



No. 12-021203- -00006-0000

Fecha: 2014-03-20 14:54:54 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 54

P-3192

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Re: Expediente No. **12-021.203**
Solicitud de patente a nombre de **CAMLIN FINE SCIENCES LIMITED**

Yo, SILVANA MARIA LOPEZ DIAZ identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la Carrera 11 No. 86-53, piso 6, obrando como apoderada de la sociedad **CAMLIN FINE SCIENCES LIMITED** solicitante de la patente de la referencia, por medio de la sustitución adjunta, en respuesta a los oficios No. **21101** y **21135** notificados por fijación en lista el 12 de noviembre de 2013, relacionados con el concepto técnico de fondo, me permito manifestar:

1. Con fundamento en la facultad que confiere el artículo 34 de la Decisión 486 al solicitante para modificar la solicitud de patente en cualquier momento del trámite, presento junto con este memorial nuevo capítulo reivindicatorio en el cual se realizaron las siguientes modificaciones:
 - 1.1 Como primera medida, se modificaron las reivindicaciones 1 y 4 con el fin de eliminar el término “precursor de quitosano” y “precursor activado”.
 - 1.2 Así mismo, se eliminó el término “quitina activada” de la reivindicación 3.
 - 1.3 Se modificó la reivindicación 13 para depender de la reivindicación 12.
 - 1.4 Se modificaron las reivindicaciones 22 y 23 con el fin de reemplazar la frase “o reivindicación 6” por “el paso c)”. Una modificación similar se realizó en la reivindicación 24.
 - 1.5 Para realzar la claridad de las reivindicaciones y para distinguir las limitaciones genéricas y las limitaciones específicas/adicionales, se eliminaron de las reivindicaciones 3, 6 y 33 las limitaciones específicas y hacer las dependientes de las reivindicaciones 27, 28 y 30 respectivamente.
 - 1.6 La reivindicación 23 se enmendó para cancelar la limitación adicional de la característica genérica para hacer la materia objeto dependiente de la nueva reivindicación 30.

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

- 1.7 Las reivindicaciones 5 a 9, 12, 14, 15 y 18 a 26 se modificaron para reemplazar el artículo indefinido “un” por el artículo definido “El”.
- 1.8 Se modificaron las reivindicaciones 3,6-9, 11 y 20 para eliminar los términos “por lo menos” y agregar la expresión “o más” como se requiere en el contexto,
- 1.9 La reivindicación 11 se modificó en aras de reemplazar el término “un” con el término concreto “el quitinolítico”.
- 1.10 La reivindicación 13 se modificó para hacerla dependiente de la reivindicación 12.
- 1.11 En la reivindicación 15 se incluyeron los ingredientes/componentes adicionales del cultivo aislado.
- 1.12 Las reivindicaciones 16 y 17 se cancelaron y no se reemplazaron por otras.
- 1.13 Las reivindicaciones 22 y 23 se modificaron para hacerlas dependientes del paso c) de la reivindicación 3 dado que el antecedente pertenece al paso c) de la cláusula 3 y no a la reivindicación 1. Esta reivindicación se modificó adicionalmente para cambiar la posición del término “termoestable” para hacer el significado más claro.

En cuanto a estas modificaciones, me permito decir que las mismas no amplían de ninguna manera la materia objeto de la presente solicitud y se realizaron con el ánimo de superar las objeciones de claridad y novedad planteadas por el examinador en su concepto técnico.

No se presenta tasa por reivindicaciones adicionales, toda vez que el nuevo pliego reivindicatorio contiene menos cláusulas que aquel originalmente presentado y por el cual ya se pagó tasa en su momento.

2. No es una invención

El examinador indica en su concepto técnico que “*El objeto de la reivindicación 15 no se considera una invención, de acuerdo con el Art. citado...*”, a lo cual el solicitante muy respetuosamente manifiesta que no está de acuerdo, toda vez que dicha reivindicación 15 cubre dentro de su alcance un “*Cultivo CARACTERIZADO porque es aislado de Aspergillus niger MTCC 5572 o mutantes derivados del mismo*”, el cual corresponde a cultivos aislados que no corresponden a “*todo o parte de seres vivos tal como se encuentran en la naturaleza*”, tal como se encuentra definido en el artículo 15 literal b), hecho que es claro y reconocido por una persona versada en la materia.

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

Así las cosas, nos permitimos informar a ese despacho que Colombia está comprometida con el acuerdo de los ADPIC y está unida al Artículo 27 (3)(b) en donde únicamente las plantas y animales se pueden excluir de patentabilidad y los microorganismos no se pueden excluir, tal como lo ha interpretado erróneamente el examinador. Así, dicho artículo 27 puede ser consultado en la página web: http://www.wto.org/spanish/docs/s/legal/s/27-trips_04c_s.htm, donde se establece que:

“3. *Los Miembros podrán excluir asimismo de la patentabilidad:*

- a) los métodos de diagnóstico, terapéuticos y quirúrgicos para el tratamiento de personas o animales;*
- b) las plantas y los animales excepto los microorganismos, y los procedimientos esencialmente biológicos para la producción de plantas o animales, que no sean procedimientos no biológicos o microbiológicos”*

De este modo, es claramente establecido que “*excepto los microorganismos*” es una exclusión bastante clara y específica que NO está permitida y su inclusión en patentabilidad está ligada directamente con todos los estados adjuntos al ADPIC incluyendo Colombia. Por lo tanto, el artículo 15 de la Decisión 486 debe ser interpretado y leído como que en la frase “*seres vivos*” tiene que incluir en su alcance “*las plantas y los animales excepto los microorganismos*” y todo lo que sea contrario a lo definido en el Artículo 27(3)(b) definido previamente, no es aplicable a obtención del privilegio de patente.

Por lo tanto, la materia definida en la reivindicación 15 de la presente solicitud no puede considerarse como no patentable o no invención, toda vez que se refiere a un cultivo aislado que no puede ser interpretado como todo o parte de seres vivos, tal como se demostró previamente.

Además, un la expresión un cultivo “aislado” se entiende por una persona experta en la técnica como el único organismo existente en un medio definido hecho artificialmente por un ser humano a partir de ingredientes conocidos que pueden estar en un medio sólido con agentes gelificantes o en un medio líquido sin un agente gelificante en un matraz de agitación, lo que se entiende, además, como una composición que es diferente de la materia que el organismo que existe en el medio natural que se acompaña de una mezcla de elementos naturales desconocidos en el que él existe en la naturaleza (tales como el suelo o el agua o el aire) y otros microorganismos que existen también en el mismo entorno. En el presente caso, existe el organismo aislado en el suelo. Un microorganismo “aislado” no es la misma composición de materia como el mismo organismo existente en la naturaleza, ya que se encuentra en la naturaleza, ese organismo no puede ser utilizado industrialmente, mientras que un cultivo “aislado” del mismo microorganismo, puede ser utilizado para diversos fines, entre

Clarke, Modet & Cº

COLOMBIA

ellos para uso industrial. Por lo tanto, el solicitante respetuosamente se permite decir que la descripción como "aislado" es suficiente para definirlo como una composición diferente de la materia a efectos de concesión de patentes.

Sin embargo, sin perjuicio de este argumento que la descripción "aislado" es suficiente para distinguir el cultivo del microorganismo como una composición de materia separada del propio organismo, con el fin de facilitar el avance de la consecución de la solicitud, en el entendido bien establecido de una persona experta en la técnica con respecto a un "cultivo aislado", se realizó la modificación anteriormente indicada en la reivindicación 15 para que dicha cláusula se lea la siguiente manera "Un cultivo libre de suelo y aislado que comprende *Aspergillus niger* MTCC 5572 o mutantes derivados del mismo y un medio sólido o líquido".

Por lo tanto, se solicita respetuosamente que se retire esta objeción en relación con la cláusula 15.

3. Reivindicaciones relativas a un uso o un segundo uso

Sin ningún tipo de perjuicio, según la reivindicación 16 se suprime únicamente limitada a la jurisdicción de Colombia dado que el solicitante entiende que las "reivindicaciones de uso" no están permitidas en Colombia y que si se permite una reivindicación sobre el producto o sobre el proceso de una sustancia que es producida exclusivamente por la reivindicación de proceso permitida. Por la misma razón, sin perjuicio, según la reivindicación 17 también ha sido eliminada.

4. Claridad de la solicitud

Respecto a este punto, el solicitante manifiesta que mediante las modificaciones realizadas en el capítulo reivindicatorio quedan subsanadas la totalidad de las objeciones, de modo tal que las nuevas reivindicaciones proporcionan claridad y concisión a la invención descrita, siguiendo las recomendaciones realizadas por el examinador en su concepto técnico.

Ahora bien, el examinador establece en su concepto técnico que *"En la reivindicación 1, no presenta las características de una reivindicación del tipo proceso, puesto que si bien se definen las etapas, las características específicas para llevar a cabo cada etapa, son muy amplias, por ejemplo al indicar un periodo de tiempo, esto no permitiría a una persona versada en la materia entender de manera correcta la invención; los términos "alcohol", "precursor de quitosano", no son claros y no se pueden diferenciar del estado de la técnica puesto que muchos compuestos que respectivamente entran en estas categorías, de igual manera, al hacer referencia de un reactivo capaz de formar complejos puede ser una gran cantidad de posibles compuestos..."*

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

A este respecto, el solicitante manifiesta que las características para llevar a cabo o desarrollar las etapas del proceso definido en la reivindicación 1 están definidas de forma específica, como una persona medianamente versada en la materia lo reconocería, donde estas características dan las pautas o la guía específica para que dicho experto se ubique en el alcance y la extensión de esa operación/acción/paso.

A continuación nos permitimos hacer las siguientes aclaraciones en el contexto de las solicitudes específicas del señor examinador:

1. En cuanto al "período de tiempo" nos permitimos decir que dicho periodo puede variar dependiendo del alcohol utilizado, la temperatura utilizada, la velocidad de agitación, la extensión de sitios activos disponibles en una molécula de quitosano, el tamaño de partícula de la molécula de quitosano, el grado de derivatización deseada, etc, todo lo cual determinará el tiempo requerido para alcanzar el objetivo de "conseguir el quitosano activado". Por lo tanto, la frase "para conseguir el quitosano activado" da una orientación muy específica que este "período de tiempo" tiene que normalizarse hasta que se activa el quitosano bajo el conjunto de los reactivos y las condiciones de la reacción elegida por él. De hecho, incluso sin esa frase, esto es exactamente lo que una persona experta en la materia hará si se le deja por su cuenta para estandarizar esta reacción. Por lo tanto, la frase en realidad agrega una orientación explícita a lo que se espera que haga por su cuenta tal persona por una medida de sentido común.
2. En cuanto al término "alcohol", ya que todos los alcoholes pueden ser utilizados para llevar a cabo esta reacción, está justificada y también es un imperativo que todos los alcoholes sean cubiertos por la reivindicación 1 para este propósito. El señor examinador se refirió a que los documentos citados en este aspecto muestran que el término "alcohol" es muy usado por una persona experta en el arte de la preparación de derivados de quitosano y está muy bien entendido por una persona experta en esta técnica que cualquier cantidad de alcohol puede ser utilizada aquí.
3. En cuanto al término "precursor de quitosano", se eliminó en las reivindicaciones modificadas.
4. Es cierto que el término "un reactivo capaz de complejarse por fuerzas físicas o fuerzas químicas para preparar un derivado" abarca dentro de su alcance una amplia variedad de compuestos. Sin embargo, eso es lo que pretende exactamente ser cubierto debido a que la presente invención abre un amplio margen para dar derivados nuevos y útiles de quitosano, y no hay razón por la cual todo el ámbito de aplicación no esté cubierto de la

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

reivindicación porque es nuevo, así como inventiva. La patentabilidad depende de la novedad y la actividad inventiva y no está limitada por el alcance de dicha invención. Una reivindicación tiene que ser objeto de una interpretación más amplia con el fin de examinar la divulgación de la técnica anterior, y en consecuencia, si antes no se da a conocer y es inventivo, asimismo, la reivindicación tiene que ser otorgada por su alcance más amplio. Se afirma que la reivindicación 1 es nueva, así como la invención sobre la técnica anterior. Por lo tanto, se solicita respetuosamente se otorgue concesión a la reivindicación 1 en la forma actual.

De otra parte, en relación con el término "al menos" que se encontraba en las reivindicaciones 3, 6-9, 11 y 20, aunque solicitante no está de acuerdo en que el término "al menos" es impreciso, para facilitar el avance de la solicitud de concesión, el término ha sido borrado de la serie de reivindicaciones donde fuera existente y se ha agregado la expresión "o más" que es un término claro.

