

G. HOLLMANN RESTREPO
ABOGADOS LTDA.

11084

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO
Radicación : 000300/03 000000000
Fecha (HMD): 2004-08-12 16:30:00
Tramite : HMD PATENTADO U
Referencia: 0000 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Re: **Expediente No. 00 052026**

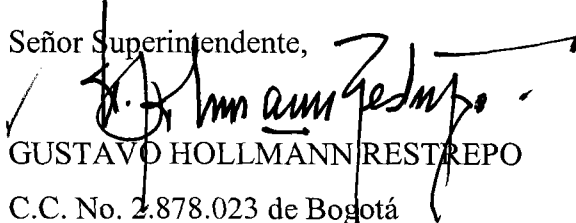
Solicitud de patente referente a: "PROCEDIMIENTO PARA LA
PREPARACIÓN DE L-AMINOACIDOS A PARTIR DE SUS DERIVADOS
DE N-ACETIL-D,L RACEMICOS MEDIANTE DISOCIACIÓN
ENZIMATICA DE RACEMATOS POR MEDIO DE ENZIMAS
RECOMBINANTES AISLADAS".

Titular: Aventis CropScience GmbH.

Yo, GUSTAVO HOLLMANN RESTREPO, vecino de Bogotá D.C., portador de la tarjeta profesional No. 5903, obrando como apoderado en este negocio, digo a usted lo siguiente:

1. Que la solicitud de patente de la referencia fue publicada en la Gaceta de Propiedad Industrial No. 531 de 29 de agosto de 2003.
2. Que estando dentro del término de seis (6) meses a que hace referencia el artículo 44 de la Decisión 486 solicito que se examine si la invención solicitada es patentable.
3. Acompaño el recibo No. 10,873, por la suma de \$353.000.00, correspondientes a las tasas para la práctica del examen de patentabilidad.

Señor Superintendente,


GUSTAVO HOLLMANN RESTREPO

C.C. No. 2.878.023 de Bogotá

T.P. No. 5903

mm.

2
8

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 00052026 00000002 Folios: 2
Fecha (AMD): 2004-02-12 16:55:53
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 538 PETICION
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 04 - 10,973
FECHA : FEBRERO 11 DE 2004

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
GUSTAVO HOLLMAN	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	10494336	11/02/2004	8,169,000.00
GUSTAVO HOLLMAN	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	10494338	11/02/2004	890,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	85 EXAMEN DE PATENTABILIDAD DE INVEN	353,000.00
		TOTAL :	\$ 353,000.00

SON: TRESCIENTOS CINCUENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RADICACIÓN EXPEDIENTE No. **00-52026**

EL EXTRACTO DE LA PRESENTE SOLICITUD DE **PATENTE DE INVENCION** FUE PUBLICADO

EN LA GACETA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL No **531**, DE FECHA **29 DE AGOSTO DE 2003**,

EL TERMINO HABIL SEÑALADO POR LA LEY EXPIRA EL **26 DE NOVIEMBRE DE 2003**.

NOTA: Dentro del plazo de los seis (6) meses siguientes a partir de la fecha de publicación en la gaceta de Propiedad Industrial, deberá solicitar y cancelar el examen de patentabilidad so pena de que la solicitud caiga en abandono, de acuerdo con lo establecido en el Artículo 44 de la Decisión 486/2000.

SE PRESENTARON OPOSICIONES POR PARTE DE TERCEROS.

SI _____

NO **X** _____

68
60
1

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES**

2020
Bogotá, D.C.,

Doctor
GUSTAVO HOLLMANN RESTREPO
(Apoderado)
AVENTIS CROPSCIENCE

ASUNTO

Radicación 00-52026
Trámite 002
Evento 001
Actuación 430
Oficio " 6874
Folios

375
2005-08-11

Como resultado del examen de fondo, realizado con fundamento en el artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica:

Documentos estudiados:

Los textos estudiados fueron la descripción (Folios: 24 a 38) y las reivindicaciones 1 a 14 (folios: 39 a 41).

La presente solicitud reivindica prioridad alemana N° 199362.9 de 20 de julio de 1999 y cumple con lo establecido en los artículos 9, 10 y 11 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

Objeto de invención:

El objeto de la presente solicitud se refiere a un procedimiento para la producción de L-Aminoácidos a partir de la mezcla racémica de los acilderivados D,L. El procedimiento se caracteriza por el uso de hipurato hidrolasas recombinantes aisladas, que deacilan selectivamente los N-acetil-L- derivados para generar L-aminoácidos. Adicionalmente, el procedimiento comprende la separación preparativa de los L-aminoácidos obtenidos, de los N-acetil-D derivados que no son deacilados y del exceso de N-acetil-L- derivados que no alcanzan a reaccionar.

El objeto de la solicitud definido anteriormente se clasificó en la IPC C12P41/00, C12N15/55, C12N9/80, C12P13/04.

Reivindicaciones de uso:

El artículo 14 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina establece: "Los Países Miembros otorgarán patentes para las invenciones, sean de producto o procedimiento, en todos los campos de la tecnología, siempre que sean nuevas, tengan nivel inventivo y sean susceptibles de aplicación industrial".

