

REIVINDICACIONES

1. Un método de selección de una cepa bacteriana ácido láctica; en donde dicho método comprende los pasos de (a-c):
 - a. búsqueda de una bacteria ácido láctica con presencia de un operón de histidina activo;
 - b. búsqueda de una bacteria ácido láctica con presencia y/o expresión del gen *dagK*;
 - c. selección de una cepa bacteriana ácido láctica que posea un operón de histidina activo y codifique el gen *dagK* y/o sea capaz de producir histamina y diacilglicerol quinasa (DagK).
2. El método de acuerdo a la reivindicación 1; en donde la búsqueda de una bacteria ácido láctica con presencia del gen *dagK* incluye las siguientes etapas:
cultivo de una cepa bacteriana ácido láctica;
extracción de ADN genómico de la cepa bacteriana ácido láctica;
amplificación por PCR del gen *dagK* mediante cebadores específicos; y
secuenciación del producto de PCR obtenido en el paso anterior.
3. El método de acuerdo a la reivindicación 2; en donde la búsqueda de una bacteria ácido láctica con presencia del gen *dagK* incluye:
amplificación por PCR del gen *dagK* mediante los cebadores específicos SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22.
4. El método de acuerdo a la reivindicación 1; en donde la búsqueda de una bacteria ácido láctica con presencia de un operón de histidina activo incluye las siguientes etapas:
cultivo de una cepa bacteriana ácido láctica;
extracción de ADN genómico de la cepa bacteriana ácido láctica;
amplificación por PCR de los genes *hdcP*, *hdcA* y/o *hdcB* mediante cebadores específicos; y
secuenciación del producto de PCR obtenido en el paso anterior.

5. El método de acuerdo a la reivindicación 4; en donde la búsqueda de una bacteria ácido láctica con presencia de un operón de histidina activo incluye:
amplificación por PCR del gen *hdcA* mediante los cebadores específicos SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la búsqueda de una bacteria ácido láctica que exprese la proteína DagK incluye las siguientes etapas:
cultivo de una cepa bacteriana ácido láctica en condiciones anóxicas;
obtención de un sobrenadante libre de células;
detección de la presencia de DagK mediante cromatografía líquida con espectrómetro de masas.
7. El método de acuerdo a la reivindicación 1, en donde la cepa bacteriana ácido láctica puede seleccionarse del grupo que incluye *Lactobacillus reuteri* DSM 32273, *Lactobacillus reuteri* ATCC PTA-6475 o *Lactobacillus reuteri* ATCC PTA-4659.

Bogotá D.C., Septiembre de 2019

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Ref.: Respuesta de requerimiento de fondo

No. de Exp.: NC2017/0009182

Patente: MÉTODO PARA LA SELECCIÓN DE UNA
CEPA BACTERIANA ÁCIDO LÁCTICA CAPAZ DE
PRODUCIR HISTAMINA Y PROTEÍNA
DIACILGLICEROL QUINASA

Oficio: 3297 de 28 de Mayo de 2019

Yo, **HASBLEYDI CALVO ROJAS** identificada con cédula de ciudadanía No. 53.123.537, portadora de la tarjeta profesional No. 248.664 del C. S. de la J., obrando como apoderada de BioGaia AB, solicitante de la patente en cuestión, me permito establecer que:

1. MODIFICACIONES A LA SOLICITUD

En primera medida, el solicitante manifiesta el deseo de modificar el título de la solicitud con el objetivo de divulgar la invención de manera clara y completa teniendo en cuenta lo reivindicado en el nuevo pliego reivindicatorio aquí adjunto. Así las cosas, dicho nuevo título corresponde a “**MÉTODO PARA LA SELECCIÓN DE UNA CEPA BACTERIANA ÁCIDO LÁCTICA CAPAZ DE PRODUCIR HISTAMINA Y PROTEÍNA DIACILGLICEROL QUINASA**”, el cual define la invención de manera precisa y se encuentra acorde con lo divulgado en la reivindicación independiente 1.

Del mismo modo y de acuerdo a las disposiciones del artículo 34 de la Decisión 486, me permito adjuntar a este memorial un nuevo capítulo reivindicatorio que consta de siete (7) reivindicaciones, al cual se realizaron las siguientes modificaciones:

- La antigua reivindicación 1 fue enmendada.
- La antigua reivindicación fue eliminada.

Con relación a las modificaciones anteriormente mencionadas, el solicitante manifiesta que éstas no amplían de ninguna manera la materia objeto de la solicitud en estudio y se realizan con el fin de superar las objeciones planteadas por el examinador en el oficio del examen de fondo para el cual se está presentando respuesta.

