:

"Se seleccionaron preferiblemente bacterias que eliminaron más del 30% del contenido de endotoxina de esta solución. Las bacterias no hidrofóbicas, probadas en este ensayo no fueron capaces de modificar el contenido inicial de endotoxina".

Así las cosas, queda demostrado que la presente solicitud además de ser novedosa frente al documento D1, también proporciona un efecto inesperado gracias a que la composición alimenticia ahora reivindicada contiene una cepa de bacteria y/o bifidobacteria de ácido láctico que posee una superficie con una hidrofobicidad porcentual(%H) desde 85% a 100%.

6. **CONCLUSIÓN**

Queda entonces claro que las objeciones relativas a la claridad de las reivindicaciones, al igual que la aparición de materia no patentable en las mismas fueron superadas mediante la cancelación de las reivindicaciones correspondientes.

Finalmente, se demostró que entre la presente invención y el documento D1 existen diferencias diametrales, evidenciándose de esta manera el carácter novedoso de la solicitud en cuestión sobre dicho documento.

7. Anexo me permito presentar:

- (a) Recibo número 08-55,591, expedido por la Superintendencia de Industria y Comercio, que acredita el pago de las modificaciones mencionadas; y

LLOREDA & CIA. S. A.

8. En vista de todo lo anterior, ruego a usted proceder a estudiar nuevamente la solicitud a la luz de las argumentaciones presentadas y de las modificaciones realizadas y conceder el privilegio de patente solicitado.

Señor Superintendente,


ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P. 53.215

NOTARIA S E X T A DE BOGOTA
RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL
Bogotá, D.C. 10 JUL 2008
Ante mi PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE
BOGOTA
Comparecieron: *Alicia Lloreda*
Ricaurte
quien (es) exhibió(aron) la(s) C.G.
CC-39.690.713
T.P. 53.215
y declaro(aron) que la(s) firma(s) que aparece(n)
en el presente documento es(sun) la(s) suya (s) y
que el contenido del mismo es cierto. En constan-
cia se firma esta diligencia.



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 03-066821- -00009-0000

Fecha: 2008-07-15 16:02:21 Dep. 2020 NUECREACION
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
 Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 9

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 900176099-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 55,591
 FECHA : JULIO 11 DE 2008

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLORERA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	063754387	1859807	11/07/2008	6,040,000.00

***** CONCEPTO *****

CONCEPTO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
50005-01-03 CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	12 MARCAS Y LEHAS COMERCIALES	103,000.00
TOTAL :		\$ 103,000.00

SON: CIENTO TRES MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Reivindicaciones

1. Una composición alimenticia para humanos o para mascotas que contiene al menos una cepa de bacteria y/o bifidobacteria de ácido láctico es seleccionada del grupo que consiste de *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuterii*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rahmnosus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus delbrueckii subs. lactis*, \ *Bifidobacterium spp.*, \ *Bifidobacterium bifidum*, \ *Bifidobacterium longum*, \ *Bifidobacterium pseudolongum*, \ *Bifidobacterium infantis*, \ *Bifidobacterium adolescentis*, que tiene una hidrofobicidad porcentual (%H) de 85% hasta 100%, asociada con un soporte ingerible o una matriz farmacéutica.
2. Una composición de conformidad con la reivindicación 1, en donde la cepa se utiliza en su forma viable o inactivada.
3. Una composición de conformidad con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la cepa de bacteria y/o bifidobacteria de ácido láctico es seleccionada del grupo que consiste de NCC 2463 de *Lactobacillus acidophilus* (CNCM-I 2623), NCC 189 de *Bifidobacterium bifidum* (CNCM-I-2333), NCC 235 de *Bifidobacterium bifidum* (CNCM-I-2335), NCC 251 de *Bifidobacterium adolescentis* (CNCM-I-2168), *Bifidobacterium lactis* (ATCC27536).
4. Una composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la cantidad de cepa de bacteria y/o bifidobacteria de ácido láctico disponible para el individuo corresponde a $10^3 - 10^4$ ufc por día.

Isolation and Characterization of *Bifidobacterium* Strains for Probiotic Formulation

ANDREA GÓMEZ ZAVAGLIA, GUILLERMO KOCIUBINSKI, PABLO PÉREZ, AND GRACIELA DE ANTONI*

Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), UNLP, 47 y 116, 1900, La Plata, Argentina

MS 97-238: Received 22 September 1997/Accepted 6 January 1998

ABSTRACT

Twenty-five *Bifidobacterium* strains isolated from infant feces were identified by sugar fermentation patterns and whole-cell protein analysis. Using gradient SDS-PAGE, six characteristic protein bands of the genus were detected in 40 strains of bifidobacteria but not in lactobacilli. Computerized numerical analysis enabled strains to be grouped in two main clusters. Strains of *Bifidobacterium bifidum* belong to a well-differentiated cluster that joins the cluster of the remaining species at 0.582 similarity. The predominant species among isolated strains from infant feces were *B. bifidum*, *B. longum*, and *B. breve*. Probiotic and technological indicators such as surface properties, inhibitory capacity, resistance to bile and low pH, and ability to grow under aerobic conditions were studied. Not all desirable characteristics were present in a single strain. In general, adherent and inhibitory strains were not resistant to bile, low pH, and aerobic conditions. Only 10 of 40 strains were resistant to 0.5% bile.