Las reivindicaciones 11 a 14 reclaman el uso de una o varias hipurato hidrolasas,

6A
61

para la producción enantio-selectiva de uno o varios L-aminoácidos. Siendo que la Decisión 486 contempla el otorgamiento de patentes para invenciones de producto y procedimiento, más no de uso, las reivindicaciones 11 a 14 no se encuentran dentro del campo de la patentabilidad nombrado en el artículo 14.

Determinación del estado de la técnica:

El artículo 16 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina establece que "El estado de la técnica comprenderá todo lo que haya sido accesible al público por una descripción escrita u oral, utilización, comercialización o cualquier otro medio antes de la fecha de presentación de la solicitud de Patente o, en su caso, de la prioridad reconocida.

Sólo para el efecto de la determinación de la novedad, también se considerará dentro del estado de la técnica, el contenido de una solicitud de patente en trámite ante la oficina nacional competente, cuya fecha de presentación o de prioridad fuese anterior a la fecha de presentación o de prioridad de la solicitud de patente que se estuviese examinando, siempre que dicho contenido esté incluido en la solicitud de fecha anterior cuando ella se publique o hubiese transcurrido el plazo previsto en el artículo 40".

Considerando que la fecha de presentación de la primera solicitud de patente de la cual se reivindica prioridad es: 20 de julio de 1999, se buscaron documentos del estado de la técnica relacionados, con fecha de publicación anterior a esta.

Se hizo la búsqueda de documentos relevantes en el estado de la técnica, entendiendo como estado de la técnica la definición provista en el artículo 16 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina y las excepciones fijadas en el artículo 17 de la misma.

Se encontró como anterioridades (documentos cuya fecha de publicación es anterior a la fecha de presentación de la primera solicitud de patente sobre la cual se reivindica prioridad o de la fecha de presentación de esta solicitud) que pueden afectar la patentabilidad del objeto de la presente solicitud:

Nº	Documento	Título	Fecha de Publicación
1	DE4308061	Neue Aminosäure-deacetylase mit Spezifität für L-N-Acetylphosphinotricin, ihre Herstellung und Verwendung.	1994-09-15
2	WO9827201	Novel Genes Coding For Aminoacid Deacetylases With Specificity For N-Acetyl-L-Phosphinothricin, Their Isolation And Their Use.	1998-06-25
3	EP 0358428	Process for producing optically active compounds.	1990-03-14
4	GB2031896	A Process For The Optical Resolution Of D,L-2-Amino-4-Methylphosphinobutyric Acid (L-MPGA)	1980-04-30

Evaluación de los requisitos de Patentabilidad:

El Artículo 14 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina el cual establece: "Los Países Miembros otorgarán Patentes para las invenciones, sean de producto o de procedimiento en todos los campos de la tecnología siempre que sean nuevas, tengan nivel inventivo y sean susceptibles de aplicación industrial".

Se procedió a evaluar los requisitos de novedad, nivel inventivo y aplicación industrial con el fin de establecer la patentabilidad de la invención reivindicada en la solicitud en estudio.

Evaluación de Nivel Inventivo:

El artículo 18 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina establece que "Se considerará 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 Nivel Inventivo se evaluó por comparación entre lo solicitado y encontrado en el estado de la técnica y que se relaciona con el objeto reivindicado y de acuerdo con la definición de nivel inventivo del Artículo 18 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

La reivindicación 1 reclama un procedimiento para la producción de L-aminoácidos a partir de N-acetil D,L-derivados. El procedimiento que está caracterizado por el uso de hipurato hidrolasas recombinantes aisladas, que de-acetilan selectivamente los N-acetil L-derivados para formar L-aminoácidos, con la posterior separación de dichos L-aminoácidos de los N-acetil D-derivados, no de-acetilados y de los N-acetil L-derivados, incompletamente de-acetilados.

El documento (WO98 27201) de ahora en adelante identificada como D2, revela la obtención de N-acetil-fosfinotricin-deacetilasa a partir de *Stenothrophomonas* sp. y *Comamonas acidovorans*. Aún cuando la reivindicación 1 de la presente solicitud introduzca el término "recombinante" para referirse a las hipurato hidrolasas, no las hace diferentes que aquellas divulgadas en D2, dado que el proceso de obtención de la enzima bien sea aislamiento o producción recombinante, no modifica la identidad de la enzima ni su actividad. Así las cosas se establece que las enzimas empleadas en la presente solicitud ya habían sido divulgadas en la anterioridad D2. Adicionalmente en el mismo documento se describe la especificidad de la enzima por los enantiómeros L. Así que, resulta evidente para un técnico en la materia, que dicha enzima en mezclas racémicas cataliza únicamente la de-acetilación de la forma L.