2. CLARIDAD DE LA SOLICITUD

Reivindicaciones

En primera medida, el solicitante desea indicar que la antigua reivindicación 8 fue eliminada del pliego reivindicatorio al ser considerada por el Examinador como no susceptible de patentabilidad de acuerdo con el artículo 20 de la Decisión 486.

El Examinador señala que la reivindicación 1 no es concisa pues *“se refiere a un método para la selección de una cepa bacteriana, cuyos dos primeros pasos esenciales son iguales ya que se refieren a la “búsqueda de una bacteria ácido láctica”*. En este aspecto, el Solicitante desea llamar la atención del Examinador al hecho que los dos primeros pasos del método divulgado en la reivindicación 1 no son iguales; más importante aún, hacen referencia a la búsqueda de bacterias ácido lácticas con dos características esenciales diferentes. A

continuación se copian los dos pasos esenciales que el Examinador señala como iguales para proceder a distinguir el uno del otro con base a lo enseñado en el pliego descriptivo de la solicitud:

- a. búsqueda de una bacteria ácido láctica con presencia de un operón de histidina activo;*
- b. búsqueda de una bacteria ácido láctica con presencia y/o expresión del gen *dagK*;*

Mientras que el primer paso hace referencia a la búsqueda de una bacteria ácido láctica que tenga en su genoma un operón de histidina activo, el segundo paso implica que ADEMÁS dicha bacteria debe codificar el gen *dagK* o expresarlo. Para una persona versada en la materia resulta evidente que el operón de histidina difiere totalmente del gen *dagK*, pues mientras el primero regula la producción de histidina, el gen *dagK* codifica la producción de la proteína diacilglicerol quinasa. El Solicitante también desea llamar la atención del Examinador al hecho que el pliego descriptivo de la solicitud es lo suficientemente claro en distinguir el operón de histidina del gen *dagK*. Así, en la página 18, líneas 1 a 15 se enseña lo siguiente:

*“En una realización particular, el operón de histidina comprende, o consiste de, un gen del antiportador histidina/histamina (*hdcP*), un gen de histidina descarboxilasa del tipo piruvoil A (*hdcA*) y un gen de histidina descarboxilasa del tipo piruvoil B (*hdcB*). Así, en una forma de realización la cepa bacteriana ácido láctica productora de histamina comprende los genes *hdcP*, *hdcA* y *hdcB*.”*

*“En una forma de realización, la cepa bacteriana ácido láctica productora de histamina es capaz de producir una diacilglicerol quinasa (*DagK*). Los datos experimentales tal como se presentan en el actual documento muestran que puede ser ventajoso el usar una cepa bacteriana ácido láctica productora de histamina y de*

DagK en la profilaxis, inhibición o tratamiento del cáncer colorrectal o en la reducción del riesgo de recaída del cáncer colorrectal.”

“La producción de DagK tiene efectos benéficos en términos de la supresión de la señalización corriente abajo de H1R para suprimir los efectos inflamatorios que la histamina, de otro modo, puede causar. De acuerdo con lo anterior, la producción tanto de histamina como de DagK dirige la acción de activar H1R a activar H2R, el cual promueve los efectos anti-inflamatorios de la histamina.”

A partir de los anteriores párrafos resulta claro que la producción de diacilglicerol quinasa e histidina (regulada bajo el operón histidina) es controlada por diferentes rutas metabólicas y, particularmente, por diferentes genes (gen *dagK* y genes comprendidos en el operon histidina).

Vale la pena resaltar que el método de la invención cubre la búsqueda de una cepa bacteriana ácido láctica que comprenda un operón activo de histidina (primer paso) Y QUE ADEMÁS codifique y/o exprese el gen *dagK*, responsable de la producción de diacilglicerol quinasa (segundo paso) debido a que dicha cepa tendría efectos benéficos al ser administrada a un paciente en términos de prevención, reducción o tratamiento de varias condiciones inflamatorias. El Solicitante se permite citar lo descrito en la página 22, líneas 5 a 10, del pliego descriptivo:

“La DagK producida suprimirá las propiedades inflamatorias de la histamina mediante la supresión de la ruta de señalización corriente abajo de H1R. Por consiguiente, la histamina puede tener propiedades anti-inflamatorias debido a la activación de H2R.”

De lo anterior resulta claro para una persona versada en la materia que una cepa que tenga únicamente activo el operón histidina o que únicamente codifique o exprese el *dagK*

no será capaz de generar un efecto positivo en pacientes con condiciones inflamatorias pues si la proteína DagK no es expresada, no ocurre la interrupción corriente abajo del receptor H1R mediante la inhibición del lípido DAG, y por ende, no se suprimen los efectos pro-inflamatorios de la histamina. En el mismo sentido, si el operón histidina no se encuentra activo en la cepa bacteriana, no será posible producir histamina, no se activará la ruta metabólica mediada por el receptor H2R y por ende no existirán efectos anti-inflamatorios en el paciente.