En cuanto a la reivindicación 8, nos permitimos decir que con la inclusión de la definición de "al menos una de dichas composiciones en agua", que se presenta en el contexto de la reivindicación 7 y el agua. Las composiciones de la reivindicación 7, en última instancia se refieren a composiciones de la reivindicación 4. Por lo tanto, cualquier composición que viene en el alcance de la reivindicación 4 es un componente y el agua es otro componente. Por consiguiente, la reivindicación 8 es clara.

Sobre este particular, nos permitimos decir que es un principio legal establecido que si una composición es novedosa e inventiva, todas las composiciones que contienen el mismo son nuevas y inventivas independientemente de la proporción/cantidad en la que está presente en tales composiciones e incluso si esa cantidad no se especifica en la composición. Muchos ejemplos se pueden proporcionar. Sin embargo, para propósito de brevedad, el solicitante desea dirigir la atención del señor examinador a sólo un par de ejemplos de las principales jurisdicciones como son la USPTO y la EPO.

Patente US5,340,594: Título: "Producto alimenticio que tiene altas concentraciones de ácidos grasos altamente insaturados de omega- 3". Esta patente tiene la siguiente afirmación:

1. Un producto alimenticio, que comprende:
 - a) lípidos extraídos de un proceso de fermentación para el cultivo de microorganismos seleccionados del grupo que consiste en microorganismos del género *Thraustochytrium*, microorganismos del género *Schizochytrium* y mezclas de los mismos, en el que dichos microorganismos son capaces de producir eficazmente lípidos que contienen las mezclas de ácidos grasos altamente

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

insaturados con omega- 3 y omega -6 en condiciones, que comprende:

- i) los niveles de salinidad menores niveles de salinidad que se encuentran en el agua de mar ;
- ii) un temperatura de al menos aproximadamente 15°C; y

b) Material alimenticio.

Otro ejemplo es la patente US5,130,242: Título: "Procedimiento para la producción heterotrófica de productos microbianos con altas concentraciones de ácidos grasos con omega-3 altamente insaturados". Esta patente expresa lo siguiente:

1. Un producto alimenticio, que comprende:

- a) los microorganismos seleccionados del grupo que consiste en microorganismos del género *Thraustochytrium*, microorganismos del género *Schizochytrium* y mezclas de los mismos, en el que dichos microorganismos son capaces de producir eficazmente ácidos grasos altamente insaturados en omega-3 en condiciones que comprenden:
 - i) niveles de salinidad inferior a los niveles de salinidad que se encuentran en el agua de mar, y
 - ii) una temperatura de al menos aproximadamente 15°C; y

b) Material alimenticio.

La Patente concedida ante la EPO correspondiente a la US 5,130,242 cuyo número es EP0512997: Título: "Procedimiento para la producción heterotrófica de productos microbianos con altas concentraciones de ácidos grasos con omega-3 altamente insaturados". Esta patente tiene la reivindicación 1 del siguiente tenor:

1. Un producto alimenticio, que comprende :

- a) microorganismos del género *Thraustochytrium* , microorganismos del género *Schizochytrium* y mezclas de los mismos, en el que dichos microorganismos son capaces de producir eficazmente ácidos grasos con omega-3 altamente insaturado, y en el que los microorganismos se cultivan en un medio de cultivo para producir eficazmente ácidos grasos con omega-3 altamente insaturado en condiciones que comprende :

- i) los niveles de salinidad rendimiento conductividades de 5 a 40 mmho/cm; y
- ii) una temperatura de 15°C a 48°C; y

b) en el que dicho microorganismo se incorpora con un material alimenticio animal o humano adicional.

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

Se llama la atención sobre el hecho de que todas las tres reivindicaciones concedidas son ejemplos de reivindicaciones de composición en la que el ingrediente activo es un producto natural "producto por procedimiento", y en ninguna de las reivindicaciones, se especifica en la reivindicación 1 la cantidad/proporción. De hecho, la cantidad/proporción no se ha especificado incluso en las reivindicaciones dependientes en todas estas tres patentes. Para el caso de las patentes US 5,130,242 y EP0512997 afirman la misma prioridad y son sustancialmente las mismas reclamaciones en las que se definen los componentes de la composición, pero las proporciones entre ellos no están definidas.

Para aclarar que la reivindicación para el presente caso se dirige al elemento de que la concentración de la sustancia activa está en la concentración efectiva, se suprimió la lista de acciones deseadas dentro de esta cláusula.

Por lo tanto, se solicita respetuosamente retirar la objeción contra la reivindicación 8.

En cuanto a las reivindicaciones 4 a 6, atentamente nos permitimos decir que las mismas son reivindicaciones de "producto por procedimiento", por lo tanto, se refieren a una fase del proceso que les caracteriza: es decir, a un producto derivado de quitosano a partir de quitosano activado por su proceso de activación definido en la reivindicación 1.

En el Manual Andino de patentes de Patentes se indica que las reivindicaciones "producto por procedimiento" son admisibles si el producto no se puede definir o distinguir de la técnica anterior, excepto por referencia al proceso mediante el cual se hace el producto, y el producto formado por los pasos del proceso recitados es novedoso e inventivo sobre el producto de la técnica.

Sobre este particular, nos permitimos decir que en la memoria descriptiva tal como fue presentada (página 12 líneas 6-25) se establece que el quitosano son moléculas polidispersas con muy diversas posibilidades de desacilación, las sustituciones, los sitios de la hidrólisis, la composición del hidrolizado, etc, sus propiedades que gobiernan sus características antimicrobianas, anti- maduración, conservantes, de solubilidad, de capacidad como molécula portadora etc, diferirán con la composición final de la quitina o quitosano tratados. También se ha explicado además que "la eficacia y el grado de cambio en la molécula de quitosano provocada por un tratamiento dado, dependerá en gran medida también en el grado en que los sitios vulnerables para un cambio químico o físico (adsorción) estén disponibles, lo cual variará con el tratamiento que se le da a la "activación " de la molécula de quitina o quitosano antes de que se inicie cualquier tratamiento para su derivación".

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

En la memoria descriptiva también se señala que las propiedades de un quitosano con respecto a las propiedades antimicrobianas, conservantes, de proceso fisiológico, etc dependen del tratamiento que se da al quitosano, la distribución de peso molecular del producto, la combinación de grupos funcionales que lleva y el grado de sustitución global. Por lo tanto, la memoria descriptiva explica que se espera que la "composición de materia de quitosano" para someterse a un cambio estructural y funcional con el "tratamiento de activación"; que también sigue/significa que si un derivado se preparó a partir de un agente de derivatización, la "composición de materia", las propiedades estructurales y funcionales del derivado, diferirán con una diferencia en el tratamiento de activación y las condiciones en que se hace un derivado, incluso si el agente de derivación puede ser el mismo. Por lo tanto, se aclara que el derivado de esta invención es una nueva "composición de materia" porque ninguno de los documentos de la técnica anterior describe la activación del quitosano mediante la suspensión de dicho quitosano en alcohol que contiene agua de 0 % a un máximo de 30 %, luego agitar con calentamiento durante un período de tiempo para obtener quitosano activado antes de hacer reaccionar dicho quitosano activado con un reactivo capaz de complejarse por fuerzas físicas o fuerzas químicas para preparar un derivado.

Así las cosas, se deduce que el "quitosano activado" es un producto nuevo (nueva composición de materia), cualquier derivado hecho a partir de él deberá ser nuevo. Dado que esta molécula no se puede definir/distinguirse sobre la base de su descripción, que es un polímero polidisperso natural, pero también es, sin embargo, una nueva composición de materia en comparación con la técnica anterior. Su definición/diferenciación/reivindicación basada en las etapas del proceso es permisible. Dado que la novedad de la composición de esta invención surge de la etapa de activación, la caracterización de la nueva composición que no puede ser caracterizado completamente por cualquier otra manera, puede caracterizarse correctamente por proceso de activación. Por lo tanto, se solicita respetuosamente se retiren las objeciones en cuanto a las reivindicaciones 4-6.

Más descripción de la mejora alcanzada por los productos de la presente invención sobre los productos de la técnica anterior a causa de la etapa de la "activación de quitosano" por pasos definidos en la reivindicación 1 se encuentra disponible en la memoria descriptiva tal como fue presentada, principalmente en las páginas 3, 13, 16, 17, 19, 20 a 27.

Aunado a lo anterior, es deseo del solicitante poner en consideración del señor examinador la declaración del experto en esta materia que se adjunta a la presente argumentación (Anexo 1) como una prueba más de lo que se describe en la memoria descriptiva anteriormente mencionada. La declaración del Experto revela observaciones del espectro IR que apuntan fundamentalmente a importantes cambios estructurales a nivel molecular que ocurren en el quitosano

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

después de la aplicación de la etapa de la activación de la suspensión del quitosano en el alcohol que contiene el agua de 0 % a un máximo del 30 %, agitando con calefacción para un período de tiempo hasta obtener quitosano activado. La evidencia que dicho cambio a nivel molecular es una mejora técnica sobre el arte previo, además de los datos que ya se han proporcionado en la memoria descriptiva, específicamente por el experimento reportado en la Declaración del experto en el que el derivado hecho a partir de quitosano que no es activado, no muestra una mejora estadística con respecto al quitosano en propiedades anti-microbial/microbiocida. Sin embargo, un derivado haciendo reaccionar el mismo agente de derivatización con quitosano "activado" mostró una mejoría estadísticamente significativa en las propiedades anti-microbianas.

Por lo tanto, la novedad así como la mejora técnica de la invención han sido claramente evidenciadas, lo cual hace que el quitosano y los productos de la reivindicación 4-6 obtenidos por reacción del "quitosano activado" con agentes de derivación indicados sean definidos por la etapa de proceso de activación como "activado" dada en la reivindicación 4.

Se ha establecido en la técnica anterior que la activación tradicionalmente se lleva a cabo con ácido. Sin embargo, fue totalmente inesperado y sorprendente que la activación por alcohol proporcionaría una mejora estadísticamente significativa. De ahí también, se solicita respetuosamente retirar la objeción en cuanto a las reivindicaciones 4 a 6.

En cuanto a las reivindicaciones 20 a 26, como se manifestó en el primer punto de este escrito, las reivindicaciones 22 y 23 se modificaron en aras de eliminar la referencia a la reivindicación 6 (reivindicación de producto). En este sentido, nos permitimos decir que, en general, el proceso de las reivindicaciones 20 a 26 no está caracterizando cualquier producto elaborado por una fase del proceso, sino que dichas reivindicaciones caracterizan más los reactivos/reactantes/catalizadores/elementos usados en las etapas del procedimiento mencionado en la misma. Por lo tanto, esa caracterización es correctamente una caracterización más de una fase del proceso y no es "UNA CARACTERIZACIÓN DE UN PASO DEL PROCESO POR SU PRODUCTO".

Los productos de las etapas de proceso son "segunda composición" hasta "décima composición" en las reivindicaciones 3 y 6. Ninguna de ellas está caracterizada además por las reivindicaciones 20 a 26. Las reivindicaciones 20 a 26 definen características, pero estas características son de los reactivos/elementos que se utilizan para llevar a cabo las etapas del proceso. Por lo tanto, ayudan a identificar mejor los detalles de los pasos del proceso mediante la descripción de lo que son las características de los reactivos/reactantes/catalizadores/elementos utilizados por los pasos del proceso para

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

llevar a cabo ciertos cambios.

