

P-2021/41538

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Re: Expediente No. **NC2021/0005878**

Solicitud de patente a nombre de **CAROLINA MARIA MONTOYA RESTREPO**

Yo, CAROLINA DAZA MONTALVO identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la Carrera 11 No. 86-53, obrando como apoderada de CAROLINA MARIA MONTOYA RESTREPO, domiciliada en El Retiro, Antioquia, Colombia, solicitante de la patente de la referencia, en respuesta al oficio No. **21225** notificado electrónicamente el 29 de diciembre de 2023, relacionado con los requerimientos de fondo de la solicitud, atentamente me permito presentar la siguiente información:

1. Modificación a las Reivindicaciones

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, el cual consta de siete (7) reivindicaciones y reemplaza completamente el presentado el 4 de mayo de 2020. Específicamente, se realizaron las siguientes modificaciones:

1.1. A fin de dar una correcta caracterización al método reclamado, la reivindicación independiente 1 ahora recita:

- a) Reactivación de cepas bacterianas seleccionadas del grupo que consiste de *S. ureae*, *S. Pasteuri*, *B. megaterium*, *B. holondurans*, *B. pseuodifurnysm Bcohnii*, *B. lentus*, *B. subtilis*, *B. pumilis*, *Lysinibacillus sphaericus*, y *corynebacterium amoniogenes* con capacidad de bioprecipitación de carbonato de calcio, en un medio de reactivación que comprende peptona de soya o de caseína 0.5%, extracto de carne 0.3% agar 1.5%, NaCl 0.5%, y suplementado por urea 2%

El soporte para esta modificación se encuentra en la tabla 1 y párrafos [0037] y [0038] de la descripción de la presente solicitud.

- b) Preparación de un medio de cultivo líquido B21LM para la síntesis de vaterita en donde el medio de cultivo líquido B21LM comprende NaCl entre 0.1% a 1.0% por cada 100 ml de volumen del medio, extracto de levadura entre 0.1% a 1.0% por cada 100 ml del medio; peptona de caseína entre 0.5% y 2% por cada 100 ml de volumen del medio 1% y acetato de calcio entre 0.25% y 10% por cada 100 ml de volumen del medio,

El soporte para esta modificación se encuentra en los párrafos [0038] - [0040] de la descripción de la presente solicitud.

- c) Adición de 10⁸ células/ml de las cepas bacterianas reactivadas en el paso a) en el medio de cultivo líquido B21LM preparado en el paso b),

El soporte para esta modificación se encuentra en el párrafo [0055] de la descripción de la presente solicitud, en donde se indica que "*paralelamente se lleva a cabo la etapa b) que consiste en la preparación del medio de cultivo B21LM de acuerdo con la presente invención, en donde el medio B21LM comprende NaCl 0.5%, extracto de levadura 0.5%, peptona de caseína 1% y acetato de calcio a 3%. Se mezclan las cantidades anteriormente indicadas en un recipiente o contenedor o un Erlenmeyer con un volumen efectivo de 100 ml y se fijan las condiciones de la siguiente manera: temperatura a 30°C, presión atmosférica (isobárico), agitación a 100 rpm, pH de inicio 7.0 y se agregaron a cada Erlenmeyer respectivamente un 10% de volumen de inóculo con una concentración de 10⁸ células/ml (Bacillus lentus, Sporosarcina pastuerii, Bacillus subtilis y Bacillus pumilus)[...]*".

- d) Monitoreo de la formación de vaterita estable mediante la evaluación de la cantidad de bioprecipitados de carbonato de calcio generado cada 3 días por un periodo de 15 o 21 días mediante la centrifugación de las muestras por un periodo de 5 a 15 minutos y a temperatura entre 20°C y 30°C.

El soporte para esta modificación se encuentra en el párrafo [0042] de la descripción de la presente solicitud.

- e) Separación y recolección de bioprecipitados de carbonato de calcio tipo vaterita en los días 15 y 21 en donde las partículas de carbonato de calcio tipo vaterita se enjuagan por triplicado con agua destilada y se someten a centrifugación entre 5 a 15 minutos y a temperatura entre 20°C y 30°C y

retirar el sobrenadante de los precipitados y secar a temperatura ambiente o a temperaturas que no excedan los 100°C en horno convencional.

El soporte para esta modificación se encuentra en el párrafo [0044] de la descripción de la presente solicitud.

- f) Caracterización mineralógica de bioprecipitados de carbonato de calcio tipo vaterita mediante espectroscopia de infrarrojo, microscopia electrónica de barrido con analizador de rayos X por energía dispersiva y difracción de rayos X.

El soporte para esta modificación se encuentra en el párrafo [0045] de la descripción de la presente solicitud.

1.2. No se incluyen las antiguas reivindicaciones 2, 3, 6, 8 y 10 a 15.

1.3. La nueva reivindicación 2 (antigua reivindicación 4) ahora especifica que *"el medio de cultivo líquido B21LM comprende desde 0.3% a 0.8% de NaCl por cada 100 ml de volumen del medio, extracto de levadura desde 0.2% a 0.8% por cada 100 ml de volumen del medio, peptona de caseína entre 0.8% y 1.5% por cada 100 ml de volumen del medio y como fuente de calcio acetato de calcio en un rango desde 3.0% hasta 10% por cada 100 ml de volumen del medio"*. Adicionalmente, no se incluye la expresión "efectivo" al hacer referencia al volumen del medio.

1.4. La nueva reivindicación 3 (antigua reivindicación 7) ya no hace referencia a que *"la separación y recolección ... se realiza entre el día 15 y 21 y las partículas de vaterita biosintetizadas se enjuagan por triplicado con agua destilada y se colectan"*.

1.5. Se incluye una nueva reivindicación 6 la cual reclama el microorganismo preferente mediante el cual se lleva a cabo el paso a) del proceso reclamado.

1.6. La reivindicación independiente de producto 7 ahora es caracterizado por espectro de difracción de rayos X y no por el proceso de producción de carbonato de calcio tipo vaterita.

- 1.7.** En vista de las modificaciones realizadas, se renumera el pliego reivindicatorio y se ajustan las dependencias de conformidad.

En cuanto a estas modificaciones, me permito decir que las mismas no amplían de ninguna manera la materia objeto de la solicitud original y que fueron realizadas siguiendo las recomendaciones realizadas por el examinador, con el fin de superar las objeciones planteadas en su concepto técnico. Por lo tanto, es posible afirmar que el nuevo pliego reivindicatorio se ajusta a las disposiciones del Artículo 34 de la Decisión 486.