A partir de lo anterior, el Solicitante se permite señalar que contrario a lo afirmado por el Examinador, los dos primeros pasos de la reivindicación independiente 1 son diferentes y se encuentran debida y extensamente sustentados en el capítulo descriptivo de la solicitud.

Por otra parte, el Examinador señala que *“ninguno de los tres pasos describe las condiciones en que debiera llevarse a cabo el método toda vez que, el paso de selección, no menciona que se deben cultivar las cepas bacterianas y luego analizar la presencia y/o expresión del gen DagK mediante la técnica de PCR empleando los cebadores específicos de SEQ ID NO: 21 y 22”*. En este aspecto, el Solicitante se permite señalar que las reivindicaciones dependientes 2 y 3 divulgan los pasos requeridos para detectar el gen *dagK*. Así, mientras la reivindicación 2 divulga las etapas para la detección del gen *dagK*: (i) cultivar una cepa bacteriana ácido láctica, (ii) extraer ADN a la cepa bacteriana, y (iii) amplificar por PCR el gen *dagK* mediante cebadores específicos, la reivindicación 3 enseña que los cebadores específicos pueden corresponder con SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22.

Es pertinente llamar la atención del Examinador al hecho que la amplificación de un gen puede comprender el uso de un par de cebadores que flanqueen el gen de interés, que amplifiquen el gen desde sus extremos 5' y 3', que amplifiquen una parte interna del gen O una combinación de las anteriores posibilidades. Así, resulta evidente para una persona versada en la materia que no existe un único par de cebadores que permita la amplificación de un gen; y por ende, no es objeto de la solicitud comprender en el método de detección del

gen *dagK* únicamente el par de cebadores SEQ ID NO:21 y SEQ ID NO:22 pues se limitaría de manera innecesaria el método de la invención.

En cuanto a la reivindicación 4, el Examinador señala que esta presenta errores de dependencia pues *“el proceso de selección de la reivindicación 1 se lleva cabo mediante la detección del gen *dagK*, en tanto que, el método de la reivindicación 4 comprende la búsqueda de los genes *hdcP*, *dhcaA* y/o *hdcB*.”*. En este aspecto, el Solicitante desea reiterar que el método de la reivindicación 1 comprende la búsqueda de una bacteria ácido láctica que posea o exprese el gen *dagK* y que ADEMÁS comprenda un operón de histidina activo. Para cualquier persona versada en la materia es de conocimiento general que un gen y un operón son diferentes pues este último se define como *“una unidad genética funcional formada por un grupo o complejo de genes capaces de ejercer una regulación de su propia expresión”*. Así las cosas, la reivindicación 4 precisa el complejo de genes que conforma el operón de histidina mencionado en la reivindicación 1 y protege una realización particular del método de la invención. Por consiguiente, se solicita al Examinador que desestime la objeción presentada a la reivindicación 4 al no presentar errores de dependencia.

3. UNIDAD DE INVENCION

El Examinador señala que la solicitud carece de unidad inventiva pues *“reclama más de un grupo inventivo sin la presencia de características o elementos técnicos nuevos e inventivos que son comunes a todas las invenciones”*. A partir de lo anterior, el Examinador indica que el primer grupo inventivo divulga un método para la selección de una cepa bacteriana ácido láctica, en donde dicho método comprende la búsqueda de una bacteria ácido láctica con un operón de histidina activo y con presencia o expresión del gen *dagK* para la posterior selección de la cepa. El segundo grupo inventivo, según el Examinador, comprende un método para la selección de una cepa bacteriana ácido láctica, en donde dicho método comprende la búsqueda de una bacteria ácido láctica por medio del cultivo de la cepa,

la extracción de ADN, la amplificación por PCR de los genes *hdcP*, *hdcA* y/o *hdcB* con los cebadores SEQ ID NO: 23 y 24 y la secuenciación del producto para la posterior selección de la cepa.

El Solicitante se permite manifestar que la solicitud no carece de unidad de invención pues los dos grupos inventivos mencionados por el Examinador hacen parte de un solo grupo que se encuentra ampliamente detallado en el pliego descriptivo, de tal manera que cualquier persona versada en la materia lo pueda replicar. Es necesario resaltar que los genes *hdcP*, *hdcA* y/o *hdcB*, los cuales el Examinador señala como parte de un segundo grupo inventivo, integran el operón de histidina que el mismo Examinador clasifica en el primer grupo inventivo. Por lo anterior, la amplificación de los genes *hdcP*, *hdcA* y/o *hdcB* que se contempla en la reivindicación 4 únicamente limita la reivindicación 1, protege una realización particular del método de la invención y no agrega un nuevo grupo inventivo a la Solicitud.