Por lo tanto, haciendo un símil, es como mencionar "un ácido graso" como un reactivo en una reivindicación de procedimiento, y proporcionar otros detalles de las propiedades de los ácidos grasos tales como "que tiene una cadena de 1 a 20 átomos de carbono" en las reivindicaciones dependientes. Por lo tanto, específicamente:

1. La reivindicación 20 se refiere a la reivindicación 3 etapa c) en el que una "enzima que tiene acción tanto proteolítica como quitinolítica" se utiliza para llevar a cabo una etapa de proceso. No es un producto de ese paso del proceso. La reivindicación 20, caracteriza, además, que mediante la especificación de la enzima que comprende "una enzima que tiene al menos una de las siguientes propiedades: un peso molecular de 50 kilo Daltons (kD) en la electroforesis de SDS-PAGE, una actividad quitinolítica óptima a pH 2 y un actividad quitinolítica óptima a la temperatura de 800°C". Por lo tanto, esa caracterización es correctamente una caracterización adicional de una fase del proceso y no es "una caracterización de un paso de proceso por su producto".
2. La reivindicación 21 se refiere a una enzima quitinolítica utilizada en un proceso definido en la reivindicación 14 para un determinado paso del proceso. La enzima quitinolítica **no es un producto de esa etapa** del proceso. La reivindicación 21 da una limitación adicional de esta enzima quitinolítica especificando que se encuentra aislada de *Aspergillus niger* MTCC 5572 o mutantes derivados de la misma. Por lo tanto, esa caracterización es correctamente una caracterización adicional de una fase del proceso y no es "una caracterización de un paso del proceso por su producto".
3. La reivindicación 22 se refiere a una enzima desacetiladora utilizada en un proceso definido en la reivindicación 3 paso c). La enzima desacetiladora **no es un producto de esa etapa del proceso**. La reivindicación 22 da una limitación adicional de la enzima desacetiladora, especificando que se encuentra aislada de *Bacillus* sp MTCC 5571 o mutantes derivados de la misma. Por lo tanto, esa caracterización es correctamente una caracterización adicional de una fase del proceso y no es "una caracterización de un paso del proceso por su producto".
4. La reivindicación 23 se refiere a una enzima desacetiladora utilizada en un proceso definido en la reivindicación 3 paso c). La enzima desacetiladora **no es un producto de esa etapa del proceso**. La reivindicación 23 da una limitación adicional al especificar que la enzima

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

desacetiladora es una xilan acil transferasa preparada a partir de *Bacillus* sp MTCC 5571 o mutantes derivados de la misma o cualquier otra bacteria o cualquier otro microorganismo capaz de producir la enzima que tiene actividad de desacetilación. Por lo tanto, esa caracterización es correcta una caracterización adicional de una fase del proceso y no es "una caracterización de un paso de proceso por su producto".

5. La Reivindicación 24 se refiere a la enzima quitinolítica utilizada un paso de proceso definido en la reivindicación 3 paso c). La enzima desacetiladora **no es un producto de esa etapa del proceso**. La reivindicación 24 da una limitación adicional especificando que la enzima quitinolítica tiene tanto una actividad proteolítica como una actividad quitinolítica, es. decir, es una proteo-quitinasa, es termoestable y se utiliza para la fabricación de un derivado hidrolizado. Por lo tanto, esa caracterización es correctamente una caracterización adicional de una fase del proceso y no es "una caracterización de un paso del proceso por su producto".
6. La reivindicación 25 se refiere a la proteo-quitinasa utilizada en un paso del proceso definido en la reivindicación 24. La proteo-quitinasa **no es un producto de esa etapa del proceso**. La reivindicación 25 da una limitación adicional de dicha proteo-quitinasa que se prepara a partir de *Aspergillus niger* MTCC 5572 o mutantes derivados de la misma o cualquier otro hongo o cualquier otro microorganismo capaz de producir una actividad proteo-quitinolítica. Por lo tanto, esa caracterización es correctamente una caracterización adicional de una fase del proceso y no es "una caracterización de un paso del proceso por su producto".
7. La reivindicación 26 se refiere a la "enzima quitinolítica" de la reivindicación 25 que se "prepara a partir de *Aspergillus niger* MTCC 5572 o mutantes derivados de la misma o cualquier otra hongos o cualquier otro microorganismo capaz de producir una actividad proteo-quitinolítica". La enzima quitinolítica de la reivindicación 25 no es un producto de la etapa del proceso 25. La reivindicación 26 da una nueva limitación de la enzima quitinolítica de la reivindicación 25 al afirmar que "tiene un peso molecular en SDS_PAGE de unos 50 kilo Daltons, la actividad quitinolítica óptima a pH 2 y al 800°C", Por lo tanto, esa caracterización es correcta una mayor caracterización de un paso de proceso y no es "una caracterización de un paso del proceso por su producto".

Así las cosas, para concluir, nos permitimos decir que el proceso de las reivindicaciones 20 a 26 **no caracteriza cualquier producto producido por**

Clarke, Modet & Cº

COLOMBIA

una etapa de proceso. Por lo tanto, de manera respetuosa solicitamos sean retiradas las objeciones relacionadas con las reivindicaciones 20 a 26.

De otra parte, en relación con las reivindicaciones 10 a 12, nos permitimos decir que, en general, ninguna de estas reivindicaciones contiene una definición de la enzima por la manera de obtención de la misma. Estas reivindicaciones definen la enzima en términos de sus propiedades y la forma de la fuente de la cual se obtiene la misma. Específicamente:

1. La reivindicación 10 se refiere al peso molecular de una enzima quitinolítica que tiene actividad tanto proteolítica como quitinolítica que tiene un peso molecular de 50 kilodaltons en electroforesis de SDS-PAGE. Así, la reivindicación 10 define la propiedad del peso molecular de la enzima y no define la forma en que se obtiene.
2. La reivindicación 11 se refiere a sus propiedades relacionadas con la función catalítica de la enzima definida en la reivindicación 10. Esta reivindicación define que la enzima de la reivindicación 10 deberá tener por lo menos una de las siguientes propiedades: (a) una actividad quitinolítica óptima a pH 2, y (b) una actividad quitinolítica óptima a una temperatura de 800°C. Así, la reivindicación 10 define propiedades cinéticas de la acción de esta enzima y no define la forma en que se obtiene.
3. La reivindicación 12 se refiere a la fuente del micro-organismo del que se obtiene. Se sabe que la enzima que tiene las mismas acciones que proviene de diferentes fuentes pueden diferir en su actividad. Por lo tanto, para reproducir el efecto de la enzima reivindicada en la presente invención, la fuente de la enzima también deber ser la misma. La reivindicación 12 define una limitación adicional de que la enzima proteo-quitinolítica de la reivindicación 10 es la que se prepara a partir de *Aspergillus niger* MTCC 5572 o mutantes derivados de la misma. Así, la reivindicación 12 define el microorganismo a partir del cual, la enzima se ha preparado y no define la forma en que se obtiene.

Por lo tanto, se solicita respetuosamente el retiro de las objeciones relativas a la reivindicación 10, 11 y 12.

5. Novedad

El examinador establece en su concepto técnico que las reivindicaciones 1 a 9 y 16 a 26 de la presente solicitud carecen de novedad a la luz de los documentos JPH 08157501 (D1) y US 2007077305 (D2).

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

En este sentido, me permito decir que el artículo 16 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina establece que la invención se considera nueva cuando no está comprendida en el estado de la técnica. Si de acuerdo con el espíritu de la norma legal indicada, la invención no se considera como nueva si está “comprendida” en el estado de la técnica, dicha norma se está refiriendo, naturalmente, a la totalidad del invento y no a alguno o a algunos de los componentes. Para que la invención pierda su calidad de novedosa, es claro que ella, TODA ELLA, ha de estar contenida en el “conjunto de conocimientos existentes que son aplicables al proceso industrial” como define el estado de la técnica el Tribunal de justicia del Acuerdo de Cartagena (Proceso No. 6-IP-89, sentencia de 31 de octubre de 1989, publicada en Jurisprudencia del Tribunal de Justicia del Acuerdo de Cartagena, Tomo 11, BID-INTAL, Buenos Aires, 1994, página 60).

Esto se conoce como NOVEDAD ABSOLUTA, de conformidad con lo cual para desvirtuar el requisito de novedad de una invención será necesario que lo reivindicado por la invención bajo estudio corresponda de forma total con lo revelado en un documento o anterioridad señalada, conclusión a la que se llega después de un análisis exhaustivo mediante una comparación entre el capítulo reivindicatorio de la invención en estudio y la divulgación de las referencias D1 y D2.

Ahora bien, si un determinado elemento, condición o circunstancia de la nueva creación ya hace parte del estado de la técnica no quiere ello decir, desde luego, que la invención deba ser rechazada por carecer del requisito de novedad. No sin razón ha dicho el mencionado Tribunal: “*hay que advertir que toda creación es en cierta forma, producto del estado de la técnica existente, en el sentido de que el inventor ha de tener en cuenta un conjunto de conocimientos técnicos que le permitan crear nuevos procedimientos aplicables a la industria*” (Ibídem, páginas 53 y 54) (el subrayado es nuestro).

Por lo tanto, como mínimo la novedad debe contemplar los siguientes aspectos:

- Que la invención en estudio esté contenida de forma TOTAL y ABSOLUTA en el documento que se menciona como anterioridad o de forma independiente en los documentos que se mencionan, si son varios.

- Que la invención en estudio puede partir de conocimientos conocidos, caso en el cual habrá que hacer la comparación no de lo conocido sino de lo inédito y novedoso, teniendo que analizarse el valor agregado que aporta la invención con sus nuevas características al campo técnico al cual pertenece la invención en estudio.

Aplicando lo anterior al caso concreto, para que las razones que aduce ese despacho para desvirtuar la novedad fuesen ciertas, sería forzoso que se

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

demostrara que la invención de mi mandante esté comprendida en el estado de la técnica de forma TOTAL, lo cual no sucede con la materia reclamada en las nuevas reivindicaciones.

En este sentido, es deseo del solicitante manifestar que, tal como se explicó anteriormente, un derivado obtenido al reaccionar un agente derivador (a) sin activar quitosano, y (b) después de activar quitosano (al suspender dicho quitosano en alcohol que contiene agua de 0% a máximo aproximadamente 30%, agitando con calor por un periodo de tiempo para hacer que el quitosano o precursor de quitosano se active y luego hacer reaccionar dicho quitosano activado o precursor activado con un reactivo capaz de hacer complejos mediante fuerzas físicas o fuerzas química para preparar un derivado) son dos composiciones de materia diferentes en el nivel molecular así como en eficacia para el propósito para el cual se pretenden utilizar.

Así las cosas, a menos que el paso descrito anteriormente de activación sea utilizado en un documento del arte previo ANTES de hacer reaccionar son el agente derivador, los derivados de quitosano divulgados por esos documentos del arte previo no serían los mismos de la presente invención.

De este modo, el solicitante considera conveniente indicar que en ninguno de los documentos citados anteriormente, tanto D1 como D2, se divulga el paso de activación. Por lo tanto, los documentos D1 y D2 no divulgan la presente invención como se define en las reivindicaciones 1 a 9 y 16 a 25 de forma completa y como se encuentra definido en la Guía para Examinadores.

Ahora bien, el solicitante desea manifestar que las características o elementos esenciales y más críticos de las reivindicaciones de la presente invención, están comprendidas en dos elementos: (a) *“al activar quitosano, CARACTERIZADO porque comprende: suspender dicho quitosano en alcohol que contiene agua en una cantidad que abarca del 0% a un máximo de aproximadamente el 30%, agitar bajo calentamiento durante un período de tiempo para que el quitosano o precursor de quitosano se active”* y (b) *“posteriormente hacer reaccionar dicho quitosano activado o precursor activado con un reactivo capaz de formar complejos mediante fuerzas físicas o fuerzas químicas para preparar un derivado”*, donde estos dos pasos son dos eventos diferentes que se requieren llevar a cabo en dos puntos diferentes en tiempo y en el orden sucesivo indicado en la reivindicación y no se prevén para ser llevados a cabo simultáneamente o en un orden diferente. Así, la activación de quitosano por alcohol acompañada por calor es una reacción la cual puede ocurrir únicamente en ausencia de cualquier agente derivador. Cualquier agente derivador con afinidad más fuerte por los sitios reactivos de quitosano, inmediatamente hará reacción con y saturará TODOS los sitios reactivos del quitosano que están disponibles en el tiempo de punto de traer el quitosano en contacto con el agente derivados aunque el quitosano pueda estar en contacto con alcohol en el punto en el tiempo, y NO

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

dará ninguna oportunidad para que el alcohol haga activación de ningún sitio del quitosano. Por lo tanto, si una activación no ha sido divulgada en un documento del arte previo para hacer reacción con el agente derivador, el agente derivador divulgado en dicho documento TIENE que ser diferente del derivado de la presente invención, tanto en estructura a nivel molecular, como en el grado de sustitución y eficacia.

Así, tanto el documento D1 como D2 ambos muestran que los elementos esenciales definidos anteriormente, están ausentes. La presencia simultánea o concurrente de los elementos esenciales apunta a la ausencia de activación del quitosano. Por lo tanto, la reivindicación 1 de la presente solicitud es nueva, y también es inventiva porque ha resultado en productos o derivados con eficacia mejorada. Fue completamente sorprendente y algo inesperado que la activación por alcohol antes de la derivación haya resultado en una mejora técnica espectacular, con lo cual se puede indicar que las reivindicaciones de la presente solicitud también son inventivas.

Ahora, dado que las reivindicaciones 2 a 9 y 16 a 26 dependen de la reivindicación principal compartiendo el principio de las características técnicas especiales discutidas anteriormente, dichas cláusulas también son novedosas e inventivas con relación al estado del arte.