2. Pago de tasas

Considerando que el presente memorial se presenta junto con modificaciones a las reivindicaciones se adjunta recibo por concepto de pago de tasa de modificación a las reivindicaciones, según lo establecido en la **Resolución 59669 de 2020**.

En relación con el número de reivindicaciones, atentamente nos permitimos decir que no se adjunta tasa por concepto de reivindicaciones adicionales, toda vez que el nuevo capítulo reivindicatorio tiene menor número de cláusulas que el anteriormente presentado.

3. Claridad y concisión de las reivindicaciones

Tal como se ha indicado previamente, el pliego reivindicatorio ha sido modificado para que resulte más claro y conciso, y para superar las objeciones de novedad planteados por el examinador. Respecto a las objeciones específicas relacionadas con el Artículo 30 de la Decisión 486, se desea enfatizar en lo siguiente:

- 3.1.** Indica el examinador que *"la reivindicación 1 carece de claridad, porque no se define a partir de sus características técnicas esenciales, es decir mencionando una serie de etapas y condiciones específicas que le permitan a la persona normalmente versada en la materia la implementación de dicho proceso"*.

Tal como se ha indicado en el numeral 1.1. la reivindicación se ha modificado a fin de dar una correcta caracterización al método reclamado. Específicamente, se han incluido las condiciones específicas más importantes del proceso, como son, la cepa bacteriana, el medio de cultivo de reactivación, el medio de cultivo B21LM y demás condiciones requeridas en cada una de las etapas.

- 3.2.** Afirma el examinador que *"la reivindicación 9 no es clara, porque caracteriza el producto mediante las etapas del proceso no define el producto en términos de sus características técnica esenciales, es decir mencionando la naturaleza de los componentes y las cantidades"*.

En este sentido, se resalta que el producto carbonato de calcio tipo vaterita ahora es caracterizado por espectro de difracción de rayos X. Es de resaltar que al ser un producto biotecnológico, no es posible definirlo por sus características técnicas esenciales como componentes y proporciones tal como lo solicita el examinador, por lo que se ha hecho necesario caracterizarlo por sus bandas de difracción de rayos X y FTIR que muestran las bandas características del producto obtenido, en donde se puede apreciar que sus picos son más definidos lo cual está relacionado con la pureza y alta cristalinidad del producto obtenido (vaterita) mediante el presente proceso biotecnológico.

- 3.3.** Indica el examinador que *"Las reivindicaciones 1 y 9 no son concisas, porque reclaman en más de una reivindicación independiente un proceso de producción de carbonato de calcio tipo vaterita"*.

A fin de superar la objeción, la reivindicación independiente de producto ahora es caracterizado por espectro de difracción de rayos X y no por el proceso de producción de carbonato de calcio tipo vaterita.

En vista de las modificación y aclaraciones previas, es posible afirmar que el pliego reivindicatorio que se presenta en esta oportunidad es claro y conciso, cumpliendo con los requerimientos establecidos en el Artículo 30 de la Decisión 486.

4. Descripción

El examinador indica la Descripción no divulga la invención de manera suficientemente clara y completa, para que una persona capacitada en la materia pueda ejecutarla, incumpliendo de esta forma lo establecido en el artículo 28 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Específicamente, el examinador objeta que este sentido el capítulo descriptivo no presenta evidencia de un proceso de producción de carbonato de calcio tipo vaterita que las siguientes etapas a) Reactivación de cepas bacterianas con capacidad de bioprecipitación de carbonato de calcio, b) Preparación del medio de cultivo líquido B21LM para la síntesis de vaterita, c) Adición de las cepas bacterianas reactivadas en el paso a), d) Monitoreo de la formación de vaterita estable,

- e) Separación y recolección de bioprecipitados de carbonato de calcio tipo vaterita; y
- f) Caracterización mineralógica de bioprecipitados de carbonato de calcio tipo vaterita en "cualquier" condición.

En dicho respecto, se manifiesta que la materia reclamada ha sido lo suficientemente limitada, de modo que la materia divulgada en el nuevo capítulo reivindicatorio está completamente soportada en la descripción inicialmente presentada.

Adicionalmente, tal como establece la Guía para el Examen de Solicitudes de Patente de Invención y Modelo de Utilidad, empleado por su Despacho para el análisis de las solicitudes (ver página 93):

*"La invención puede estar suficientemente descrita si se aporta: - **Un sólo ejemplo o un número razonable de ejemplos, modos de realización alternativos o variaciones que habilitan a la persona del oficio normalmente versada en la materia para que, junto con sus conocimientos generales, pueda poner en práctica la invención en toda el área reivindicada y no sólo algunas especies particulares reivindicadas, sin que requiera de un esfuerzo inventivo. En tal caso, la presentación de ejemplos relativos a todas las especies particulares de la invención no será condición necesaria para la suficiencia, siempre y cuando dichas especies se mencionen en la descripción**". (el énfasis es nuestro)*

Teniendo en cuenta lo anterior, debe considerarse que la información contenida en la Descripción se suma a los conocimientos generales de una persona del oficio normalmente versada en la materia. En el presente caso, dicha persona encuentra suficiente información y soporte para la materia reivindicada y, por tanto, puede reproducirla y ejecutar la invención sin problema.

Por lo tanto, en vista de las aclaraciones aquí presentadas, se solicita de manera respetuosa reconsiderar y retirar la objeción.

5. Unidad de Invención

Afirma el examinador que teniendo en cuenta que el concepto común es un bioproceso de producción de carbonato de calcio tipo vaterita, y dado que este se encuentra divulgado en el estado de la técnica, específicamente en el documento CN109517753 (Resumen), la solicitud carece de unidad de invención debido a que reclama más de un

grupo inventivo sin la presencia de características o elementos técnicos nuevos e inventivos que sean comunes a todas las invenciones.

Por lo tanto, la invención presenta diferentes conceptos técnicos inventivos así:

- **Grupo inventivo 1:** un bioproceso de producción de carbonato de calcio tipo vaterita (reivindicaciones 1 a 7 y 9).
- **Grupo inventivo 2:** un medio de cultivo líquido (B21LM) para la producción de carbonato de calcio tipo vaterita estable (reivindicación 8).

