

CAVELIER

ABOGADOS

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTÁ 8, COLOMBIA

Teléfono: (57-1) 347 3611
Telefax: (57-1) 211 8650
(57-1) 540 0860
Fax in U.S.A.: (1-305) 381 9660

Señora Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 03-078437- -00005-0000

Fecha 2008-02-18 17 19 07 Dep 2020 NUECREACIONI
Tra 2 PATENTES Eve 1 REGDE-POSITO
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 13

Trámite : 002 Evento : 001 Actuación : 44.

Referencia : Expediente No. 03.078.437
Asunto : Solicitud de Patente para **BIOINSECTICIDA BASADO
EN UNA CEPA DE BACILLUS THURINGIENSIS
(BERLINER), LA FORMULACION Y LOS
PROCEDIMIENTOS DE PRODUCCION**
Solicitante : **INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL**
Fecha de Solicitud : 8 de septiembre de 2003

1. Yo, Emilio FERRERO, obrando como apoderado del solicitante en el asunto antes identificado, me refiero al Oficio No. **13004** notificado por fijación en lista del 11 de octubre de 2007.

2. Mediante mi memorial de fecha 9 de enero de 2008 solicité un plazo de 30 días para atender el Oficio No. **13004**.

3. Mediante el Oficio No. **13004** se puso en conocimiento del solicitante el informe que contiene las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente.

Atiendo a las observaciones de la manera siguiente:

3.1. **CLARIDAD DE LA SOLICITUD Y ES UNA INVENCION.**

Para subsanar las objeciones que sobre claridad y por no ser una invención hizo su Despacho, presento nuevo pliego reivindicatorio con 6 reivindicaciones en el cual las reivindicaciones 1 a 5 referentes a la cepa han sido eliminadas.

Así, el nuevo pliego reivindicatorio esta dirigido a una composición (reivindicación 1) y al procedimiento de fermentación para la producción industrial del principio activo de dicha composición (reivindicación 4), los cuales están caracterizados por sus componentes y las proporciones de los mismos, así como por las etapas y las condiciones de operación, respectivamente. Incluyendo como es debido, las características que le brindan tanto al producto como al procedimiento novedad y nivel inventivo frente al estado del arte.

Por otra parte y con el fin de demostrar la efecto técnico inesperado, la efectividad y la eficiencia tanto de la composición como del proceso reivindicados, se presenta junto con este escrito (ver anexo 4.4.) resultados experimentales; datos comparativos que permiten evidenciar con claridad las ventajas técnicas de la invención.

A este respecto, y con el fin de determinar la validez de los resultados obtenidos en la experimentación, es importante aclarar que la cepa HD 137 fue escogida como parámetro de comparación, toda vez que es la cepa internacionalmente reconocida como la de mayor actividad contra *Spodoptera frugiperda*. En este documento se especifica la metodología adoptada para llevar a cabo el estudio así, los resultados obtenidos y las conclusiones que se pudieron derivar de dichos resultados.

De esta manera es claro que con las anteriores modificaciones del capítulo reivindicatorio quedan subsanadas las objeciones que por claridad y por no ser una invención hizo su Despacho, ya que ahora, dicho pliego reivindica un producto y un procedimiento en los términos sugeridos por su Despacho y permite determinar el alcance de la protección reivindicada y compararla frente al estado del arte, de acuerdo con las disposiciones de los artículos 15 y 28 de la Decisión 486.

3.2. NOVEDAD

Ese Despacho afirma que el documento **D1** afecta la novedad de la presente invención pues considera que al comparar el documento D1 con la solicitud en estudio, la materia

reclamada es equivalente, es decir que el objeto reclamado por la solicitud en estudio ya había sido divulgado con anterioridad y ha sido largamente conocido en el estado de la técnica.

De acuerdo con lo anterior, procederemos a indicar las razones por las cuales el documento citado no afecta la novedad de la presente solicitud de patente. Veamos:

a) La cepa de *Bacillus thuringiensis* IBUN 90.1.98 reivindicada como principio activo en la presente solicitud de patente, corresponde a un aislamiento nativo obtenido de suelos colombianos, la cual produce una proteína de 130 a 135 KDa que presenta una mayor toxicidad contra larvas de *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (*S.f.*) (ver Anexo 4.4.).

Por consiguiente, de acuerdo con los lineamientos del Manual Andino, la composición reivindicada en la presente solicitud de patente es novedosa a la luz de D1, por cuanto dicho documento no especifica cada uno de los componentes reivindicados, a saber, la cepa de *Bacillus thuringiensis* IBUN 90.1.98 como principio activo.