En resumen, nos permitimos decir que:

- (a) la presente invención da a conocer derivados de quitosano "activados" mientras que D1 y D2 revelan "derivados de quitosano". Es más, en D1 y D2 no existe una "activación" específica de quitosano ANTES de que el mismo se haga reaccionar con un agente de derivación para hacer N-carboxiacilquitosano en D1 y para hacer una matriz polimérica biocompatible que está funcionalizada a través de la reacción con un agente de funcionalización, incluyendo un ácido carboxílico con grupos protonados como se indica en D2.
- (b) El "quitosano activado" al ser estructuralmente diferente a nivel molecular del quitosano sin activar como se muestra en sus espectros IR en la declaración del experto, demuestra que son diferentes composiciones de materia, su distribución de sitios reactivos es diferente, en consecuencia, su ubicación de la derivación y la distribución de los grupos derivatizados sobre la molécula de quitosano, son diferentes. Esto hace que, invariablemente, los derivados de quitosano de la invención sean diferentes composiciones de materia que los derivados de quitosano de D1 y D2, incluso cuando los agentes de derivación puedan ser los mismos, y por consiguiente, las propiedades también difieren.
- (c) Las diferencias en las propiedades de los derivados de quitosano no activado y activado se describen en detalles en la memoria descriptiva de

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

- la solicitud principalmente entre las páginas 3, 13, 16, 17, 19, 20 a 27. Los productos descritos en las páginas anteriores, que incluye la composición no. 2 y 4-10 de las reivindicaciones 3 y 6, no se han descrito hasta ahora en D1, así como de D2.
- (d) La declaración del experto (Anexo 1), además, da a conocer los resultados de los experimentos en el que se ha mostrado claramente no sólo que hay un cambio estructural debido a la activación en los espectros de IR sino que además muestra que el láctico y los derivados succínicos obtenidos a partir del quitosano activado (precalentado) tienen estadísticamente mayor eficacia antimicrobiana que el quitosano no tratado, mientras que los derivados de láctico y succínico preparados a partir de quitosano no activado **NO** muestran una mejora significativa estadísticamente en la actividad antimicrobiana sobre el quitosano sin tratar.
 - (e) Por lo tanto, por la "activación" previa a la derivación, se proporciona una nueva composición dado que el "quitosano activado" tiene una estructura diferente a nivel molecular que el quitosano no activado, y la mejora técnica también se proporciona sobre los derivados del quitosano no-activado del arte previo como una mejora estadísticamente eficaz en términos de acción antimicrobiana proporcionada por los "derivados de quitosano activados", cuya mejora se encuentra correlacionada con los cambios estructurales a nivel molecular.
 - (f) Por lo tanto, la novedad y la actividad inventiva como se proporciona por la combinación de las dos etapas (a) "activación" de quitosano mediante la suspensión de dicho quitosano en alcohol que contiene agua de 0 % a un máximo de 30 %, con agitación, calentamiento durante un período de tiempo para obtener quitosano activado" y (b) "haciendo reaccionar después dicho quitosano activado con un reactivo capaz de complejarse por fuerzas físicas o fuerzas químicas para preparar un derivado ".

En este orden de ideas, atentamente se dirige la atención del señor examinador sobre el hecho que ninguno de D1 y D2 han revelado el paso de "activación" antes de reaccionar con agentes de derivación y ninguno de ellos incluso han contemplado que una "activación" de este tipo sea probable y que mejore el rendimiento del derivado cuyo propósito para el cual se han realizado los derivados.

Siendo D1 y D2 los documentos más cercanos de la técnica anterior, también por personas que no son sólo personas expertas en la técnica, sino por personas de la invención en este campo de la técnica, es evidente que un experto en el campo técnico correspondiente que leyera estas dos anterioridades, no estarían motivados o incluso lograrán pensar que existiera alguna significancia del paso de "Activación" antes de la derivatización, dado que no hay un margen de obviedad, una persona experta en la técnica, probablemente no haría algo adicional que no es enseñado en la técnica anterior más cercana. Por lo tanto, en ausencia de

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

una divulgación de los elementos esenciales de la presente invención y los productos de la misma, D1 y D2, de hecho, proporcionan base para la novedad, así como para el nivel inventivo de la presente invención.

Teniendo en cuenta el análisis detallado de las reivindicaciones en este contexto, se tiene que la **reivindicación 1** de la presente invención especifica: "Un procedimiento para producir un derivado de quitosano mediante la activación de quitosano, mediante la suspensión de dicho quitosano en alcohol que contiene agua de 0 % a un máximo de alrededor de 30 %, agitando con calentamiento durante un período de tiempo para quitosano activado y **posteriormente** hacer reaccionar el dicho quitosano activado con un reactivo capaz de complejarse por fuerzas físicas o fuerzas químicas para preparar un derivado.

Y la reivindicación 4 especifica:

Reivindicación 4: Un derivado de quitosano producido mediante la activación de quitosano, mediante la suspensión de dicho quitosano en alcohol que contiene agua de 0 % a un máximo de alrededor de 30 %, agitando con calentamiento durante un período de tiempo para quitosano y haciendo reaccionar después dicho quitosano activado con un reactivo capaz de complejarse por fuerzas físicas o fuerzas químicas para preparar un derivado.

Todas las demás reclamaciones dependen directa o indirectamente de la reivindicación 1 y 4.

Como se puede apreciar, las reivindicaciones 1 y 4 comparten las siguientes características técnicas especiales: "mediante la activación de quitosano, mediante la suspensión de dicho quitosano en alcohol que contiene agua de 0 % a máximo de aproximadamente 30 %, agitando con calentamiento durante un período de tiempo para quitosano y a partir de entonces reaccionar dicho quitosano activado con un reactivo capaz de complejarse por fuerzas físicas o fuerzas químicas para preparar un derivado".

Los elementos esenciales de los derivados de quitosano de la presente invención son: derivados de quitosano que son producidos

- (a) "mediante la activación de quitosano",
- (b) la activación de quitosano que se hace "mediante la suspensión de dicho quitosano en alcohol que contiene agua de 0 % a un máximo de 30 %, de calentando por un período de tiempo para obtener quitosano activado",
- (c) "y haciendo reaccionar **posteriormente** dicho quitosano **activado** con reactivos capaces de formar complejos ,
- (d) "por fuerzas físicas o fuerzas químicas,
- (e) preparar un derivado.

Clarke, Modet & Cº

COLOMBIA

Estos pasos proporcionan condiciones muy claras y completas del proceso de activación y subsiguiente proceso de fabricación de un derivado de quitosano y son adecuados para establecer una diferencia del proceso de la reivindicación 1 con el estado de la técnica como se indica en los documentos más cercanos de la técnica anterior D1 y D2. Esto ha sido elucidado en detalle a continuación:

Los pasos que alcanzan (i) **la activación de quitosano** y (ii) hacer reaccionar dicho **quitosano activado** son dos pasos secuenciales que son novedosos e involucran una actividad inventiva.

La secuencia de estos dos pasos es importante y no se puede considerar que puedan ser sustituidos por la exposición simultánea del quitosano al alcohol y el reactivo de derivación como se hace en D1 y D2 debido a la derivatización de los reactivos, por regla general de la química, tener una reactividad más fuerte que la del alcohol hacia el quitosano y la "activación" del quitosano que conduce a cambios estructurales y el "tapar" algunos grupos reactivos selectivamente como se refleja en el espectro IR proporcionados por el informe del experto, no ocurriría si los agentes de derivatización están presentes al mismo tiempo en la suspensión del quitosano en alcohol ya que los reactivos de derivatización reaccionarían inmediatamente con **TODOS** los sitios reactivos disponibles del quitosano antes que el alcohol tenga la oportunidad de limitar ciertos sitios e inducir los cambios estructurales observados. Por lo tanto, en presencia de agentes de derivación más fuertes, el alcohol no activará el quitosano que se puede hacer en ausencia de agentes de derivación más fuertes.

Evidencia de los cambios estructurales mencionados anteriormente que dan una composición de "quitosano activado" que es diferente como una composición de materia nueva del quitosano no activado, lo cual se ha demostrado en la Declaración del Experto como se ve en los espectros de IR de quitosano sin tratar y "quitosano activado" (Anexo 1). Estos hallazgos establecen el hecho de que el tratamiento previo de quitosano de calentamiento con metanol acuoso induce cambios estructurales específicos e identificables en el quitosano.

La evidencia de que la "activación" conduce a la novedosa mejora técnica sobre derivados de la técnica anterior, se proporciona por la observación de que los productos derivados del mismo agente de derivatización (a) con quitosano **no** activado **no** tiene ninguna mejora estadísticamente significativa sobre el quitosano en la actividad anti-microbial/microbiocidal, pero (b) con "quitosano activado" tiene una mejora estadísticamente significativa del efecto antimicrobiano/microbicida en comparación con la actividad antimicrobiana de quitosano. Esto es ha sido demostrado en la declaración del experto con dos agentes de derivación - ácido láctico y ácido succínico. Esta es una evidencia concluyente de que las etapas de (a) la activación de quitosano por calentamiento

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

en alcohol es un paso esencial para el logro de la activación, y (b) para obtener los derivados de la mejora de la eficacia antimicrobiana, reaccionando con el agente de derivación que tiene lugar **DESPUÉS** de la activación, y (3) ambos pasos no pueden proceder simultáneamente a la vez en el mismo recipiente de reacción. Este es un asunto respaldado por la evidencia experimental, así como la declaración del experto y puede no tenerse en cuenta sólo si ninguna citación de la técnica da información en perjuicio de estos resultados y afirmaciones.

Se afirma entonces que ninguna de estas características, elementos esenciales en particular (b) y (c) se mencionaron anteriormente o se dieron a conocer en D1 y D2.

Como se explicó anteriormente, un derivado obtenido por reacción de un agente de derivatización (a) sin la activación de quitosano, y (b) después de la activación de quitosano (mediante la suspensión de dicho quitosano en alcohol que contiene agua de 0 % a un máximo de aproximadamente 30 %, agitación con calentamiento por un período de tiempo para quitosano o quitosano precursor y después reaccionando dicho quitosano activado o precursor activado con un reactivo capaz de formar complejos por fuerzas físicas o fuerzas químicas para preparar un derivado) son dos composiciones diferentes de materia a nivel molecular, así como, en la eficacia para la finalidad para la cual están destinados a ser utilizados.

Por lo tanto, a menos que el paso de activación, anteriormente citado, sea utilizado en un documento de la técnica anterior **ANTES** de reaccionar con el agente de derivatización, los derivados de quitosano descritos por los documentos de la técnica anterior no son los mismos que los derivados de la presente invención.

En ninguno de los documentos citados anteriormente, D1, así como D2, se encuentra enseñada o sugerida la etapa de activación descrita en la presente invención. Por lo tanto, D1, así como D2 **no** describen el derivado de la presente invención en las reivindicaciones 1-9, y 16 a 25. Por lo tanto, se solicita respetuosamente se retiren todas las objeciones de claridad, novedad en cuanto a estas reivindicaciones.

Finalmente, dado que las reivindicaciones 2 a 9 y 16 a 26 dependen principalmente de la reivindicación 1 que comparten el elemento técnico particular anteriormente discutido, es claro que las mismas también son nuevas e inventivas.

Habiendo atendido cabalmente las objeciones presentadas por ese despacho, atentamente solicitamos se conceda el privilegio de patente de invención a la solicitud en estudio o si el examinador considera que subsisten razones para objetar la presente invención ruego expedir otro examen de fondo con los

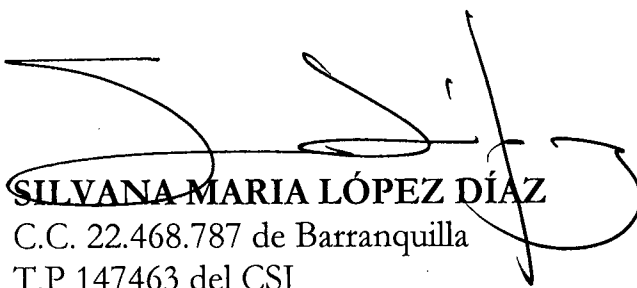
Clarke, Modet & Cº

COLOMBIA

debidos motivos y razones que sustenten su objeción con el fin de que mi mandante tenga la posibilidad de exponer sus argumentos con base en la interpretación de los artículos 45 de la Decisión 486 -el cual otorga la facultad al examinador para emitir los exámenes de fondo-, 35 y 59 del Código Contencioso Administrativo que señala que: *“habiéndose dado oportunidad a los interesados para expresar sus opiniones, y con base en las pruebas e informes disponibles, se tomará la decisión que será motivada al menos en forma sumaria si afecta a particulares”* y *“(.) deberá proferirse la decisión definitiva. Esta se motivará en sus aspectos de hecho y de derecho, y en los de conveniencia si es el caso”*, respectivamente (El subrayado es nuestro).