A fin de superar la objeción, la antigua reivindicación 8 no se incluye en esta oportunidad, por lo que la solicitud ha sido restringida al grupo inventivo 1 identificado por el examinador.

En vista de lo anterior, es posible afirmar que la presente solicitud comparte un concepto común inventivo, dando cumplimiento con los requerimientos del Artículo 25 de la Decisión 486.

6. Nivel inventivo

El Examinador establece en su concepto técnico la falta de nivel inventivo las antiguas reivindicaciones 1 a 7 y 9 en vista del documento CN109517753 (**D1**).

En particular, el examinador manifiesta que el documento D1 es el arte previo más cerca al objeto reivindicado y que la diferencia entre la invención definida entre la reivindicación 1 y el método divulgado en D1, consiste en el medio de cultivo líquido B21LM.

En este sentido, hacemos notar que el Artículo 18 de la Decisión 486/00 determina que *"una invención tiene nivel inventivo, si para una **persona del oficio normalmente versada en la materia técnica** correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica"*. (El subrayado es nuestro).

Lo anterior significa que el análisis de nivel inventivo **NO** es una comparación de los objetos de las anterioridades y la solicitud en estudio. El análisis de nivel inventivo **debe demostrar** la obviedad de la invención y establecer cómo ésta no contiene un salto cualitativo, que demuestre su altura inventiva, teniendo en cuenta que se hace

necesario demostrar que la invención analizada carece de nivel inventivo y hubiese sido obvia para una persona versada en la materia.

Considerando la definición anterior, deseamos aclarar que los antecedentes citados por el examinador no sugieren ni hacen evidentes las ventajas técnicas del método reivindicado por la presente solicitud, al menos por las razones expuestas a continuación.

6.1. Método reivindicado

La siguiente tabla comparativa muestra características y/o condiciones que difieren la presente solicitud con respecto a D1.

D1 (CN109517753)	Reivindicación 1 de la presente solicitud
CaCl ₂	Acetato de calcio (sal orgánica no iónica) en el paso b)
[Ca] - 6 a 16 g/L, y otros 8 a 16 g/L. 0.8g/100ml	[Ca] 30g/l o 3%-70% 3gr/100ml
6 a 9 x10 ⁷ ufc/ml concentración de las alícuotas	10 ⁸ celulas /ml en el paso c)
2-5 ml alícuotas del inóculo/100 ml	10 ml alícuotas del inóculo/100 ml
Peptona de vacuno (LB-PEPTONA DE CARNE)	Peptona de caseína en el paso a)
Vaterita	
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus lentus</i> No hay dependencia por un solo microorganismo Microorganismos ureolíticos y no ureolíticos
Ureasa negativa	Ureasa positiva
temperatura del cultivo 30-37°C	25-35°C ideal 30°C
72-168(3-7 Días)	6- 15 Días
180 rpm	100 rpm
Aplicación biorremediación – ambiental - absorción de metales pesados	Solución farmacéutica- uso farmacéutico
2-5 ml de inóculo por 100 ml de medio	10 ml de inóculo por 100 ml de medio

180 rpm	100- 250 rpm
V) extracto de levadura 0,5% (m/V) NaCl 1% (m/V) $6,5 \leq pH \leq 7,5$] inoculados con 2-3 anillos de <i>Becillus subtilis</i> (pueden adquirirse en el Centro de Conservación de Cepas Microbianas Agrícolas de China, Cepa No. ACCC 01185) colocados en un agitador a 30 °C 180 rpm durante 10 horas para preparar la solución bacteriana de siembra [la concentración de la solución bacteriana era de 8×10^7 ucf/mL aproximadamente] 10^7 ucf/ml Preparación de la solución de semilla: en 200 mL esterilizado (115 ° C durante 20 min) LB medio líquido [(Tryptona 1% (m / V), extracto de levadura 0.5% (m / V), NaCl 1% (m / V), $6.5 \leq pH \leq 7.5$] inoculado con 2-3 anillos de <i>Bacillus subtilis</i> (disponible en el Centro de Gestión de Colecciones de Cultivos Microbianos Agrícolas de China, número de cepa: ACCC 01185), colocado en un agitador a 30 ° C, 180 rpm durante 10 h de cultivo de agitación Para preparar un líquido de semilla bacteriana [la concentración del líquido bacteriano fue de aproximadamente 8×10^7 ufc/mL].	[0041] En una modalidad preferida de la invención, el medio de cultivo líquido B21LM comprende NaCl 0.5%, extracto de levadura 0.5%, peptona de caseína 1%, modificando las concentraciones de acetato de calcio a valores de 3%, 7,5% y 10%. <i>B lentus, B pasteurii, B pumilus y B subtilis</i>
Separación a 8000 rpm /15 min	Separación a 1000-3000 rpm/5-15 min
Secado a 55 °C	Secado a temperatura ambiente 25°C o temperatura que no exceda los 100°C

De acuerdo con la tabla anterior, se resaltan diferencias de algunas las características mencionadas las cuales proveen un efecto técnico superior a la presente solicitud sobre D1.

a. Una fuente de calcio diferente al usado en el documento D1

El empleo de una fuente de calcio diferente hace referencia al uso de una sal inorgánica tipo cloruro de calcio soluble (**CaCl₂**). Esto difiere de la invención presentada, la cual utiliza una sal orgánica no iónica denominada acetato de calcio como fuente de calcio fundamental para la biosíntesis de vaterita.

Si bien el acetato de calcio es una sal formada por iones de calcio (Ca²⁺) y iones acetato (CH₃COO⁻) su estructura y comportamiento químico son muy diferentes, toda vez que, el cloruro de calcio es una sal iónica formada por iones de calcio (Ca²⁺) y iones cloruro (Cl⁻). Por lo que son dos compuestos químicos que, si bien son fuente de calcio, tienen diferentes propiedades y usos. Por lo que una persona medianamente versada en la materia se vería más motivada a utilizar una sal inorgánica de calcio como lo enseña el documento D1 en lugar de una sal orgánica de calcio teniendo en cuenta que tendría que considerar que una sal orgánica tiene una constante de disociación diferente.