Adicionalmente, la composición aquí reivindicada es ventajosa sobre las composiciones descritas en D1, toda vez que la misma conduce a un efecto insecticida mayor, particularmente contra larvas de *Spodoptera frugiperda*. Efecto claramente soportado por los experimentos comparativos realizados por el inventor (Anexo 4.4.).

b) Con respecto al método de producción del ingrediente activo (IA), es importante resaltar que éste está constituido por la espora del microorganismo y un cristal que se produce simultáneamente con la espora, cristal que esta formado por proteínas, algunas de las cuales presentan actividad tóxica contra larvas de insectos. Así, la espora *per se* es una diferencia con otros IA pues es producida por la cepa nativa y posee diferencias genéticas con otras cepas empleadas en productos comerciales o en patentes.

Adicionalmente, si bien las etapas del proceso de fermentación van desde la preparación de los inóculos y el medio de cultivo, la fermentación, la recuperación del IA y su purificación y cada una individualmente considerada podía ser conocida en los procesos de producción de bioinsecticidas de *B.th.*, respetuosamente ponemos de presente que el proceso aquí descrito se diferencia de aquel descrito en el estado del arte tanto por **la secuencia en el proceso como por la magnitud de las variables características de cada operación unitaria.**

Así, como es bien conocido, el efecto de estas características se refleja en indicadores como rendimientos, actividad entomocida (capacidad de control de larvas del insecto blanco *S.f.*) y concentración de IA en el producto obtenido.

Por consiguiente, de acuerdo con los lineamientos del Manual Andino de Patentes **diferencias en las variables o condiciones características de cada operación unitaria le otorgan al proceso aquí reivindicado novedad frente a los procesos descritos en el estado del arte.** A saber:

La transferencia de oxígeno en la fermentación con *Bacillus thuringiensis*, afecta la actividad del ingrediente activo que produce la cepa IBUN 90.1.98. Para mantener un nivel elevado de actividad, el coeficiente de transferencia de oxígeno **K_L debe mantenerse entre 61.2 y 108.76 horas a la menos uno (h^{-1}).** Variable que caracteriza y diferencia el proceso descrito en la presente invención de aquel descrito en el estado del arte.

El medio de cultivo se realizó optimizando su composición desde el punto de vista de nutrientes/costo, tomando como respuesta la concentración final de ingrediente activo (cristal de delta-endotoxina y esporas de la cepa IBUN 90.1.98) y la actividad de esta contra *Spodoptera frugiperda*. Se emplearon dos métodos, diseño central compuesto para la fase de experimentación y, para la fase de optimización se utilizó el método desarrollado por Derringer y Suich (Derringer G. and Suich R. 1980. Simultaneous optimization of several response variables. Journal of Quality Technology. 12. 214-219)

para multiples respuestas. Los resultados de la experimentación empleando estas herramientas estadísticas se presenta en la siguiente tabla.

Optimización conjunta de los nutrientes empleados en el medio de cultivo según método de Derring y Suich

Número	CaCO ₃ (g/L)	Jarabe (g/L)	Melaza (g/L)	Harina (g/L)	Peso (g/L)	Costo (\$/Kg producto)	Deseabilidad
1	1,94	20,00	30,00	24,96	16,8086	621,81	0,835
2	1,93	20,00	30,00	25,00	16,8094	622,524	0,830
3	1,91	20,00	30,00	25,00	16,7782	623,508	0,822
4	2,00	19,98	30,00	20,66	14,4183	615,577	0,709
5	1,94	20,00	30,00	17,88	12,9597	595,915	0,640
6	2,00	20,00	12,84	25,00	13,6785	644,498	0,447

De acuerdo con estos resultados, la composición del medio de cultivo debe ser:

CaCO ₃	1.91 – 2.00 g/l
Jarabe de maíz	19.9 – 20.0 g/l
Melaza	12.84 – 30.0 g/l
Harina de soya	17.88 – 25.0 g/l

Empleando medios de cultivo de estas composiciones se producen entre 12.9 y 16.8 g/l de ingrediente activo, y la contribución del medio de cultivo a los costos de producción será entre 595 y 644 pesos colombianos por kilogramo de producto (biopesticida de *B.th.*).

Por consiguiente, a pesar de tratarse de una fermentación, sus condiciones de operación son particulares y únicas, pues si no se reproducen se presentarán variaciones

significativas sobre los rendimientos y, lo más importante, sobre la actividad entomocida del IA.

Así, toda vez que D1 no especifica los sustratos empleados en la fermentación ni la razón en el suministro de oxígeno durante la fermentación, nutriente que presenta una alta influencia sobre la producción del IA, dicho documento no afecta la novedad de la presente invención.

c) Por último, la formulación del producto es única, toda vez que **emplea el IA que se obtiene de fermentaciones con la cepa nativa**. Los excipientes que se incorporan en la formulación son de uso en la obtención de insumos agrícolas y de productos farmacéuticos, pero sus características técnicas y su concentración en la formulación son únicas y particulares y se han generado a partir de experimentación en laboratorio, en invernadero y en campo.