En consecuencia, solicitamos a ese despacho pronunciarse en relación con todos los argumentos presentados en este memorial dando estricta aplicación al principio del debido proceso consagrado en el artículo 29 de la Constitución Nacional

Señor Superintendente,



SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ
C.C. 22.468.787 de Barranquilla
T.P 147463 del CSJ
notificaciones@clarkemodet.com.co

Clarke, Modet & Cº

COLOMBIA

ANEXO 1

Declaración del Experto acerca del efecto del pre-calentamiento de quitosano con metanol para mejorar la eficacia antimicrobial de los productos reclamados en la presente invención

Expert's Declaration/Opinion about the effect of pre-heating of chitosan with methanol for improving antimicrobial efficacy of the products of claimed in

IN THE MATTER OF Colombian National Phase patent application N° 12-021.203

entitled "preservatives from chitin derivatives."

in the name of Camlin Fine Sciences Limited

1. I, Abhay Parashuram Shendye, am M.Sc. and Ph.D. and Chitosan derived products is my specialized area of research. I am the sole inventor in the above mentioned patent application and know the basics of the science involved in the subject matter of the invention. As such I am entitled to provide Expert's Opinion on whether the pre-treatment of chitosan as claimed in Claim 1 of the Application, more particularly, whether "activating chitosan, by suspending the said chitosan in alcohol that contains water from 0% to maximum of about 30%, stirring with heating for a period of time to get activated chitosan" results into improving anti-microbial activity of products of this invention made from the pre-treated chitosan.
2. Structural changes induced by the pre-treatment in chitosan molecule:

The IR spectroscopic analysis of chitosan compared with that preheated in 90% methanol (60 degree C) for one hour was done using the dry powder of chitosan in KBr pellet. The spectra of these analyses are enclosed herewith. The results of this comparative analysis are tabulated below:

- (a) The IR spectrum of chitosan (untreated) shows following peaks that correspond to specific functional groups present in the chitosan molecule and their correlation with the functional groups is done as per the published paper J. BiomaterSci Polymer Edn. 12: 1575-1593 (2005) and is as follows:

APS

S No.	-1/cm (X axis (co-ordinate))	Functional group
1	1660.97	Due to stretching vibrations of -C=O of amide groups
2	1317.43; 1373.36	Due to stretching vibrations of -C-O of ether group
3	2877.89	Due to stretching vibrations of -C-H of aldehyde group
4	1595.18	Due to N-H stretching coupled with C-N stretching
5	1313.43	Due to stretching vibrations of C-N bond

(b) The IR spectrum of the chitosan pre-treated (refluxed) with 90% methanol for 1 hour shows changes in the said peaks as follows:

S. No.	-1/cm (X axis (co-ordinate))	Changes in the peak position
1	1660.97	Split in to 2 peaks at 1639 and 1672
2	1317.43; 1373.36	Shifted to 1377.22
3	2877.89	No change
4	1595.18	Shifted to 1556.61
5	1313.43	Shifted to 1311.84

The conclusions drawn from these spectra and their relation to functional groups carried by chitosan molecule are as follows:

- (i) Changes in the position of the peak 1, suggest that the active amide group is modified and/or the stretching vibrations of the C=O group are restricted/ diminished. This is very important structural change for the interactions of the chitosan reactant (specifically in insoluble form) to the other reagents.
- (ii) Small shifting of the peak 2 may arise from the structural changes as implicated in the peak 1.
- (iii) Shifting of peak 4 to lower field indicates that this active group might have been capped.

Above finding establishes the fact that pre-treatment of heating chitosan with aqueous methanol does induce specific and identifiable/measurable structural

not

24

changes in chitosan. These changes, as later data will show are correlated with increase in anti-microbial activity in treated chitosan and derivatives made from treated chitosan as compared to untreated chitosan.

3. Proposed correlation of the changes induced in functional groups of chitosan molecule on efficacy of anti-microbial activity of the derivative products made from pre-treated chitosan:

Without getting bound to any theory, it is our opinion that blocking/capping/inactivating the amine/ amide group is very important from the view point of our processes as we targeted to achieve partial substitution of the amine group in any of the modifications that are claimed in the process of our invention. This partial modification adds asymmetric charges, which correlates with increase in the anti-microbial activity of the product. This addition of asymmetric charges is not possible without the pre-treatment of chitosan by heating with aqueous methanol.

Comparison of anti-microbial property of derivative products made from untreated chitosan and pre-treated chitosan:

Below are some compositions that are covered within the scope of claim 1 which are compared for their antimicrobial activity with same compositions made from untreated chitosan. It is well considered opinion of this expert that the below range of products is enough to give evidence of correlating the structural change induced by the pre-treatment as defined in Claim 1 of the "as filed" Application (i.e. "activating chitosan, by suspending the said chitosan in alcohol that contains water from 0% to maximum of about 30%, stirring with heating for a period of time to get activated chitosan and thereafter reacting the said activated chitosan...". A person skilled in the art would readily understand that same result will be obtained on other compositions also which come within the scope of Claim 1 of the "as filed" Application since there is a specific structural change in chitosan brought out by the pre-treatment. Verifying the results with compositions not illustrated below and coming within the scope of claim 1 of the "as filed" Application is also within the scope of routine experimentation for a person skilled in the art.

The derivatives of chitosan were made as per the methods claimed in the "as filed" patent application, and this was done using chitosan (not pre-treated) and pre-treated chitosan (as described in the "as filed" patent application). The anti-microbial activity of both these derivatives was compared using *E. coli* as test organism. The results of the said testing are represented in the examples given below.

APS

Example 1:

chitosan [70 DDA (Degree of Deacylation), 100 mesh] 5 gm is taken in a round bottom flask and 20 ml distilled water and 80 ml methanol (99%) is added to it. The suspension is mixed well by stirring at 100 rpm and heated at 60°C for 60 min. Lactic acid (1 ml) is added to this mixture and stirring is continued for 2 hours. The temperature is maintained below 30°C and preferably at 25°C. The suspension is filtered and the solid is air dried. The free flowing powder and lumps (if any) are separated by sieving. The free flowing powder (a composition within the scope of claim 1 of the "as filed" patent application) is then further dried in hot air oven [70°C for 3 – 6 hours].

This reaction is carried out without pre-heating in alcohol as follows:

chitosan [70 DDA (Degree of Deacylation), 100 mesh] 5 gm is taken in a round bottom flask and 20 ml distilled water and 80 ml methanol (99%) is added to it. The suspension is mixed well by stirring at 100 rpm at room temperature (around 25°C) for 60 min. Lactic acid (1 ml) is added to this mixture and stirring is continued for 2 hours. The temperature is maintained below 30°C and preferably at 25°C. The suspension is filtered and the solid is air dried. The free flowing powder and lumps (if any) are separated by sieving. The free flowing powder (Control product without pre-heating) is then further dried in hot air oven [70°C for 3 – 6 hours].

Example 2:

Chitosan [70 DDA, 60 mesh] 5 gm is taken in a round bottom flask and 20 ml distilled water and 80 ml methanol (99%) is added to it. The suspension is mixed well by stirring at 100 rpm and heated at 60°C for 60 min. Succinic anhydride (0.5 gm) is added to this mixture and stirring is continued for 1 hour. The temperature is maintained between 60 – 70°C and preferably at 60 – 62°C for about 1 hr. The suspension is allowed to cool and filtered and the solid is air dried. The free flowing powder (Second composition of claim 3 or 6 of the "as filed" patent application) is formed by breaking the loose lumps mechanically and sieved using 100 mesh.

This reaction is carried out without pre-heating in alcohol as follows:

Chitosan [70 DDA, 60 mesh] 5 gm is taken in a round bottom flask and 20 ml distilled water and 80 ml methanol (99%) is added to it. The suspension is mixed well by stirring at 100 rpm at about 25°C for 60 min. Succinic anhydride (0.5 gm) is added to this mixture and stirring is continued for 1 hour. The temperature is maintained between 60 – 70°C and preferably at 60 – 62°C for about 1 hr. The suspension is

DS

26

allowed to cool and filtered and the solid is air dried. The free flowing powder(Control product without pre-heating) is formed by breaking the loose lumps mechanically and sieved using 100 mesh.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CHITOSAN COMPOSITIONS

Chitosan, untreated, was dissolved in 2% acetic acid and 300 mg of above described products made from untreated or treated chitosan were dissolved in water to make 10 ml solution. E.coli NCIM 2065culture was grown overnight (10⁸cells/ml density) diluted 100 folds with sterile liquid broth and used for antimicrobial assay. The assay was set by mixing diluted cultures with stock solution of chitosan or derivative product compositions as follows:

Culture vol. In ml	7	8.5	9.7	9.9
Chitosan/ product vol. in ml	3	1.5	0.3	0.1
Effective Concentration of the product in the test solution of 10 ml. (%)	1	0.5	0.1	0.033

The mixture was incubated at 25°C for 30 min. The total viable count of the mixture was determined. The total viable count when compared with the initial count of the culture gives us the microbiocidal effectiveness of the product. The data for E coli is given in Table 1.

Table 1: Total Viable Count of *Escherichiacollin* the treated mixtures 30 minutes after treatment with the anti-microbial derivative compositions made from untreated and pre-treated chitosan.

Initial count of E. coli in the treated mixture was 4.6 X 10⁷

Parameter	Colony count X10 ⁴			
Product/ concentration	1%	0.50%	0.10%	0.03%
Chitosan	2200	3400	4000	4500
Example 1 (pre-heated)	61	100	2000	2000
Example 1 (Non-pre-heated)	800	2000	2200	2300
Example 2 (pre-heated)	93	208	900	3000
Example 2 (Non-pre-heated)	3200	900	1400	7100

APs

Analysis of Variance Table					
Source of variation	Degrees of Freedom	Total Sum of squares	Mean Sum of Squares	F value	Statistical Significance
Example	4	21728628	5432157.075	3.906	*
Concentration	3	20572844	6,857,614.60	4.931	*
Effor	12	16687210	1390600.808		
Total	19	58988682			

Significant at P = 0.01: **

Significant at P = 0.05: *

NS: Not significant

Conclusion: Total variance in the mean colony count due to various products is significant. Total variance in the mean colony count due to various concentrations is also significant.

For comparison between the products, following is the analysis.

S E.	Example	834
	Concentration	746

CRITICAL DIFFERENCE	p = 0.05	Example	1818
		Concentration	1626
CRITICAL DIFFERENCE	p = 0.01	Example	2552
		Concentration	2282

Products	Mean	Significance of difference between means	
		Between Chitosan and the product	Between Pre-heated and non-preheated
Chitosan	3525		
Example 1 (pre-heated)	1040	*	
Example 1 (Non-pre-heated)	1825	NS	NS
Example 2 (pre-heated)	1050	*	
Example 2 (Non-pre-heated)	3150	NS	*
Critical Difference	p=0.05	1818	
	p=0.01	2552	

Significant at P = 0.01: ** (the difference between colony count of two products exceeds the Critical Difference 1818)

Significant at P = 0.05: * (the difference between colony count of two products exceeds the Critical Difference 2552)

NS: Not significant

APS

Conclusion: Difference between mean colony count of all Examples with (pre-heated) was statistically significantly lower than the colony count in case of chitosan treatment. The colony count in both Examples of non-preheated did not show statistically significant difference than the colony count with treatment of chitosan. Thus, the derivatization of chitosan without pre-heating does not give improvement in microbiocidal efficacy; whereas pre-heating gives improvement in microbiocidal efficacy.

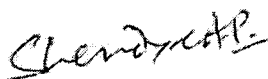
Discussion:

The better anti-microbial activity of the products made from pre-treated chitosan is the most critical evidence that the pre-treatment brings in practical improvement in anti-microbial efficacy of the derivative products made from pre-treated chitosan.

Thus, the structural change induced by pre-heating also reflects in the significant improvement in performance of the derivatives of chitosan derived from the pre-heated chitosan.

4. All statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are offences.

WITNESS my signature below on the indicated date.