- **Propiedades físicas:** Desde el punto de vista de las propiedades físicas, es importante señalar que el **acetato de calcio** generalmente se presenta en forma de polvo cristalino blanco o como gránulos y es menos higroscópico que el cloruro de calcio, por lo que una persona medianamente versada en la materia a la luz de lo enseñado en D1 consideraría más una sal inorgánica como el cloruro de calcio en lugar de una sal orgánica como el acetato de calcio ya que dicha persona pensaría que el **cloruro de calcio** funcionaría mejor por tener gran afinidad por el agua y absorberla, formando soluciones acuosas concentradas.

Por lo tanto, si bien el acetato de calcio como el cloruro de calcio son fuentes de ion calcio, también es cierto que tienen propiedades fisicoquímicas diferentes y se utilizan en aplicaciones distintas debido a sus diferentes características químicas y comportamientos en solución y por ello, dicha persona medianamente versada en la materia no encontraría evidente cambiar el cloruro de calcio como lo enseña D1 por una sal orgánica como el acetato de calcio.

De hecho, la persona normalmente versada en la materia, tampoco encontraría evidente elevar las concentraciones de calcio, tal como se muestra en la presente invención toda vez que se emplean en la presente invención concentraciones de 0.8 g/100 ml, dado que dicha persona pensaría que el aumento en las concentraciones de calcio harían una solución hipertónica haciendo del medio un medio tóxico y por consiguiente conllevando a una lisis y muerte celular.

En resumen, la diferencia molecular entre el acetato de calcio y el cloruro de calcio radica en los aniones que los acompañan. Mientras que el acetato de calcio contiene iones acetato (CH_3COO^-), el cloruro de calcio contiene iones cloruro (Cl^-), estos aniones influyen en las propiedades químicas y físicas de los compuestos, así como en sus aplicaciones específicas. Adicionalmente, La **capacidad de las bacterias para asimilar el CaCl_2** (cloruro de calcio) o el CH_3COO^- (acetato) depende de varios factores, incluida la especie bacteriana, el entorno en el que se encuentran y la disponibilidad de otros nutrientes esenciales. Sin embargo, en general, las bacterias tienen una mayor facilidad para asimilar iones de calcio (Ca^{2+}) en forma de cloruro de calcio (CaCl_2) que en forma de acetato. Por lo tanto, una persona medianamente versada en la materia que tenga este conocimiento no encontraría evidente reemplazar el cloruro de calcio por acetato de calcio, y el uso de acetato de calcio en la presente invención se puede considerar como un salto de la regla técnica común que es utilizar cloruro de calcio.

De hecho, dicha persona versada en la materia al saber que el cloruro de calcio es una fuente inorgánica de calcio que proporciona iones de calcio (Ca^{2+}) de manera directa y que está disponible para la absorción por parte de las bacterias, no probaría el reemplazo de la sal inorgánica cloruro de calcio por la sal orgánica sabiendo que el calcio es un nutriente esencial para muchas bacterias, ya que desempeña un papel crucial en varias funciones celulares, incluida la estabilidad de la membrana celular, la regulación del transporte de nutrientes y la formación de esporas en algunas especies.

En este orden de ideas, dicha persona medianamente versada en la materia, sabría que el acetato (CH_3COO^-) es un anión orgánico que forma parte de moléculas más complejas, como el acetato de calcio ($\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) y podría pensar que la asimilación del calcio a través del acetato puede ser menos eficiente para algunas bacterias en comparación con el cloruro de calcio, ya que primero deben descomponer las moléculas orgánicas para liberar los iones de calcio antes de poder utilizarlos.

Por lo tanto, mientras que algunas bacterias pueden asimilar el calcio a través de fuentes orgánicas como el acetato, en general, tienen una mayor facilidad para asimilar el calcio en forma de cloruro de calcio debido a su disponibilidad directa de iones de calcio, por lo que la persona versada en la materia no estaría motivada a cambiar la fuente de calcio sabiendo que ciertos microorganismos

suelen asimilar de mejor manera el calcio proveniente de una sal inorgánica como el cloruro de calcio en lugar de una sal orgánica.

b. Medio de Cultivo

En relación con el medio, es importante señalar que en la presente invención el medio microbiológico enriquecido para la síntesis de vaterita contiene **peptona de caseína**, esto es diferente de la fuente de proteínas y aminoácidos usados en el documento D1 el cual contiene **peptona de carne**. En este sentido, si bien es cierto que la peptona de carne y la peptona de caseína son dos tipos de productos utilizados en microbiología y biotecnología con propósitos similares, también es cierto que se derivan de fuentes diferentes y tienen composiciones distintas.

A continuación, se describen las principales diferencias entre ambas.

Origen y composición: La **Peptona de carne** se obtiene a partir de la hidrólisis de tejidos musculares de animales, generalmente vacas o cerdos. La carne se somete a procesos de cocción y digestión enzimática para descomponer las proteínas en péptidos y aminoácidos. Como resultado, la peptona de carne contiene una mezcla de péptidos y aminoácidos derivados de las proteínas musculares.

Por su parte, la **Peptona de caseína** proviene de la hidrólisis de caseína, la principal proteína presente en la leche. La caseína se descompone mediante procesos enzimáticos o químicos para producir péptidos y aminoácidos. Por lo tanto, la peptona de caseína contiene una mezcla de péptidos y aminoácidos derivados de la caseína de la leche.

En vista de lo anterior, una persona medianamente versada en la materia, estaría más inclinada a continuar utilizando la peptona de carne en lugar de la peptona de caseína a la luz de lo enseñado en D1.

Composición: En relación con la composición de aminoácidos, la composición de aminoácidos en la peptona de carne y la peptona de caseína puede variar debido a las diferencias en las proteínas de origen. Por ejemplo, la peptona de carne puede contener una mayor proporción de aminoácidos presentes en las proteínas musculares, como la creatina, la taurina y la carnosina, mientras que la peptona de caseína no contiene dichas sustancias y puede tener una composición más rica en aminoácidos característicos de la caseína, como la glutamina y la prolina. Por lo que, una persona

medianamente versada en la materia estaría más motivada a incluir la peptona de carne que en teoría aportaría otra clase de aminoácidos diferentes a aquellos presentes en la peptona de caseína.

Aplicaciones: Ambos tipos de peptona se utilizan como fuente de nutrientes en medios de cultivo microbiológicos y en la producción de medios de cultivo para el crecimiento de microorganismos en laboratorios y en la industria. Proporcionan aminoácidos esenciales y péptidos que son necesarios para el crecimiento y la proliferación celular.