También es deseo del Solicitante resaltar que la combinación de la búsqueda de una cepa con un operón de histidina activo CON la búsqueda de una cepa con presencia y/o expresión del gen *dagK* es novedosa y no ha sido previamente divulgada en el arte, contrario a lo señalado por el Examinador. Por las razones anteriormente expuestas, respetuosamente se solicita al Examinador desestimar la objeción hecha a la solicitud por falta de unidad inventiva.

4. PRECISIÓN DEL ESTADO DE LA TÉCNICA

La Superintendencia relaciona los documentos D1 y D2, los cuales anticipan el objeto de la presente solicitud. Sin embargo, pasaremos a dar cuenta de que esta anterioridad no posee las mismas características esenciales tal como se encuentran definidas en el nuevo pliego reivindicatorio.

5. VIOLACIÓN DE NIVEL INVENTIVO

El Examinador establece en su concepto técnico que el pliego reivindicatorio carece de nivel inventivo a la luz de los documentos D1 y D2. Sin embargo, respetuosamente el Solicitante desea manifestar su desacuerdo por las razones que se señalaran a continuación.

D1 (US20130022586)

El documento D1 es considerado como el estado de la técnica más cercano a la presente invención y, como bien lo indica el Examinador, se caracteriza por divulgar “*un método para seleccionar una cepa bacteriana para la producción de histamina en un mamífero que comprende los pasos de buscar bacterias que contengan un operón de histidina activo y seleccionar las bacterias ácido lácticas que tengan dicho operón y que sean capaces de producir histamina*” (Pág 11, reiv 1).

A partir de la definición anterior resulta claro que el documento D1 enseña un método para la selección de cepas bacterianas que posean un operón activo de histidina y que además sean capaces de producir histamina. Sin embargo, dicho método falla en enseñar o siquiera sugerir la posibilidad de buscar cepas bacterianas con presencia y/o expresión del gen *dagK*

A partir de lo anterior, el Examinador se permite resaltar respetuosamente que es precisamente en la etapa de búsqueda de cepas bacterianas ácido lácticas con presencia y/o expresión del gen *dagK* donde radica la diferencia entre la presente invención y el método enseñado en D1.

D2 (Santos F., Tesis Ph.D)

El documento D2 es una tesis doctoral que tiene como objetivo estudiar y caracterizar la producción de la vitamina B12 en *Lactobacillus reuteri* mediante una aproximación multidisciplinaria con el fin de explorar sus aplicaciones potenciales.

El Examinador señala que el documento D2 “*ya divulga el gen RLRE00833 que codifica la enzima Diacilglicerol quinasa (DagK) en Lactobacillus reuterii (Pág.119). En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia emplearía el gen dagK señalado en el documento D2, en el método para la búsqueda y selección de cepas divulgado en el documento D1, y llegaría así al objeto de la reivindicación 1 de la solicitud. Por lo cual se considera obvia*”. A partir de lo anterior el Solicitante se permite precisar lo siguiente:

En primera medida vale la pena resaltar que no es objeto de la invención patentar el gen RLRE00833, el cual es enseñado en el documento D2, sino un método para la selección de una cepa bacteriana que comprenda un operón activo de histidina Y codifique el gen dagK debido a que esta cepa tendría efectos benéficos al ser administrada a un paciente en términos de prevención, reducción o tratamiento de varias condiciones inflamatorias.

De la misma manera, el Solicitante se permite manifestar que ninguna persona versada en la materia tendría motivación alguna en combinar las enseñanzas de los documentos D1 y D2 con el fin de obtener un método para la obtención de una cepa bacteriana ácido láctica que tenga efectos benéficos sobre varias condiciones inflamatorias. En este aspecto, vale la pena señalar que el documento D2 únicamente hace mención de la enzima diacilglicerol quinasa (DagK) en las tablas suplementarias 4.S1.1 y 4.S2.1, en donde se listan más de cincuenta proteínas envueltas en simulaciones in *sílico* de redes metabólicas. Por lo demás, no existe mención alguna en el documento D2 del efecto de la enzima diacilglicerol quinasa en el metabolismo de *Lactobacillus reuteri* y/o los métodos para la detección del gen que codifica esta proteína en bacterias ácido lácticas. Dado lo anterior, no existe razón alguna para que a partir de lo divulgado en el documento D2 una persona versada en la materia pueda inferir que la presencia de este gen MÁS la presencia de un operón de histidina activo en una cepa bacteriana ácido láctica produzca efectos anti-inflamatorios beneficiosos en mamíferos.