Date March 18, 2014

Abhay Parashuram Shendye

ATE:11/22/2011

KBr disc

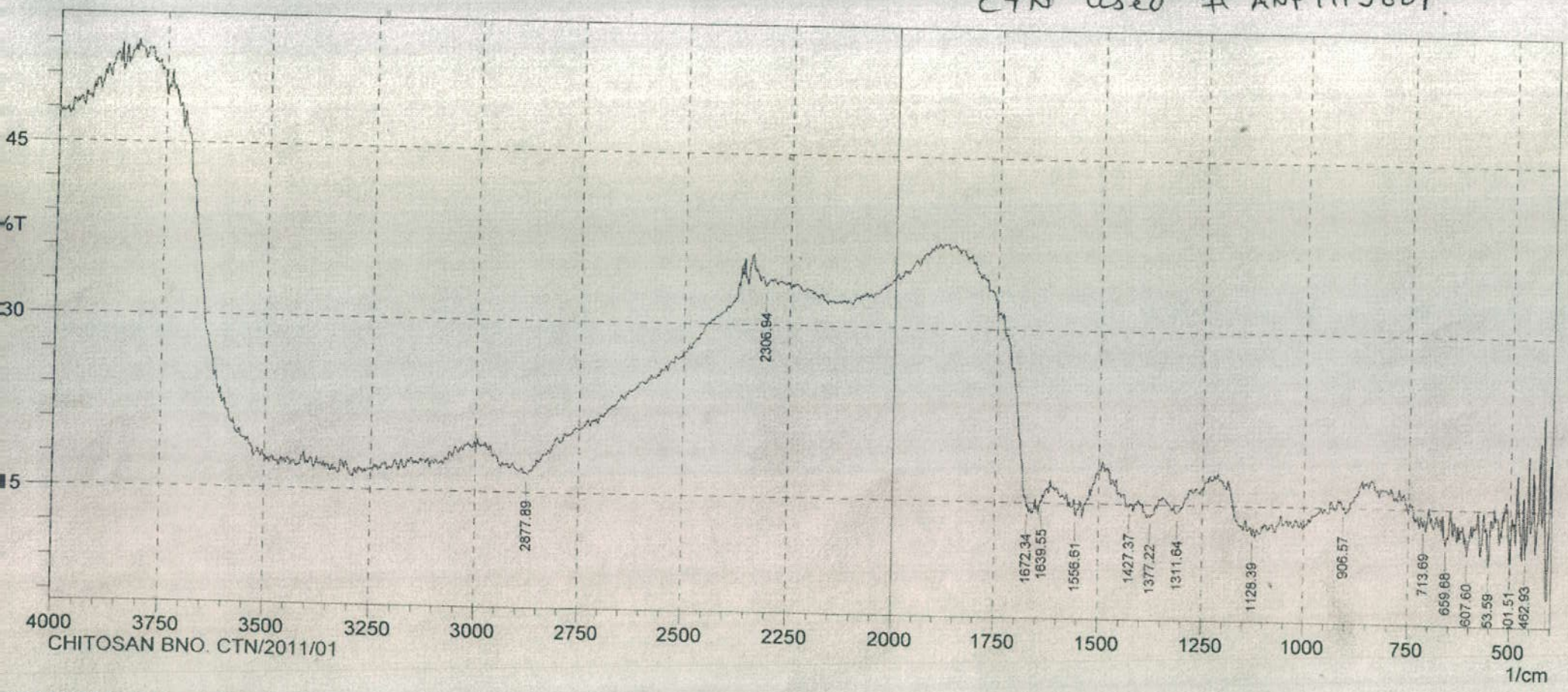
FILE NAME:D:\DATA\MCN\CHITOSAN BNO,CTN,2001,01,22\112011,011.smf

DESCRIPTION:CHITOSAN BNO. CTN/2011/01

[90% MeOH + 10% water] 1hr reflux & drier.

CTN used # ANP111J001.

	Peak
1	410.85
2	462.93
3	501.51
4	553.59
5	607.6
6	659.68
7	713.69
8	906.57
9	1128.39
10	1311.64
11	1377.22
12	1427.37
13	1556.61
14	1639.55
15	1672.34
16	2306.94
17	2877.89



MODIFICATION: Happ-Gnzel
Sector: Standard
Wavenumber: 4000 1/cm)
Number of scan: 40

Result :

Analyst:

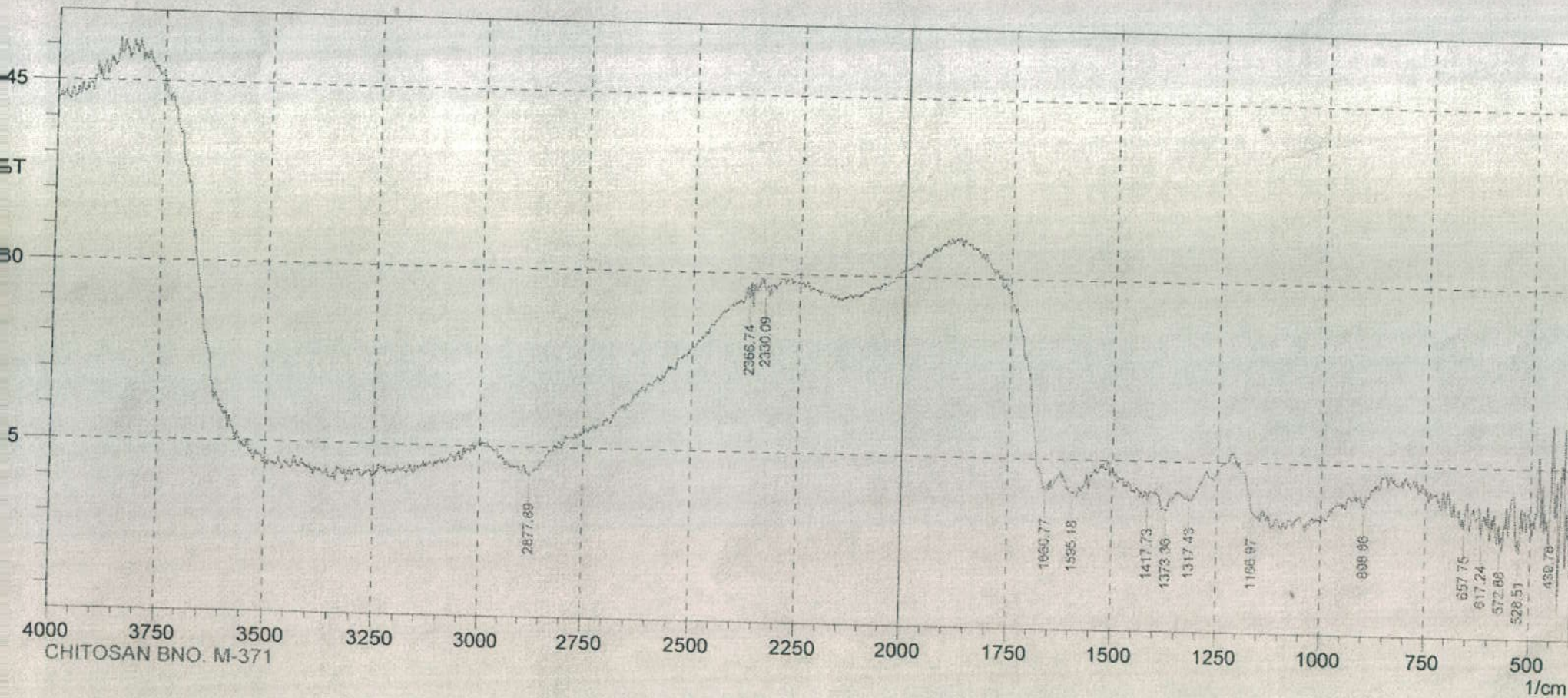
30

DATE: 11/22/2011

FILE NAME: D:\DATA\MCN\CHITOSAN BNO, M-371, 22112011, 014.smf

DESCRIPTION: CHITOSAN BNO. M-371

[chitosan used for CN/2011/02]



■ DIZATION: Happ-Gnzel

ector: Standard

: 4000 1/cm)

f scan: 40

Result :

Analyst:

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para producir un derivado de quitosano al activar quitosano, CARACTERIZADO porque comprende: suspender dicho quitosano en alcohol que contiene agua en una
6 cantidad que abarca del 0% a un máximo de 30%, agitar bajo calentamiento durante un período de tiempo para que el quitosano se active y posteriormente hacer reaccionar dicho quitosano activado con un reactivo capaz de formar complejos mediante fuerzas físicas o fuerzas químicas para preparar un derivado.

12 2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque:

a. dicho derivado tiene una propiedad que comprende: propiedad antimicrobiana, o microbiostática, o
antitranspirante, o antifúngica, o propiedad como conservante de frutas o microbiostático, o propiedad que mejora la vida
18 útil, o una combinación de las mismas; y

b. dichas fuerzas físicas incluyen adsorción y dichas fuerzas químicas incluyen un enlace covalente.

3. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque dicho derivado es preparado al someter dicho quitosano suspendido en dicho alcohol a uno o mas de
24 los siguientes pasos:

a. agregar agua a alcohol, calentar dicha mezcla, y posteriormente agregar anhídrido succínico a esta mezcla, y

32

i. agitar durante 1 hora o durante un período de tiempo suficiente para la reacción a una temperatura entre a 60 y 70°C para obtener una Segunda Composición en suspensión, y

ii. ya sea (I) recuperar dicha composición con o
6 sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Segunda Composición,

b. agregar agua a alcohol y calentar dicha mezcla, posteriormente agregar anhídrido succínico, y

i. agitar durante 1 hora o durante un período de
12 tiempo suficiente para la reacción manteniendo una temperatura de 60 a 70 °C para obtener un derivado succínico en suspensión,

ii. permitir que la suspensión se enfríe, someter dicho derivado succínico a una reacción adicional con ácido láctico u otro ácido, agitar la mezcla durante 1 hora,
18 filtrar y secar los sólidos para obtener una Cuarta Composición en suspensión, y

iii. ya sea (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Cuarta Composición, que comprende un material granular grueso que es
24 soluble en agua;

c. agregar agua a alcohol, calentar y agregar posteriormente anhídrido succínico a esta mezcla, y

33

i. agitar durante 1 hora o durante un período de tiempo suficiente para la reacción manteniendo la temperatura entre 60 y 70 °C durante un período de tiempo,

ii. permitir que la suspensión se enfríe para obtener un derivado succínico, someter dicho derivado succínico a una reacción adicional con ácido láctico u otro ácido, agregar enzima para desacetilación, agitar la mezcla durante un período de tiempo, además agregar una enzima quitinolítica, continuar agitando durante un período de tiempo, permitir que la suspensión se enfríe para obtener una Quinta Composición en suspensión, y

iii. ya sea (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Quinta Composición;

d. agregar agua a alcohol y calentar la mezcla, posteriormente agregar anhídrido succínico a esta mezcla, y

i. agitar durante 1 hora o durante un período de tiempo suficiente para la reacción manteniendo la temperatura entre 60 y 70 °C durante un período de tiempo,

ii. permitir que la suspensión se enfríe para obtener un derivado succínico, someter dicho derivado succínico a una reacción adicional con ácido láctico u otro ácido, agregar enzima para desacetilación, agitar la mezcla durante un período de tiempo, agregar además una enzima quitinolítica y continuar agitando durante un período de

tiempo, permitir que la suspensión se enfríe, para obtener una Quinta Composición en suspensión, recuperar dicha Quinta Composición como polvo sólido,

iii. suspender el polvo seco de dicha Quinta Composición en alcohol absoluto, mezclar la suspensión bien, y calentar, agregar azúcar disuelto en agua en 10% de volumen respecto del volumen del alcohol, agitar la mezcla durante un período de tiempo suficiente para el mezclado, agregar formaldehído en un período de tiempo necesario para la adición gradual con agitación constante manteniendo la temperatura durante un período hasta que se complete la reacción,

iv. posteriormente permitir que la mezcla de reacción se enfríe a temperatura ambiente,

v. recuperar el producto, lavar los sólidos con metanol acuoso u otro alcohol polar acuoso y recuperar una Sexta Composición en suspensión, y

vi. ya sea (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Sexta Composición que se puede lavar con 100 ml de metanol al 90% y secar al aire;

e. suspender bien y calentar dicha mezcla hasta alcanzar la activación del quitosano, posteriormente agregar ácido de fósforo (H_3PO_3), agregar formaldehído en forma de gotas manteniendo la temperatura durante un período de