Sin embargo, una persona medianamente versada en la materia consideraría más la peptona de carne como lo enseña D1, toda vez que puede ser una fuente de nutrientes más compleja al poseer componentes específicos presentes en la carne, como, por ejemplo, en la investigación de bacterias que colonizan tejidos animales.

Por su parte, en la presente invención, se encontró que la peptona de caseína al ser una fuente de nutrientes no afecta el cultivo de microorganismos que podrían verse afectados por sustancias presentes en la carne.

Por lo tanto, aunque tanto la peptona de carne como la peptona de caseína son productos utilizados en microbiología y biotecnología como fuentes de nutrientes para el crecimiento microbiano, difieren en su origen, composición de aminoácidos y aplicaciones específicas, por lo que, una persona medianamente versada en la materia no encontraría evidente reemplazar la peptona de carne por peptona de caseína, toda vez que la elección entre una u otra depende de las necesidades y las características particulares de la aplicación en cuestión.

c. Concentración de colonias (UFC/ml)

En microbiología, las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) y las células por mililitro (células/ml) son dos medidas comunes que se utilizan para cuantificar la concentración de microorganismos en una muestra. Aunque ambas unidades se refieren a la cantidad de microorganismos presentes, hay una diferencia fundamental en la forma en que se cuantifican:

Unidades Formadoras de Colonias por Mililitro (UFC/ml): Las UFC/ml se utilizan para cuantificar la cantidad de microorganismos viables presentes en una muestra. La técnica para determinar las UFC/ml implica diluir la muestra en serie y sembrar una cantidad conocida de cada dilución en placas de cultivo adecuadas. Después de un

período de incubación, se cuentan las colonias formadas en las placas y se seleccionan aquellas que contienen entre 30 y 300 colonias, ya que se considera que estas cifras proporcionan una estimación precisa del número de UFC presentes en la muestra original. Las UFC/ml representan el número de microorganismos viables capaces de formar colonias en medios de cultivo específicos después de un período de incubación.

Células por Mililitro (Células/ml): Las células por mililitro, que es el conteo utilizado en la presente invención, se refieren a la cantidad total de células microbianas presentes en una muestra, independientemente de si están vivas o muertas.

La cuantificación de células por mililitro se puede realizar mediante diferentes técnicas, como el recuento directo en cámara de Neubauer bajo microscopio, la citometría de flujo o la técnica de PCR cuantitativa (qPCR), entre otras.

Las células por mililitro representan tanto las células vivas como las muertas presentes en una muestra y proporcionan una medida total de la densidad celular.

En resumen, la diferencia entre UFC/ml y células/ml radica en el enfoque de cuantificación: las UFC/ml se centran en los microorganismos viables capaces de formar colonias en condiciones de cultivo específicas, mientras que las células/ml incluyen tanto las células vivas como las muertas presentes en una muestra, sin distinción entre ellas. Ambas medidas son importantes en microbiología y se utilizan según el propósito del análisis y la información requerida sobre la población microbiana en cuestión.

En el presente caso, al ser la cuantificación de los microorganismos mediante célula/ml en la presente invención, se asegura que se hace dicha cuantificación tanto de células vivas como muertas sin su distinción, y que permite hacer un aporte en la producción o génesis de vaterita ya que los componentes de sus cuerpos bacterianos resultan ser agentes nucleantes, con lo cual se obtiene un mayor rendimiento de producción de vaterita de acuerdo con la presente invención, hecho que no habría sido evidente para una persona medianamente versada en la materia. De hecho, después de la muerte celular los componentes celulares y sus componentes proteínicos tienen una carga negativa la cual finalmente termina atrayendo los cationes de calcio para formar los hábitos característicos de la vaterita cristalina más estable.

d. Microorganismos utilizados

En la presente invención no hay dependencia por un único microorganismo, se ha probado alrededor de 12 microorganismos con capacidades metabólicas diferentes tanto ureolíticas como no ureolíticas, señalándose entre las bacterias con mejor desempeño y capacidad de biosíntesis del biomineral vaterita, lo que devela un factor diferencial inventivo frente al documento D1 el cual hace referencia al uso específico de *Bacillus subtilis* el cual muestra rendimientos más bajos con relación a (*B. lentus* y *B. pasteurii*) bacterias empleadas en la presente invención. Adicionalmente, es importante resaltar que estas dos bacterias tienen un metabolismo positivo para degradar la urea lo que genera un entorno más propicio para la precipitación de la vaterita, en contraste con *Bacillus subtilis* que es metabólicamente inactivo o no tiene la capacidad de metabolizar la urea. Por lo tanto, una persona versada en la materia estaría motivada a emplear microorganismos ureasa negativos como *Bacillus subtilis* para producir carbonatos de calcio más estables tales como la calcita y aragonito. La tabla a continuación muestra algunas de las bacterias más estudiadas en relación con la precipitación de carbonato de calcio en forma de calcita y vaterita. Sin embargo, se solicita tener en cuenta que la capacidad de precipitar estos minerales puede variar según la cepa bacteriana específica y las condiciones del entorno.

Bacteria	Tipo de Carbonato Precipitado	Referencias¹
<i>Bacillus cereus</i>	Vaterita y Calcita	[1], [2]
<i>Bacillus subtilis</i>	Vaterita y Calcita	[3], [4]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Vaterita	[5], [6]
<i>Bacillus pasteurii</i>	Calcita	[7], [8]
<i>Sporosarcina pasteurii</i>	Calcita	[9], [10]

¹ [1] Braissant, O., et al. (2003). Bacterially induced mineralization of calcium carbonate in terrestrial environments: The role of exopolysaccharides and amino acids. *Journal of Sedimentary Research*, 73(3), 485-490.

[2] Sondi, I., & Salopek-Sondi, B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275(1), 177-182.

[3] Rodríguez-Navarro, et al. (2012). Influence of substrate mineralogy on bacterial mineralization of calcium carbonate: implications for stone conservation. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(11), 4017-4029.

[4] Ghosh, S., Osypka, M., Grass, G., & Tiller, J. C. (2006). Bacterial patterning controlled by light exposure. *Langmuir*, 22(19), 8144-8148.

[5] Ivanova, E. P., Mitik-Dineva, N., Wang, J., Pham, D. K., & Wright, J. P. (2010). Bacterial extracellular polysaccharides. In *Microbial Glycobiology* (pp. 1-30). Academic Press.