Cabe la pena señalar que antes de la presente invención ya se conocía en el estado del arte que unas pocas cepas bacterianas tenían la capacidad de producir histamina con actividad anti-inflamatoria. También era de conocimiento general que la producción local de dicha histamina en el tracto gastrointestinal podía proveer efectos antiinflamatorios terapéuticos beneficiosos (D1). Sin embargo, así como era de conocimiento la existencia de cepas bacterianas ácido lácticas beneficiosas también se conocía que algunas cepas bacterianas productoras de histamina podrían ser tóxicas al estar asociadas con la toxicidad inducida por histamina.

Así las cosas, antes de la presente invención no era de conocimiento general cuál era la diferencia entre las cepas productoras de histamina beneficiosas y las tóxicas, así como tampoco la razón por la cual la producción de histamina por parte de cepas bacterianas ácido lácticas podría ser beneficiosa o tóxica para el mamífero. Por consiguiente, a partir del estado de la técnica, incluyendo D1 y D2, una persona versada en la materia no hubiese podido identificar fácilmente cepas beneficiosas productoras de histamina y tampoco le hubiese sido evidente que estas cepas pudiesen ser útiles para la profilaxis, inhibición, tratamiento o reducción del riesgo de recaída de cánceres asociados con histamina.

Por lo anterior, la etapa de búsqueda de cepas con presencia y/o expresión del gen *dagK* sí resulta novedosa e inventiva sobre el documento D2 pues en dicho documento **no se hace mención alguna a la posibilidad de detectar el gen o la proteína diacilglicerol quinasa (DagK) ni tampoco resulta evidente para una persona versada en la materia la detección específica de dicha proteína.**

Cabe resaltar que la importancia de la búsqueda de cepas productoras de histamina con presencia y/o expresión del gen *dagK* radica en que **únicamente** estas son capaces de

causar una supresión de la señalización corriente abajo de H1R pero inducir la activación de H2R. Lo anterior, a su vez, suprime los efectos pro-inflamatorios de la histamina y promueve los síntomas anti-inflamatorios que resultan beneficiosos para el mamífero al que se le administra la cepa.

Ninguno de los dos documentos citados como estado del arte previo divulga o sugiere un método para la selección de una bacteria ácido láctica que prevenga o reduzca los efectos de condiciones inflamatorias mediante la búsqueda de una cepa con un operón de histidina activo Y AL MISMO TIEMPO con el gen *dagK*. **Vale la pena resaltar que los inventores de la presente solicitud encontraron, como evento novedoso, que una cepa bacteriana ácido láctica capaz de producir tanto histamina como la proteína DagK causa una supresión en la ruta de señalización del receptor H1R e induce la activación de H2R.** Lo anterior a su vez suprime los efectos pro-inflamatorios de la histamina y promueve los síntomas anti-inflamatorios, lo cual resulta beneficioso en la profilaxis, inhibición, tratamiento y/o reducción del riesgo de recaída de condiciones inflamatorias asociadas con histamina. Lo anterior resulta nuevo e inventivo y no se divulga o sugiere en ninguno de los documentos citados por el Examinador. De la misma manera, a partir de los documentos D1 y D2 una persona versada en la materia no sería capaz de idear el método aquí reclamado.

Por las razones anteriores, la reivindicación independiente 1, y todas sus dependientes, resultan inventivas sobre los documentos D1 y D2. En vista de lo anterior, el Solicitante muy respetuosamente desea señalar que ningún documento del arte previo, ni ninguna de sus combinaciones, permitiría que el presente pliego reivindicatorio fuera anticipado u obvio para un experto en la materia.

De este modo, me permito establecer a la Superintendencia que la presente solicitud,

tal como se encuentra definida en las nuevas reivindicaciones 1 a 7, cumple con los requisitos de claridad, novedad y nivel inventivo. Asimismo, el Solicitante se permite resaltar que las nuevas reivindicaciones se han modificado de modo que la invención allí definida está descrita en términos de sus características técnicas esenciales que permiten que un experto en la materia la entienda y la pueda desarrollar.

Documentos anexos

Con el presente recurso de reposición se anexan los siguientes documentos:

1. Nuevo pliego de reivindicaciones.

De usted,



Hasbleydi Calvo Rojas

C.C. 53.123.537 de Bogotá D.C.

T.P. 248.664 del C.S.J