Microorganisms of the genus *Bifidobacterium* are normal inhabitants of the human intestine. They are found at high concentrations in feces of breast-fed infants and play a role in resistance to infection. Placebo-controlled studies have shown that bifidobacteria prevent antibiotic-associated diarrhea and acute infantile diarrhea (7). It has been demonstrated that host resistance to infection is achieved in part by enhanced antibody production and proliferation of Peyer's patch cells stimulated by bifidobacteria (36). Protection of the mucosal epithelium against invasion by pathogenic bacteria could be a consequence of the adherent properties of some *Bifidobacterium* strains (4). In addition, the liberation of antimicrobial substances such as lactic and acetic acids by these bacteria causes a high rate of inhibition of gram-positive and gram-negative microorganisms in vitro (12, 16, 22). It seems that this metabolic activity also takes place in vivo, since infant feces with low pH have been associated with a high content of bifidobacteria in the intestinal lumen (8).

Consumption of cow's milk fermented experimentally and commercially with bifidobacteria cultures decreased undesirable colonic microflora (8, 22). This displacement of intestinal flora was due to colonization and growth of bifidobacteria in the large intestine. Attempts to identify and use a single strain or a defined mixture of strains that would have the broad specificity of the normal microflora to resist pathogen invasion have not been successful (7).

New isolates are needed to improve the biotherapeutic action of the bifidobacteria included in several foods and pharmaceutical products; for this purpose, proper identification of new strains is required. In this regard, the use of molecular methods appears imperative, since the pattern of

sugar fermentation could lead to mistakes in species identification. Strains that belong to *Bifidobacterium animalis* on the basis of sugar fermentation were identified as *Bifidobacterium longum* by DNA homology (35), and difficulties in distinguishing *Bifidobacterium adolescentis* from *Bifidobacterium dentium* have been reported (23). For these reasons more reliable techniques such as whole-cell protein analysis, enzymatic analysis, analysis of membrane fatty acids, determination of the electrophoretic mobility of enzymes, and DNA and RNA analysis have been employed for bacterial identification (14, 18, 20, 26, 27, 33, 34).

Numerical clustering of bifidobacterial strains has been reported (9) but, to our knowledge, numerical analysis based on whole-cell proteins of strains isolated exclusively from infant feces has not been performed.

The object of this study was to isolate bifidobacterial strains from humans for probiotic formulation. Strains were isolated from infant feces and identified by sugar fermentation and whole-cell protein analysis. Probiotic and technological indicators of each strain were studied.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains. Type strains of *Bifidobacterium* (Table 1) were purchased from the American Type Culture Collection (Rockville, Md., USA) and from the collection of Morinaga Milk Industry Ltd., Japan. Isolation of wild strains is described below. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 334, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* 133, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 140 and *Lactobacillus acidophilus* 139 were isolated from fermented products and belong to the CIDCA collection (La Plata, Argentina). Bacterial cultures were maintained frozen at -80°C in 0.3 M sucrose. Bacteria were reactivated by two consecutive subcultures in TPY broth (27) containing (in grams per liter): tryptone, 10.0; soy peptone, 5.0; glucose, 5.0; yeast extract, 2.5; Tween 80, 1.0; cysteine hydrochloride, 0.5; K_2HPO_4 , 2.0; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.5; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.25; CaCl_2 , 0.15; pH 7.0. Cultures were incubated at 37°C under anaerobic conditions.

* Author for correspondence. Tel: 54-21-249287; Fax: 54-21-254853; E-mail: gdantoni@nahuel.biol.unlp.edu.ar.

TABLE 4. Probiotic and technological characteristics of *Bifidobacterium* strains