[6] Rodríguez-Navarro, C., & Rodríguez-Gallego, M. (2006). Microbial biomineralization and biomineral coatings. *Mineralogical Magazine*, 70(5), 763-766.

En este sentido, se dirige la atención del señor examinador a la tabla 4 incluida en la descripción de la presente solicitud, la cual se reproduce a continuación.

Bacteria	Rendimiento
<i>Bacillus lentus</i>	1397.5 mg/100ml
<i>Sporosarcina pastuerii</i>	1388.5mg/100ml
<i>Bacillus subtilis</i>	901 mg/100ml
<i>Bacillus pumilus</i>	1028.5 mg/ml

Estos resultados demuestran que los microorganismos tales como *Bacillus lentus*, *Sporosarcina pasteurii* y *Bacillus pumilus* obtienen mejores resultados en la producción de vaterita grado farmacéutico en comparación con los resultados obtenidos para *Bacillus subtilis* que es un microorganismo más común y utilizado para biorremediación de ambientes o efluentes de minas de extracción de metales. Por lo tanto, estos resultados tampoco habrían sido evidentes para una persona medianamente versada en la técnica a partir de lo enseñado en D1 que solo hace referencia a *Bacillus subtilis* para la producción de vaterita con fines de captura o secuestro de metales pesados y para la mejora de las propiedades mecánicas de los suelos.

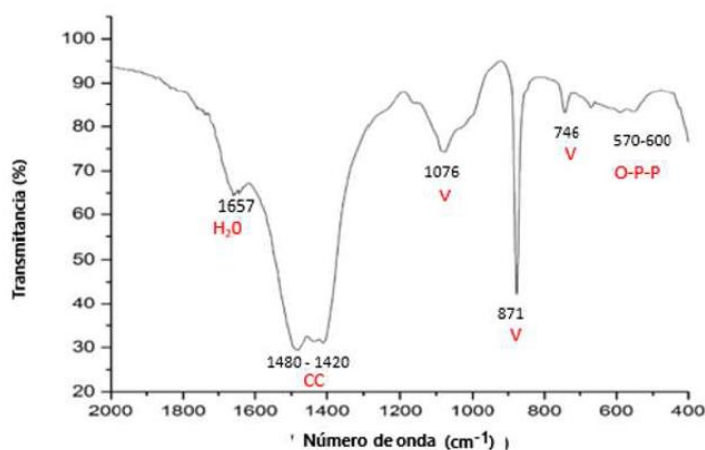
Adicionalmente, es importante señalar que en la presente solicitud de patente la vaterita biosintetizada no está pretendida para atrapar metales como Cd(II), Pb(II), Ni(II) y Cu(II). La vaterita como biomineral está enfocado al uso y aplicaciones farmacéuticas, especialmente como agente encapsulante o Carrier de metabolitos o principios activos y se ajusta además a la norma farmacopea oficial de los Estados Unidos, (USP 2024) (United States Pharmacopeia, describe los estándares de calidad para los productos farmacéuticos), lo cual es difiere con el propósito del documento D1 que sintetiza vaterita como un método de biorremediación para la adsorción o captura de metales pesados como Cd(II), Pb(II), Ni(II) y Cu(II) a través de bioesferas de vermiculita que comprenden vaterita que tiene características de laminación porosa inducidas por el *Bacillus subtilis*, como se establece en el documento D1.

Por lo tanto, de acuerdo con los argumentos anteriores, una persona normalmente versada en la materia no estaría motivada para variar los componentes ni las proporciones del medio de cultivo en el proceso de D1 para llegar de manera evidente al proceso ahora reclamado en la nueva reivindicación 1 y por ende dicha reivindicación 1 y sus dependientes cumplen a cabalidad con el requisito de nivel inventivo.

6.2. Producto reivindicado

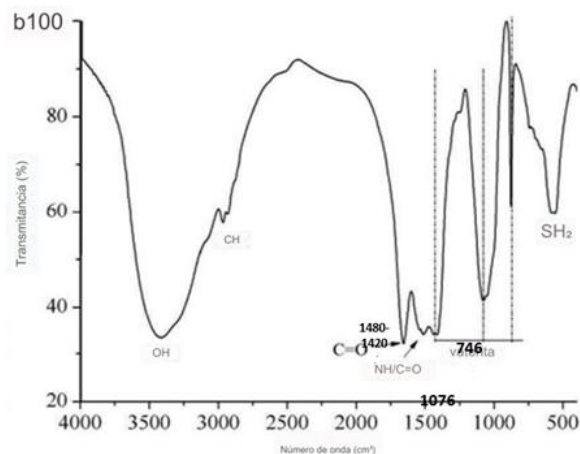
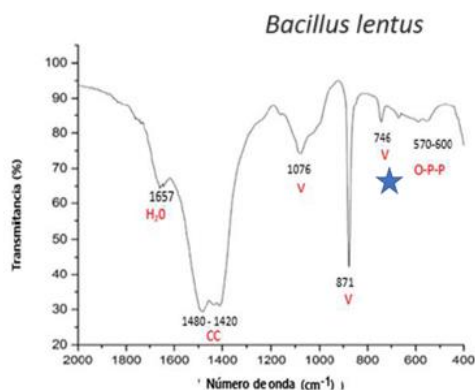
En relación con el producto obtenido por el proceso de la presente solicitud de patente, y como ya se ha mencionado, al ser un producto biotecnológico, no es posible definirlo por sus características técnicas esenciales como componentes y proporciones tal como lo solicita el examinador, por lo que se ha hecho necesario caracterizarlo por sus bandas de difracción de rayos X y FTIR que muestran las bandas características del producto obtenido, en donde se puede apreciar que sus picos son más definidos lo cual está relacionado con la pureza y alta cristalinidad del producto obtenido (vaterita) mediante el presente proceso biotecnológico.

Por ejemplo, para el caso de vaterita producida por *Bacillus lentus*, el microorganismo que se resalta en la presente solicitud de patente revela el siguiente espectro:



Se puede apreciar las bandas características de la vaterita muy bien definidas, en comparación con las bandas obtenidas para el producto del documento D1. Por lo tanto, el producto obtenido mediante el proceso reclamado en la presente solicitud de patente también cumple con el requisito de nivel inventivo, al ser un producto con alta cristalinidad que se puede observar en el espectro en los picos más definidos con alturas y anchos también más definidos, típicos de una vaterita más cristalina.