35

tiempo, permitir que la suspensión se enfríe luego de que la adición sea completa y recuperar la Séptima Composición en suspensión, y ya sea (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Séptima Composición, que puede ser soluble en el amplio rango de pH 7 a 10 formando soluciones ligeramente turbias a transparentes;

f. mezclar bien y calentar dicha mezcla hasta alcanzar la activación del quitosano, posteriormente agregar formaldehído, agregar 10% de ácido inorgánico o ácido de fósforo (H_3PO_3) a esta mezcla mediante agitación durante un periodo de tiempo necesario para el mezclado efectivo, manteniendo la temperatura durante un período de tiempo necesario para completar la reacción, permitir que la suspensión se enfríe una vez completa la adición y recuperar la Octava Composición en suspensión, y

i. ya sea (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Octava Composición;

g. mezclar bien y calentar dicha mezcla hasta alcanzar la activación del quitosano, posteriormente agregar formaldehído, agregar 10% de ácido inorgánico o ácido de fósforo (H_3PO_3) mediante agitación durante un período de tiempo necesario para el mezclado efectivo, manteniendo la temperatura durante un período de tiempo necesario para que la reacción se complete una vez finalizada la adición,

38

permitir que la suspensión se enfríe, recuperar la suspensión como polvo seco, resuspender en metanol al 90% y un ácido orgánico o ácido inorgánico, agitar la mezcla a temperatura ambiente durante un período de tiempo necesario para un mezclado satisfactorio, separar por filtración, lavar con
6 metanol al 90% y secar para recuperar la Novena Composición;

h. mezclar bien y calentar dicha mezcla hasta alcanzar la activación del quitosano, y

i. posteriormente agregar anhídrido succínico a esta mezcla, agitar durante un período de tiempo necesario para un mezclado satisfactorio, manteniendo la temperatura
12 durante un período de tiempo necesario para la reacción, permitir que la suspensión se enfríe para obtener un derivado succínico,

ii. agregar ácido láctico, agregar enzima para desacetilación, agitar la mezcla durante un período de tiempo, agregar además enzima quitinolítica y continuar
18 agitando durante un período de tiempo, permitir que la suspensión se enfríe para obtener la Quinta Composición sólida,

iii. recuperar y secar al aire la Quinta Composición,

iv. disolver la Quinta Composición para formar una
24 solución en agua, agregar una solución acuosa de molécula cargada, capaz de adsorberse en la Quinta Composición en pH alcalino, como una solución, y

37

v. mezclar durante pocos minutos, y

vi. agregar amoníaco líquido para precipitar quitosano con la partícula cargada para obtener un derivado de la Décima Composición.

4. Un derivado de quitosano producido al activar
6 quitosano CARACTERIZADO porque comprende los pasos de:
suspender dicho quitosano en alcohol que contiene agua en una
cantidad que abarca del 0% a un máximo de 30%, agitar con
calentamiento durante un período de tiempo para que el
quitosano se active y posteriormente hacer reaccionar dicho
quitosano activado con un reactivo capaz de formar complejos
12 mediante fuerzas físicas o fuerzas químicas para preparar un
derivado.

5. El derivado de quitosano de acuerdo con la
reivindicación 4, CARACTERIZADO porque dicho derivado tiene
una propiedad que comprende una propiedad antimicrobica, o
microbiostática, o antitranspirante, o antifúngica, o
18 conservante de frutas, o una combinación de las mismas.

6. El derivado de quitosano de acuerdo con la
reivindicación 4, CARACTERIZADO porque dicho derivado es
preparado al someter dicho quitosano activado suspendido en
dicho alcohol a uno o más de los siguientes pasos:

a. agregar agua a alcohol, calentar dicha mezcla,
24 agregar anhídrido succínico a esta mezcla, y

i. agitar durante un período de tiempo suficiente
para la reacción a una temperatura entre 60 y 70 °C para

38

obtener una Segunda Composición en suspensión, y

ii. ya sea (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Segunda Composición;

6 b. agregar agua a alcohol, calentar dicha mezcla, agregar anhídrido succínico a esta mezcla, y

i. agitar durante un período de tiempo suficiente para la reacción manteniendo una temperatura de 60 a 70°C para obtener un derivado succínico en suspensión,

12 ii. permitir que la suspensión se enfríe, someter dicho derivado succínico a una reacción adicional con ácido láctico u otro ácido, agitar la mezcla durante, filtrar y secar los sólidos para obtener una Cuarta Composición en suspensión, y

18 iii. ya sea (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Cuarta Composición, que comprende un material granular grueso que es soluble en agua;

c. agregar agua a alcohol, calentar, agregar anhídrido succínico a esta mezcla, y

24 i. agitar durante un período de tiempo suficiente para la reacción manteniendo la temperatura entre 60 y 70°C durante un período de tiempo,

ii. permitir que la suspensión se enfríe para



obtener un derivado succínico, someter dicho derivado succínico a una reacción adicional con ácido láctico u otro ácido, agregar enzima para desacetilación, agitar la mezcla durante un período de tiempo, agregar además una enzima quitinolítica, continuar agitando durante un período de
6 tiempo, permitir que la suspensión se enfríe para obtener una Quinta Composición en suspensión, y

iii. ya sea (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Quinta Composición;

12 d. agregar agua a alcohol y, calentando la mezcla, agregar anhídrido succínico a esta mezcla, y

i. agitar durante período de tiempo suficiente para la reacción manteniendo la temperatura entre 60 y 70 °C durante un período de tiempo,

ii. permitir que la suspensión se enfríe para
18 obtener un derivado succínico, someter dicho derivado succínico a una reacción adicional con ácido láctico u otro ácido, agregar enzima para desacetilación, agitar la mezcla durante un período de tiempo, agregar además una enzima quitinolítica y continuar agitando durante un período de tiempo, permitir que la suspensión se enfríe, para obtener
24 una Quinta Composición en suspensión, recuperar dicha Quinta Composición como polvo sólido,

iii. suspender el polvo seco de dicha Quinta

40

Composición en alcohol absoluto, mezclar la suspensión, y calentar y mantener la temperatura en todo el proceso, agregar azúcar disuelto en agua, agitar la mezcla durante durante un período de tiempo suficiente para el mezclado, agregar formaldehído a gotas en un período de tiempo
6 necesario para la adición gradual con agitación constante manteniendo la temperatura a 60 °C durante un período de tiempo hasta que se complete la reacción,

iv. posteriormente permitir que la mezcla de reacción se enfríe a temperatura ambiente,

v. recuperar el producto, lavar los sólidos con
12 metanol acuoso u otro alcohol polar acuoso y recuperar una Sexta Composición en suspensión, y

vi. ya sea (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Sexta Composición, que se puede lavar con 100 ml de metanol al 90%
18 y secar al aire;

e. mezclar bien y calentar dicha mezcla hasta alcanzar la activación del quitosano, posteriormente agregar ácido de fósforo (H_3PO_3) disuelto en agua y agregado a gotas a esta mezcla mediante agitación, agregar formaldehído manteniendo la temperatura entre 60 y 65 °C durante un período de tiempo
24 preferentemente una vez completa la adición, permitir que la suspensión se enfríe y recuperar la Séptima Composición en suspensión, y ya sea (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un

41

reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Séptima Composición, que puede ser soluble en el amplio rango de pH 7 a 10 formando soluciones ligeramente turbias a transparentes;

f. mezclar bien y calentar dicha mezcla hasta alcanzar la activación del quitosano, posteriormente agregar
6 formaldehído en un período, agregar ácido inorgánico o ácido de fósforo (H_3PO_3) mediante agitación durante un período de tiempo necesario para el mezclado efectivo, manteniendo la temperatura entre 60 y 65 °C durante seis horas o un período de tiempo necesario para completar la reacción, permitir que la suspensión se enfríe una vez completa la adición y
12 recuperar la Octava Composición en suspensión, y

i. ya sea (I) recuperar dicha composición con o sin secado, o bien (II) someterla a reacción adicional con un reactivo para obtener un derivado adicional de dicha Octava Composición;

g. mezclar bien y calentar dicha mezcla hasta alcanzar
18 la activación del quitosano, posteriormente agregar formaldehído en un período, agregar ácido inorgánico o ácido de fósforo (H_3PO_3) mediante agitación durante un período de tiempo necesario para el mezclado efectivo, manteniendo la temperatura entre 60 y 65 °C durante un período de tiempo necesario para que la reacción se complete una vez finalizada
24 la adición, permitir que la suspensión se enfríe, recuperar la suspensión como polvo seco, resuspender en metanol al 90% y un ácido orgánico o ácido inorgánico, agitar la mezcla a temperatura ambiente durante un período de tiempo necesario

para un mezclado satisfactorio, separar por filtración, lavar con metanol al 90% y secar para recuperar la Novena Composición;

h. mezclar bien y calentar dicha mezcla hasta alcanzar la activación del quitosano,

6 i. posteriormente agregar anhídrido succínico a esta mezcla, agitar durante un período de tiempo necesario para un mezclado satisfactorio, manteniendo la temperatura entre 60 y 70 durante un período de tiempo necesario para la reacción, permitir que la suspensión se enfríe para obtener un derivado succínico,

12 ii. agregar ácido láctico u otro ácido, agregar enzima para desacetilación, agitar la mezcla durante un período de tiempo, agregar además enzima quitinolítica y continuar agitando durante un período de tiempo permitir que la suspensión se enfríe para obtener la Quinta Composición sólida,

18 iii. recuperar y secar al aire la Quinta Composición,

iv. disolver la Quinta Composición para formar una solución en agua, agregar una solución acuosa una molécula cargada, capaz de adsorberse en la Quinta Composición en pH alcalino, como una solución, en donde

24 v. mezclar durante pocos minutos, y

vi. agregar amoníaco líquido para precipitar quitosano con la partícula cargada para obtener un derivado

de la Décima Composición.

7. La composición CARACTERIZADA porque comprende una o más de las composiciones de acuerdo con la reivindicación 4 ó 5 ó 6 como ingrediente esencial.

8. La composición de acuerdo con la reivindicación 7, CARACTERIZADA porque comprende un polvo o una solución de una o más de dichas composiciones en agua en una concentración efectiva para una acción deseada.

9. La composición de acuerdo con la reivindicación 8, CARACTERIZADA porque comprende una o más de las siguientes características:

12 a. dicha composición comprende cualquiera una o más de dicha segunda Composición y cuarta composición hasta la décima Composición o una mezcla de las mismas,

b. dicha concentración efectiva es de 0,1%,

c. el ácido acético es del 2%.

18 10. Una enzima quitinolítica tiene acción proteolítica así como también quitinolítica, CARACTERIZADA porque tiene un peso molecular de 50 kD sobre electroforesis SDS-PAGE.

11. Una enzima quitinolítica de acuerdo con la reivindicación 10, CARACTERIZADA porque tiene una o más de las siguientes características:

a. una actividad quitinolítica óptima a pH 2,

24 b. una actividad quitinolítica óptima a una temperatura de 80°C.

44

12. La enzima proteo-quitinolítica de acuerdo con la reivindicación 10, CARACTERIZADA porque se prepara a partir de *Aspergillus niger* MTCC 5572 o mutantes derivados del mismo.

6 13. Un proceso para preparar una enzima de acuerdo con la reivindicación 14, CARACTERIZADO porque comprende los pasos de:

a. cultivar *Aspergillus niger* MTCC o mutantes derivados de los mismos bajo condiciones de agitación en matraz en medio de extracto de levadura y caseína,

12 b. recuperar enzima proteo-quitinasa cruda mediante precipitación con sulfato de amonio.

14. El proceso de acuerdo con la reivindicación 13, CARACTERIZADO porque además comprende la purificación de enzima cruda a partir de *Aspergillus niger* MTCC 5572 o mutantes derivados del mismo, mediante los pasos de:

18 a. disolver dicha enzima cruda concentrada mediante precipitación con sulfato de amonio en tampón de fosfato a un pH de 7,0,

b. someter la misma a filtración en gel usando Sephadex® G-100,

c. recolectar las fracciones,

24 d. someter las fracciones a análisis del contenido proteico y la actividad enzimática,

e. recolectar y reunir las fracciones correspondientes

25

a un único pico de proteína.

15. Un Cultivo aislado y libre de suelo que *Aspergillus niger* MTCC 5572 o mutantes derivados del mismo y un medio sólido o líquido.

16. El proceso de acuerdo con la reivindicación 10,
6 CARACTERIZADO porque dicha fruta es plátano, mango, manzana, fresa, naranja, lima.

17. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1,
CARACTERIZADO porque:

a. dicho alcohol es metanol o cualquier otro alcohol polar,

12 b. dicha agitación se realiza durante 30 minutos, preferentemente a 100 revoluciones por minuto.

18. El proceso de acuerdo con la reivindicación 3 paso c), CARACTERIZADO porque dicha enzima quitinolítica que tiene acción proteolítica así como también quitinolítica comprende una enzima que tiene al menos una de las siguientes
18 propiedades: un peso molecular de 50 kD (kilo Dalton) sobre electroforesis SDS-PAGE, una actividad quitinolítica óptima a pH 2 y una actividad quitinolítica óptima a una temperatura de 80 °C.