Así entonces, es claro que D1 no anticipa todas las características técnicas de la composición y/o del procedimiento de la presente invención, toda vez que no especifica la combinación específica, es decir, el ingrediente activo; no sugiere su efecto sinérgico inesperado, ni las condiciones de operación particulares para el proceso de producción del mismo. Por lo tanto, se puede concluir que dicho documento no afecta la novedad de la presente solicitud.

4. Puesto que se han atendido a cabalidad las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente, atentamente solicito que se continúe su tramitación.

5. **Anexos:**

- 5.1. Nuevo pliego reivindicatorio con 6 reivindicaciones;
- 5.2. Formulario para modificaciones;

5.3. Recibo por valor de \$103.000 por concepto de modificaciones en solicitud pendiente;

5.4. *Bioensayo con ingrediente activo de la cepa de B.th. IBUN 90.1.98 para evaluar toxicidad contra Spodoptera frugiperda.*

Señora Jefe,



EMILIO FERRERO

T.P.A. No. 31.929

COLO-12726-801-002-3
NNJ\NNJ\ID-119334\WPC12726
No. M-2008-119334\NNJ

FORMULARIO UNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES

1	SOLICITUD DE: ☐ Corrección de Error Material ☒ Modificación a una solicitud	
2 SOLICITANTE	Nombre: UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA. Dirección: Instituto de Biotecnología, Calle 30 # 45-02 Edificio Manuel Ancizar, Bogotá, D.C., Colombia Domicilio: Bogotá, D.C., Colombia Teléfono: 546 09 70 Fax: 249 40 70 E-mail: clientes@cavelier.com	IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número: _____
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: Emilio FERRERO Dirección: Carrera 4ª No. 72-35 Teléfono: 347 36 11 Fax: 217 92 11 E-mail: cavelier@cavelier.com	IDENTIFICACION C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número: <u>438.019 TP 31.929</u>
4	Número de expediente: <u>03.078.437</u>	
5	Descripción de la corrección o modificación solicitada: Presento nuevo capítulo reivindicatorio compuesto por 6 reivindicaciones con el fin de superar las observaciones hechas por Su Despacho a la presente solicitud y pido que el examen de patentabilidad sea realizado sobre este nuevo capítulo reivindicatorio.	
6	Comprobante de pago No. <u>08-11.226</u> Fecha: <u>11 de febrero de 2008</u>	
7	Anexos ☒ Comprobante de pago de la tasa por \$103.000 por concepto de modificaciones. ☐ Poderes, si fuere el caso ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas.	
8	NOMBRE: EMILIO FERRERO	FIRMA:  C.C. 438.019 de Usaquén T.P.A. 31.929

SA

REIVINDICACIONES

1. Un agente/composición de control biológico CARACTERIZADO porque comprende:
 - proteína de 130 a 135 kilodaltons (KDa) producida por una cepa nativa de *Bacillus thuringiensis* depositada bajo número de registro ATCC 202194;
 - talco como agente lubricante;
 - melaza deshidratada como agente de granulación;
 - caolín como agente diluyente; y
 - polímero natural como estabilizante.
2. El agente/composición de control biológico de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la proteína está contenida en un cristal producido por dicha cepa, o es la espora que produce dicha cepa.
3. El agente/composición de control biológico de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el talco empleado se encuentra en una concentración entre el 60 y el 80%, el caolín entre el 10 Y el 30%, la melaza entre 3 y el 12 %, el polímero natural entre el 0,5 y el 1.2% y la proteína o espora en una concentración entre el 6 y el 10%.
4. Un procedimiento de fermentación para la producción industrial de un agente de control biológico correspondiente a las reivindicaciones 1 a 3, que emplea medios de cultivo con melaza, jarabe de maíz y harina de soya, para alcanzar una concentración final entre 12 - 15 g/l de ingrediente activo, con una actividad insecticida contra *Spodoptera frugiperda* en dosis letal 50 (DL50) de

55
5

83 nanogramos por centímetro cuadrado (ng/cm²), que comprende las etapas de:

- preparar un inóculo que corresponde al 10% del volumen del inóculo;
- activar el inóculo a partir de una cepa pura de *Bacillus thuringiensis* esporulada y conservada en un medio sólido;
- mantener el inóculo por un tiempo no mayor a 16 horas;
- separar el medio de cultivo obtenido por filtración;
- secar la torta obtenida del ingrediente activo y someterla a una etapa de reducción de tamaño en un molino;
- agregar disolventes y/o coadyuvantes de formulación.