A continuación, se presenta una comparación de los espectros del arte previo y la presente solicitud, con los cuales se logra demostrar que el producto obtenido mediante el proceso de la presente invención también cumple con el requisito de nivel inventivo.

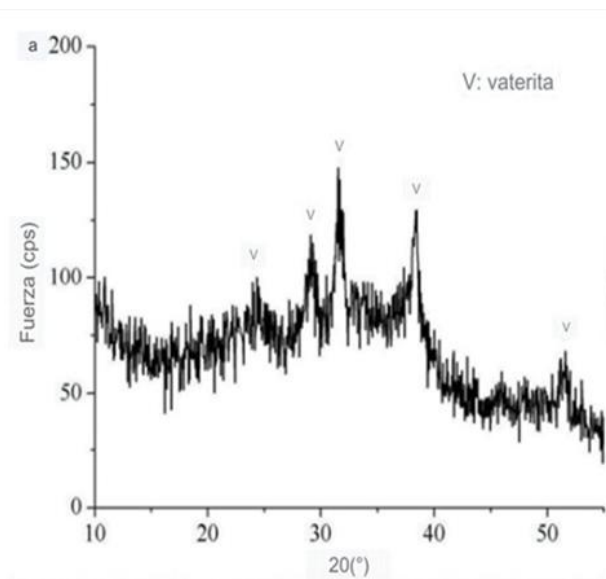
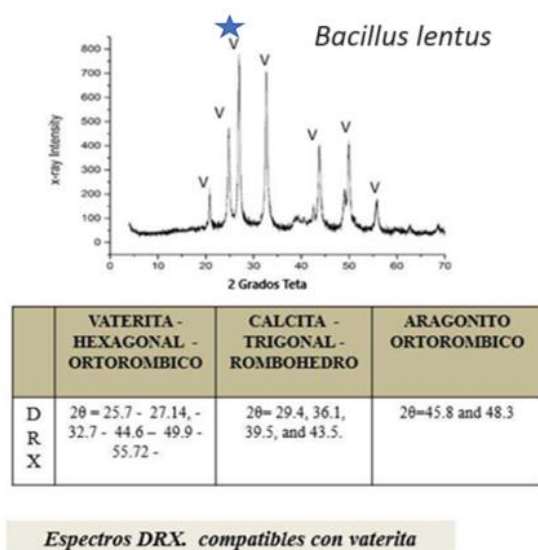


Presente Solicitud

D1

En el presente caso, ambos espectros revelan la presencia e integridad de la vaterita, lo que se ve reflejado en la permanencia de bandas de absorción típicas (746 cm⁻¹; 871 cm⁻¹ y 1076 cm⁻¹) correspondientes al polimorfo vaterita. Otras bandas con baja cristalinidad que continúan son las correspondientes al carbonato de calcio amorfo ACC, estas se evidencian debido a la división de las bandas de absorción entre 1420 cm⁻¹ y 1480 cm⁻¹, resultados que concuerdan con los estudios realizados por Shen et al., 2006; Rodríguez et al., 2011; Xu et al., 2013. Del mismo modo se mantienen las bandas de absorción entre 1076-1085 cm⁻¹, según Brangule & Gross (2015). Además, en la presente invención es posible observar la persistencia de bandas asociadas a fosfatos PO₄-3, entre 570 cm⁻¹ - 600 cm⁻¹ (Según Andersen & Brecevic, 1991; Rodríguez et al., 2011. Ver Figura 19 y 20).

En el espectro de difracción de rayos X (DRX) de D1, se puede apreciar la forma cristalina de carbonato de calcio tipo vaterita, a través de picos característicos en función del ángulo de difracción 2θ para este tipo de polimorfo muy bien definidos, en comparación con las bandas obtenidas para el producto del documento D1. Por lo tanto, el producto obtenido mediante el proceso reclamado en la presente invención, también cumple con el requisito de nivel inventivo. en 2θ = 25.7, 27.14, 32.7, 44.6, 49.9, 55,72



Presente solicitud

D1

Por su parte, en el espectro de difracción de rayos X (DRX) de la vaterita, una forma cristalina del carbonato de calcio, se observan varios picos característicos en función del ángulo de difracción (2θ). Estos picos representan la dispersión de los rayos X por los átomos en la estructura cristalina de la vaterita. Aquí tienes una descripción general de los picos predominantes que se pueden encontrar en un espectro de DRX para la vaterita, expresados en bandas en 2θ :

- 1. Pico principal (2θ alrededor de 29°):** El pico principal en el espectro de DRX de la vaterita se encuentra aproximadamente alrededor de 29° en el eje 2θ . Este pico es el más destacado y representa la orientación cristalográfica predominante en la muestra de vaterita.
- 2. Picos secundarios (2θ alrededor de 18° y 47°):** Además del pico principal, es común observar picos secundarios en alrededor de 18° y 47° en el espectro de DRX de la vaterita. Estos picos corresponden a otras orientaciones cristalográficas presentes en la muestra.
- 3. Otros picos menos intensos:** Además de los picos principales y secundarios, puede haber otros picos menos intensos en el espectro de DRX de la vaterita, que representan otras orientaciones cristalográficas menos comunes o fases cristalinas relacionadas.

Es importante tener en cuenta que la posición exacta y la intensidad de los picos en el espectro de DRX pueden variar dependiendo de la pureza, la cristalinidad y la orientación cristalográfica de la muestra de vaterita. Estos picos característicos son útiles para identificar y caracterizar la vaterita en muestras de materiales.

Por lo tanto, de acuerdo con los argumentos anteriores, es evidente las diferencias entre los productos de D1 y la presente invención, así como las ventajas técnicas del producto reclamado, por lo que el mismo cumple a cabalidad con el requisito de nivel inventivo.

De esta forma, teniendo en cuenta que el documento D1 **no menciona, describe o sugiere**, en forma individual o en combinación, todas las características técnicas reclamadas en el nuevo capítulo reivindicatorio presentado por el solicitante, **las nuevas reivindicaciones presentadas son novedosas, e inventivas sobre el estado del arte.**

7. Conclusión

Con los argumentos presentados puede concluirse que:

- i) La presente solicitud es clara, concisa y está debidamente soportada en la descripción, cumpliendo con los requerimientos del Artículo 30, 34 y 28 de la Decisión 486;
- ii) La presente solicitud comparte un concepto común inventivo, dando cumplimiento con los requerimientos del Artículo 25 de la Decisión 486.
- iii) Las reivindicaciones actuales son patentables sobre D1 solo o en combinación, cumpliendo así con los requerimientos de los Artículos 14, 16 y 18 de la Decisión 486.