Species and strain	Assay ^a					
	% H (mean $\pm$ SD)	Inh	% RpH (mean $\pm$ SD)	% R _{bio}	G _{ox}	Gr
<i>B. bifidum</i>						
CIDCA 533	80 $\pm$ 17.1	N	1.84 $\pm$ 0.66	0.9	H	M
CIDCA 536	96 $\pm$ 3.9	N	0.092 $\pm$ 0.02	0.0	L	M
CIDCA 537	95 $\pm$ 4.0	H	0.40 $\pm$ 0.01	0.1	L	S
CIDCA 539	90 $\pm$ 0.4	N	2.86 $\pm$ 0.41	ND ^b	L	S
CIDCA 5310	95 $\pm$ 0.9	N	5.67 $\pm$ 0.28	ND	L	S
CIDCA 5311	50.2 $\pm$ 9.5	N	1.34 $\pm$ 0.24	0.2	L	S
CIDCA 5313	91 $\pm$ 4.2	N	0.005 $\pm$ 0.00	0.0	L	S
CIDCA 5318	98.2	ND	0.50 $\pm$ 0.03	8.0	L	S
CIDCA 5321	92.84 $\pm$ 12.3	ND	0.81 $\pm$ 0.04	13.0	L	S
ATCC 29521	8.09 $\pm$ 3.45	L	26.41 $\pm$ 8.34	ND	H	M
<i>B. longum</i>						
CIDCA 5316	1.8 $\pm$ 1.5	N	0.01 $\pm$ 0.00	0.0	L	R
CIDCA 5319	ND	ND	ND	0.0	H	R
CIDCA 5320	3.43 $\pm$ 1.4	ND	0.45 $\pm$ 0.06	0.0	L	R
CIDCA 5322	1.92 $\pm$ 0.32	N	40.01 $\pm$ 2.36	0.0	L	R
CIDCA 5323	4.14 $\pm$ 0.48	L	3.56 $\pm$ 0.15	0.0	H	R
CIDCA 5324	3.30	L	ND	0.8	L	R
CIDCA 5325	4.70	ND	1.01 $\pm$ 0.05	0.0	L	M
MB-56	2.0 $\pm$ 1.7	N	0.023 $\pm$ 0.01	4.0	L	R
ATCC 15707	16.5 $\pm$ 2.62	VH	100 $\pm$ 2.19	0.4	M	M
<i>B. breve</i>						
CIDCA 532	4.8 $\pm$ 3.0	L	0.105 $\pm$ 0.06	0.0	H	M
CIDCA 5312	0.1 $\pm$ 0.9	N	ND	0.9	L	M
CIDCA 5314	21.1 $\pm$ 1.8	N	0.31 $\pm$ 0.05	3.0	M	M
CIDCA 5315	2.2 $\pm$ 0.8	VH	100 $\pm$ 7.16	0.0	L	R
CIDCA 5326	1.13	H	0.40 $\pm$ 0.03	0.0	M	R
CIDCA 5327	0.71	ND	8.73 $\pm$ 2.46	5.0	H	M
MB-19	19.7 $\pm$ 12.2	N	0.3 $\pm$ 0.02	43.0	H	R
ATCC 15700	30.8 $\pm$ 5.6	N	1.01 $\pm$ 0.17	80.0	H	M
<i>B. pseudolongum</i>						
CIDCA 531	83	VH	100 $\pm$ 5.30	45.8	H	R
ATCC 25865	17.75	L	55.01 $\pm$ 6.85	0.0	L	M
<i>B. infantis</i>						
CIDCA 538	3.3 $\pm$ 2.3	VH	15.6 $\pm$ 5.17	0.8	L	M
MB-2	4.1 $\pm$ 0.2	H	31.2 $\pm$ 4.16	0.0	L	M
MB-9	93.6 $\pm$ 3.2	ND	ND	ND	M	S
ATCC 15697	3.1 $\pm$ 1.0	L	37.14 $\pm$ 1.55	23.0	L	S
<i>B. adolescentis</i>						
CIDCA 5317	3.0 $\pm$ 0.6	N	1.05 $\pm$ 0.05	4.0	M	M
ATCC 15703	2.93 $\pm$ 0.68	L	33.25 $\pm$ 5.23	ND	L	M
<i>B. animalis</i>						
ATCC 25527	27.31	N	28.8 $\pm$ 2.41	53.7	H	M
<i>B. dentium</i>						
ATCC 29534	2.42 $\pm$ 0.02	VH	0.80 $\pm$ 0.06	0.0	H	R
<i>B. angulatum</i>						
ATCC 27535	ND	L	ND	0.0	ND	S
<i>B. catenulatum</i>						
ATCC 27539	17.5	H	4.07 $\pm$ 1.77	0.0	H	S
<i>B. pseudocatenulatum</i>						
ATCC 27919	5.26 $\pm$ 2.52	L	18.93 $\pm$ 4.49	0.0	L	R

^a % H, percent hydrophobicity; Inh, inhibition of *Bacillus subtilis* (agar diffusion assay); L, low; N, normal; H, high; VH, very high; % RpH, percent of survivors after 1 h at pH 3; % R_{bio}, percent of viable counts on solid media with 0.5% ox bile; the mean error in colony count was below 10%; G_{ox}, growth in aerobic atmosphere (liquid medium); L, low; M, medium; H, high; Gr, growth in anaerobic atmosphere (liquid medium); L, low; M, medium; S, slow.

^b ND, not determined.