19. El proceso de acuerdo con la reivindicación 18,
CARACTERIZADO porque comprende dicha enzima quitinolítica
24 aislada de *Aspergillus niger* MTCC 5572 o mutantes derivados del mismo.

20. El proceso de acuerdo con la reivindicación 3 paso

46

c), CARACTERIZADO porque dicha enzima de desacetilación es aislada de *Bacillus sp* MTCC 5571 o mutantes derivados de la misma.

21. El proceso de acuerdo con la reivindicación 3 paso c), CARACTERIZADO porque dicha enzima de desacetilación es xilán acil transferasa preparada a partir de *Bacillus sp* MTCC 5571 o mutantes derivados de la misma, o cualquier otra bacteria o cualquier otro microorganismo capaz de producir la enzima que tiene actividad de desacetilación.

22. El proceso de acuerdo con la reivindicación 3 paso c), CARACTERIZADO porque la enzima quitinolítica es que tiene actividad proteolítica así como también quitinolítica, es una proteo-quitinasa, es termoestable y usada para formar un derivado hidrolizado.

23. El proceso de acuerdo con la reivindicación 18, CARACTERIZADO porque dicha proteo-quitinasa es preparada a partir de *Aspergillus niger* MTCC 5572 o mutantes derivados del mismo, o cualquier otro hongo o cualquier otro microorganismo capaz de producir una actividad proteo-quitinolítica.

24. El proceso de acuerdo con la reivindicación 19, CARACTERIZADO porque dicha enzima quitinolítica tiene un peso molecular sobre SDS-PAGE de 50 kD, actividad quitinolítica óptima a pH 2 y a 80 °C.

25. El proceso de la reivindicación 3 en el que:
a en la reivindicación 3 sub-reivindicación (a), la

47

reivindicación 3 sub-reivindicación (b), la reivindicación 3 sub-reivindicación (c) y la reivindicación 3 sub-reivindicación (d) dicho contenido de agua es del 0% al 20 % de volumen del alcohol ,

b. en la reivindicación 3 sub-reivindicación (a), la

6 reivindicación 3 sub-reivindicación (b), la reivindicación 3 sub-reivindicación (c) y la reivindicación 3 sub-reivindicación (d) la mezcla de quitosano, el agua y el alcohol se calienta a 70°C ,

c. en la sub-reivindicación (i) de la reivindicación 3 sub-reivindicación (a), la reivindicación 3 sub-reivindicación

12 (b), reivindicación 3 sub-reivindicación (c) y la reivindicación 3 sub-reivindicación (d), la temperatura se mantiene a 65°C,

d. en la sub-reivindicación (ii) de la reivindicación 3 (b) se deja que la suspensión enfrie hasta 30°C,

e. en la sub - reivindicación (ii) de la reivindicación 3

18 (b), sub-reivindicación (ii) de la reivindicación 3 (c) y sub-reivindicación (ii) de la reivindicación 3 (d) el ácido láctico u el otro ácido es del 10 % al 20 % del peso seco del derivado succínico, y la agitación de la mezcla se realiza durante 1 hora,

f. en la sub-reivindicación (ii) de la reivindicación 3 (c) y

24 en sub-reivindicación (ii) de la reivindicación 3 (d): la enzima para desacetilación agregada es 4.000 UI por gramo de peso seco 5 de derivado succínico, el período de agitación de la mezcla es 7 horas, la adición de la enzima quitinolítica

48

agregada es de 500 UI por 5 g se continúa peso seco de derivado succínico, y la agitación es durante 1 hora, g. en la reivindicación 3 (d) de sub-reivindicación (iii), la agitación se lleva a cabo a 100 rpm durante 30 Min, se mantiene la temperatura a 60°C, se agrega el azúcar disuelto en agua en 10 % de volumen a volumen de alcohol, se agita la mezcla durante 15 minutos, se aaggrega el formaldehído gota a gota poco a poco más de 30 minutos con agitación constante, la temperatura se mantiene a 60°C, y el período de tiempo durante el cual se mantiene la temperatura es de 1 a 6 horas, h. en la reivindicación 3 sub-reivindicación (e): el quitosano se suspende en 20 volúmenes de alcohol, la mezcla se realiza por agitación a 100 rpm durante 30 min, la mezcla se calienta a 60°C, se agrega el ácido de fósforo gota a gota disuelto en agua a este mezcla por agitación y se agrega formaldehído igual en peso al peso seco de quitosano activado en forma gota a gota manteniendo la temperatura entre 60 - 650 ° C por 2 - 6 horas , i. en la reivindicación 3 sub-reivindicación f : quitosano se suspende en 20 volúmenes de alcohol, la mezcla se realiza por agitación a 100 rpm durante 30 min, la mezcla se calienta a 600 ° C, y el ácido inorgánico o de ácido de fósforo se agrega como 10 % disuelto en agua y gota a gota a esta mezcla por agitación durante una hora adicional, la temperatura se mantiene entre 60 - 650 ° C durante 6 horas , j. en la reivindicación 3 sub-reivindicación g : quitosano se suspende en 20 volúmenes de alcohol, la mezcla se realiza

49

por agitación a 100 rpm durante 30 min, la mezcla se calienta a 600 ° C, se agrega el formaldehído durante un periodo de pocos minutos, se agrega ácido inorgánico o ácido de fósforo al 10 % disuelto en agua y gota a gota a esta mezcla, la agitación se lleva a cabo durante 1 hora, la temperatura se mantiene entre 60 - 65°C durante 6 horas, se realiza la resuspensión en 20 volúmenes de 90 % de metanol, y 2 volúmenes de HCl concentrado, la mezcla se agita a temperatura ambiente durante una hora, se lava y después se filtra con 20 volúmenes de 90 % de metanol, k. en la reivindicación 3 sub-reivindicación h: dicha suspensión de quitosan se realiza en 20 volúmenes de alcohol, la mezcla se realiza por agitación a 100 rpm durante 30 minutos, el calentamiento de dicha mezcla se realiza a 70°C, se agrega anhídrido succínico en diferentes proporciones que van desde 15 g a 0,1 g, la agitación se realiza durante una hora, la temperatura se mantiene entre 60 - 70°C y específicamente a 65 °C durante 1 hora, láctico u otro ácido se agrega a 10 % del peso seco del derivado succínico, se agrega enzima para la desacetilación 4.000 UI por 5 gramos de peso en seco de derivado succinico utilizado, período de tiempo durante el cual se agita la mezcla es de 7 horas, se agrega la enzima quitinolítica 500 UI 5 por gramo de peso seco de derivado succínico utilizado, agitación continua durante 1 hora, la Quinta Composición se disuelve para hacer una solución al 1% en agua, la adición de una solución acuosa de sulfato de cobre, y dicha solución de sulfato de cobre es

50

1 % en agua.

26. El derivado de quitosano de la reivindicación 6 en el que:

- a. en la reivindicación 6 sub-reivindicación (a), la reivindicación 6 sub-reivindicación b., la reivindicación 6 sub-reivindicación c. y la reivindicación 6 sub-reivindicación d. dicho contenido de agua es del 0% al 20 % de volumen de alcohol,
- b. en la reivindicación 6 sub-reivindicación (a)., la reivindicación 6 sub-reivindicación b., la reivindicación 6 sub-reivindicación c. y la reivindicación 6 sub-reivindicación d la mezcla de quitosano, el agua y el alcohol se calienta a 700 ° C ,
- c. en sub-reivindicación (i) de la reivindicación 6 sub-reivindicación (a)., la reivindicación 6 sub-reivindicación b., reivindicación 6 sub-reivindicación c. snd reivindicación 6 sub-reivindicación d, manteniendo la temperatura es 65°C,
- d. en sub-reivindicación (ii) de la reivindicación 6 (b) se deja que la suspensión se enfrie hasta 30°C,
- e. en sub-reivindicación (ii) de la reivindicación 6 (b), sub-reivindicación (ii) de la reivindicación 6 (c) y sub-reivindicación (ii) de la reivindicación 6 (d) el láctico o el otro ácido es del 10 % al 20 % del peso seco del derivado succínico, y la agitación de la mezcla se realiza durante 1 hora,
- f. en el sub-reivindicación (ii) de la reivindicación 6 (c) y en sub-reivindicación (ii) de la reivindicación 6 (d): la

5

enzima para desacetilación que se agrega es de 4.000 UI por gramo de peso seco 5 gramos de derivado succínico, el período de agitación de la mezcla es 7 horas, la adición de la enzima quitinolítica agregada es de 500 UI por 5g peso seco de derivado succínico, y la agitación se continúa durante 1 6 hora.

g. en la Reivindicación 6 (d) Sub - reclamo (iii), la agitación se lleva a cabo a 100 rpm durante 30 Minn, se mantiene la temperatura a 60°C, se agrega el azúcar disuelto en agua en 10 % de volumen a volumen de alcohol, se agita la mezcla y se realiza durante 15 minutos, se agrega el 12 formaldehído gota a gota poco a poco más de 30 minutos con agitación constante, la temperatura se mantiene a 60°C, y el período de tiempo durante el cual se mantiene la temperatura es de 1 a 6 horas.

h. en la reivindicación 6 sub-reivindicación (e) : quitosano se suspende en 20 volúmenes de alcohol, la mezcla se realiza 18 por agitación a 100 rpm durante 30 min, la mezcla se calienta a 60°C, se agrega el ácido de fósforo gota a gota disuelto en agua a este mezcla por agitación y se agrega formaldehído igual en peso al peso seco de quitosano activado en forma gota a gota manteniendo la temperatura entre 60 - 65°C por 2 - 6 horas,

24

i. en la reivindicación 6 sub-reivindicación f: el quitosano se suspende en 20 volúmenes de alcohol, la mezcla se realiza por agitación a 100 rpm durante 30 min, la mezcla se calienta



a 60°C, y el ácido inorgánico o de ácido de fósforo se agrega como 10 % disuelto en agua y gota a gota a esta mezcla por agitación durante una hora adicional, la temperatura se mantiene entre 60 - 65°C durante 6 horas ,

j. en la reivindicación 6 sub-reivindicación g : quitosano se
6 suspende en 20 volúmenes de alcohol, la mezcla se realiza por agitación a 100 rpm durante 30 min, la mezcla se calienta a 60°C, se agrega el formaldehído durante un periodo de pocos minutos, ácido inorgánico o ácido de fósforo se añadido como 10 % disuelto en agua y gota a gota a esta mezcla se agrega, la agitación se lleva a cabo durante 1 hora, la temperatura
12 se mantiene entre 60 - 65°C durante 6 horas, se realiza la resuspensión en 20 volúmenes de 90 % de metanol, y 2 volúmenes de HCl concentrado, la mezcla se agita a temperatura ambiente durante una hora, se lava luego se filtra con 20 volúmenes de 90 % de metanol,

k. en la reivindicación 6 sub-reivindicación h: dicha
18 suspensión de quitosano se hace en 20 volúmenes de alcohol, la mezcla se realiza por agitación a 100 rpm durante 30 minutos, el calentamiento de dicha mezcla se realiza a 70°C, se agrega anhídrido succínico en diferentes proporciones que van desde 15 g a 0,1 g, la agitación se realiza durante una hora, la temperatura se mantiene entre 60 - 70°C y
24 específicamente a 65°C durante 1 hora, el láctico o el otro ácido se agrega a 10 % del peso seco del derivado succínico, la enzima para la desacetilación se agrega 4.000 UI por 5 gramos de peso en seco de derivado succinico utilizado,



período de tiempo durante el cual se agita la mezcla es de 7 horas, se agrega la enzima quitinolítica 500 UI 5 por gramo de peso seco de derivado succínico utilizado, agitación continua durante de 1 hora, la Quinta Composición se disuelve para hacer una solución al 1% en agua, agregando una solución 6 acuosa de sulfato de cobre, y dicha solución de sulfato de cobre es 1 % en agua.

27. Un proceso de la reivindicación 3 la etapa e) que comprende dicha enzima desacetilación que es aislada de *Bacillus* sp MTCC 5571 o mutantes derivados de la misma.

12

28. Un derivado de quitosano de la reivindicación 21 en el que dicha enzima de desacetilación es un acil transferasa de xilano preparado a partir de *Bacillus* sp MTCC 5571 o mutantes derivados del mismo o cualquier otra bacteria o cualquier otro microorganismo capaz de producir la enzima que tiene 18 actividad desacetiladora.

54