Por tanto, atentamente me permito solicitar a ese Despacho otorgar el privilegio de patente solicitado a la solicitud en estudio, toda vez que cumple a cabalidad con los requerimientos de la Decisión 486/00.

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.

8. Anexos

- Nuevo capítulo reivindicatorio conformado por siete (7) reivindicaciones.
- Comprobante de pago por concepto de la modificación al pliego reivindicatorio.

Señora Directora,


CAROLINA DAZA MONTALVO
C.C. 66.783.790 de Palmira Valle
TP-141563 CSJ
notificaciones@clarkemodet.com.co

REIVINDICACIONES MODIFICADAS

- 1.** Un proceso de producción de carbonato de calcio tipo vaterita estable, caracterizado porque comprende los siguientes pasos:
 - a)** Reactivación de cepas bacterianas seleccionadas del grupo que consiste de *S. ureae*, *S. Pasteuri*, *B. megaterium*, *B. holondurans*, *B. pseydifurnysm*, *Bcohnii*, *B. lentus*, *B. subtilis*, *B. pumilis*, *Lysinibacillus sphaericus*, y *corynebacterium amoniogenes* con capacidad de bioprecipitación de carbonato de calcio, en un medio de reactivación que comprende peptona de soya o de caseína 0.5%, extracto de carne 0.3%, agar 1.5%, NaCl 0.5%, y suplementado por urea 2%,
 - b)** Preparación de un medio de cultivo líquido B21LM para la síntesis de vaterita en donde el medio de cultivo líquido B21LM comprende NaCl entre 0.1% a 1.0% por cada 100 ml de volumen del medio, extracto de levadura entre 0.1% a 1.0% por cada 100 ml del medio; peptona de caseína entre 0.5% y 2% por cada 100 ml de volumen del medio 1% y acetato de calcio entre 0.25% y 10% por cada 100 ml de volumen del medio,
 - c)** Adición de 10^8 células/ml de las cepas bacterianas reactivadas en el paso a) en el medio de cultivo líquido B21LM preparado en el paso b),
 - d)** Monitoreo de la formación de vaterita estable mediante la evaluación de la cantidad de bioprecipitados de carbonato de calcio generado cada 3 días por un periodo de 15 o 21 días mediante la centrifugación de las muestras por un periodo de 5 a 15 minutos y a temperatura entre 20°C y 30°C,
 - e)** Separación y recolección de bioprecipitados de carbonato de calcio tipo vaterita en los días 15 y 21 en donde las partículas de carbonato de calcio tipo vaterita se enjuagan por triplicado con agua destilada y se someten a centrifugación entre 5 a 15 minutos y a temperatura entre 20°C y 30°C y retirar el sobrenadante de los precipitados y secar a temperatura ambiente o a temperaturas que no excedan los 100°C en horno convencional y

- f)** Caracterización mineralógica de bioprecipitados de carbonato de calcio tipo vaterita mediante espectroscopia de infrarrojo, microscopia electrónica de barrido con analizador de rayos X por energía dispersiva y difracción de rayos X.
- 2.** El proceso de producción de carbonato de calcio tipo vaterita estable de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la etapa e) de separación y recolección de bioprecipitados de carbonato de calcio tipo vaterita la centrifugación se realiza entre 1.000 y 3.000 rpm por un periodo de 5 a 15 minutos, retirando el sobrenadante y secando el precipitado.
- 3.** El proceso de producción de carbonato de calcio tipo vaterita estable de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque en la etapa b) el medio de cultivo líquido B21LM comprende desde 0.3% a 0.8% de NaCl por cada 100 ml de volumen del medio, extracto de levadura desde 0.2% a 0.8% por cada 100 ml de volumen del medio, peptona de caseína entre 0.8% y 1.5% por cada 100 ml de volumen del medio y como fuente de calcio acetato de calcio en un rango desde 3.0% hasta 10% por cada 100 ml de volumen del medio.
- 4.** El proceso de producción de carbonato de calcio tipo vaterita estable de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque en la etapa c) se agrega al medio preparado en el paso b), 10% el volumen de inóculo de la cepa bacteriana con capacidad de bioprecipitación de carbonato de calcio reactivada a una concentración de 10^8 cell/ml y a una temperatura que oscila entre 25°C y 35°C y una agitación entre 100 rpm y 250 rpm.
- 5.** El proceso de producción de carbonato de calcio tipo vaterita estable de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la etapa e) de separación y recolección de bioprecipitados de carbonato de calcio tipo vaterita la centrifugación se realiza entre 1.000 y 3.000 rpm por un periodo de 5 a 15 minutos, retirando el sobrenadante y secando el precipitado.

- 6.** El proceso de producción de carbonato de calcio tipo vaterita estable de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el paso a) se lleva a cabo con *B. lentus*.

- 7.** El producto carbonato de calcio tipo vaterita caracterizado porque dicho producto tiene un espectro de difracción de rayos X con bandas en $2\theta = 25.7$, 27.14 , 32.7 , 44.6 , 49.9 y 55.72 y un espectro FTIR con bandas características de 745 cm^{-1} , 875 cm^{-1} y 1070 cm^{-1} y en donde las partículas de dicho producto tienen un hábito esférico y tamaños de partícula desde 0.8 a 1.09 micras.



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT: 800.176.089-2

COMPROBANTE DE RECAUDO SISTEMA SIPI

Radicado: NC2021/0005878
Recibo: 24-21885
Fecha: 22/03/2024

CAROLINA MERCEDES DAZA MONTALVO
CC: 66.783.790
Pago PSE No: 945992
CUS: 530652659

Patente de Invención Nacional
PROCESO Y MEDIO LÍQUIDO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE VATERITA

Detalle del pago

Id.	Rentístico	Concepto y Servicio	Cant.	Val. Unit.	Subtotal
1	50005-01-03	Modificaciones / Correcciones al registro Patente PCT (DESCUENTO INTERNET)	1	\$ 215,000	\$ 215,000
TOTAL					\$ 215,000