5. El procedimiento para la producción del ingrediente activo de conformidad con la reivindicación 4 que se caracteriza por utilizar como fuente de carbono en la fermentación melaza en concentraciones entre 10 y 20 g/l y como fuentes de nitrógeno emplea jarabe de maíz y harina de soya en concentraciones de 5 a 10 g/l y 10 a 20 g/l respectivamente.

6. El procedimiento de conformidad con la reivindicación 5, en donde se emplean como condiciones ambientales para la fermentación temperaturas entre 28 y 32 grados centígrados, coeficientes volumétricos de transferencia de oxígeno entre 18 y 80 minutos a la menos uno (min⁻¹), pH variando entre 6,5 y 8,8, velocidades de agitación entre 90 y 800 revoluciones por minuto y concentraciones de oxígeno disuelto entre el 10 y el 100 por ciento del valor de la concentración de saturación de oxígeno en el medio de cultivo.

Anexo 4.4. Bioensayo con ingrediente activo de la cepa de *B.th.* IBUN 90.1.98 para evaluar toxicidad contra *Spodoptera frugiperda*

Bioensayo con ingrediente activo de la cepa de *B.th.* IBUN 90.1.98 comparada contra la cepa de *B.th.* HD 137 variedad Aisawai.

Siguiendo la metodología presentada en le acápite “Bioensayo con ingrediente activo de la cepa de *B.th.* IBUN 90.1.98 para evaluar toxicidad contra *Spodoptera frugiperda*”, se determinó la actividad expresada en porcentaje de mortalidad (concentración letal 50 – CL 50, que corresponde a la concentración que causa una mortalidad del 50% de individuos). Para determinar la CL 50 se usaron concentraciones de ingrediente activo de la cepa IBUN 90.1.98 y de la cepa HD 137 en el intervalo entre 0 y 800 ng/cm².

Bioensayo con ingredientes activos de las cepas de *B.th.* IBUN 90.1.98 y cepa HD 137 para determinar actividad en dosis de 0 a 800 nanogramos por centímetro cuadrado (ng/cm²)

Dosis ng/cm2	Número de larvas a evaluar	Número de larvas muertas	% mortalidad
Cepa HD 137			
0	72	1	1.38
100	72	3	4.16
200	72	64	88.8
400	72	72	100
800	72	72	100
Cepa IBUN 90.1.98			
0	72	2	2.77
100	72	65	90.27
200	72	72	100
400	72	72	100
800	72	72	100

Bioensayo con ingredientes activos de las cepas de *B.th.* IBUN 90.1.98 y cepa HD 137 para determinar efectividad representada en dosis letal 50 (DL 50) en dosis de 0 a 210 ng/cm²

Dosis ng/cm2	Número de larvas a evaluar	Número de larvas muertas	% mortalidad
Cepa HD 137			
0	72	0	0
30	72	4	5.5

57
57

60	72	12	16.6
90	72	32	44.4
120	72	45	62.5
150	72	47	65.3
180	72	52	72.2
210	72	55	76.4
Cepa IBUN 90.1.98			
0	72	6	8.53
30	72	27	37.5
60	72	31	43
90	72	37	51.3
120	72	49	68
150	72	49	68
180	72	50	69.4
210	72	60	83.3

El número de larvas se maneja en tres grupos de 24 larvas cada uno, para realizar el bioensayo por triplicado. La herramienta estadística empleada fue el Análisis PROBIT. De acuerdo con estos resultados las dosis letal 50 (DL50) para cada cepa es:

Cepa	Porcentaje de mortalidad		CL 50 (ng/cm ²)
	Limite inferior	Limite superior	
HD 137	42.37	54.16	134
IBUN 90.1.98	56.3	69.0	83

Se observa en la tabla que para lograr un 50% de mortalidad en las larvas de *Spodoptera frugiperda* se requiere una menor concentración con la cepa IBUN 90.1.98 (83 ng/cm²) que con la cepa patrón HD 137 (134 ng/cm²). Es decir que el ingrediente activo obtenido con la cepa IBUN 90.1.98 es un 62% más activo que el obtenido con la cepa patrón HD 137.

58
58

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 11,226
FECHA : FEBRERO 11 DE 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 03-078437- -00005-0000

Fecha 2008-02-18 17:19:07 Dep 2020 NUECREACION
Tra 2 PATENTES Eve 1 REGDEPOSITO
Act 444 RESPUESTAREQUE Folios 13

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	2678193	11/02/2008	51,814,500.00

***** CONCEPTO *****

Y. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-03 CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	12 MARCAS Y LENAS COMERCIALES	103,000.00
	TOTAL :	\$ 103,000.00

SON: CIENTO TRES MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

2126-801-002-3