El Documento (GB 2031 896) de ahora en adelante D4 revela un procedimiento para la resolución de una mezcla racémica de un N-acil derivado de D,L-MPGA empleando una de-acilasa estéreo específica de origen microbiano, la cual tiene una actividad hidrolítica específica ópticamente, que elimina específicamente el grupo acil del N-acil-L-MPGA para dar una mezcla de L-MPGA y N-acil-D-MPGA, y la posterior separación de L-MPGA de la mezcla. La separación del producto L-MPGA del sustrato N-acil-D,L-MPGA, se efectúa a través de cromatografía de intercambio iónico hasta alcanzar una pureza del 90%. Este grado de pureza alcanzado en el producto a pesar de no emplear en la separación una columna con material con estereoespecificidad, enseña a la persona versada en la técnica que mediante las resinas de intercambio iónico se logra una separación eficiente del L-aminoácido del

86
63
✓

derivado N- acil-D MPGA que no reacciona y del exceso de N- acil-L MPGA.

Teniendo en cuenta que la especificidad enantiomérica de las N-acetil- fosfinotricin- acetilasas provenientes de *Stenothrophomonas* sp. y *Comamonas acidovorans* ya era conocida, la respuesta al problema técnico que se pretendía resolver, que era proveer un proceso para la obtención de L-aminoácidos a partir de las mezclas racémicas de derivados N-acetil -L-D-aminoácidos, resulta obvio para una persona medianamente versada en la materia, quien simplemente podría partir de la enzimas divulgadas en D2, y emplearlas en el procedimiento ya descrito en D4, para efectuar la resolución óptica de derivados acilados de D,L aminoácidos.

Cabe mencionar que en la práctica normal de investigación los procedimientos de separación empleando cromatografía de intercambio iónico son comúnmente empleados. Y por ende, el proceso de separación usado en la solicitud en estudio no constituye un aporte significativo al estado de la técnica, más aún cuando existía evidencia que habían sido utilizados en D4 con el mismo propósito con el que se usaron en la presente invención.

La reivindicación 8 de la solicitud en estudio contempla la inmovilización de las desacetilasas. En el ejemplo 6 y en la reivindicación 13 del documento D4, se describe la inmovilización de la enzima sobre DEAE*Sephacel-gel y la deacetilación de N-Acetil-D,L-MPGA con dicha enzima inmovilizada. Como se observa, el objeto de esta solicitud podría resultar obvio para una persona del oficio normalmente versada en la materia y derivarse de manera evidente del estado de la técnica.

Las condiciones de reacción del presente procedimiento (temperaturas y concentraciones de sustrato, reiv. 9-10) no se diferencian significativamente de lo divulgado en el estado de la técnica (Documentos D1-D4); por esta razón, no se puede esperar un efecto sorprendente a partir de las condiciones del procedimiento reclamado respecto a lo previamente divulgado en el estado de la técnica.

Así las cosas, un técnico versado en la materia podría llegar sin ningún nivel inventivo a la solución propuesta en la presente solicitud. Por ende se considera que la invención la presente invención (reivindicaciones 1 a 14) es obvia y se deriva evidentemente del estado de la técnica.

Evaluación de la Aplicación Industrial:

El artículo 19 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina establece que "Se considerará que una invención es susceptible de aplicación industrial, cuando su objeto pueda ser producido o utilizado en cualquier tipo de industria, entendiéndose por industria la referida a cualquier actividad productiva, incluidos los servicios".

El objeto de la presente solicitud cumple con el requisito de Aplicación Industrial.

En conclusión los requisitos de patentabilidad de la presente solicitud se encuentran afectados así:

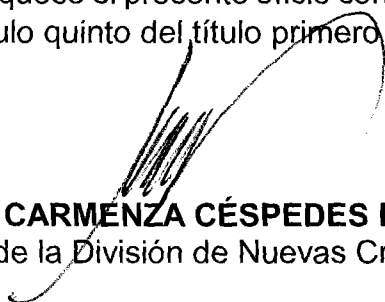
Nº	Documento	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
1	DE4308061	1-14	Nivel inventivo
2	WO9827201	9-10	Nivel inventivo
3	EP 0358428	9-10	Nivel inventivo
4	GB2031896	1-14	Nivel inventivo

64

5

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de sesenta días contados a partir de la fecha de la notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha 11 AGO. 2005

CONCEPTO TÉCNICO Nº: 1148	EXAMINADOR TÉCNICO Código Nº: 202063	EXAMINADOR JURÍDICO Código Nº: N.A.
------------------------------	---	--



D1
68
65

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 43 08 061 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁵:
C 12 N 9/10
C 12 N 1/20
// (C 12 N 9/10, C 12 R
1:01) C 12 R 1:38, 1:365
(C 12 N 1/20, C 12 R
1:01) C 12 R 1:38, 1:365

⑳ Aktenzeichen: P 43 08 061.8
㉔ Anmeldetag: 13. 3. 93
㉕ Offenlegungstag: 15. 9. 94

DE 43 08 061 A 1

㉗ Anmelder:
Hoechst AG, 65929 Frankfurt, DE

㉘ Erfinder:
Schulz, Arno, Dr., 65817 Eppstein, DE; Bartsch,
Klaus, Dr., 61449 Steinbach, DE

⑤4 Neue Aminosäure-Deacetylase mit Spezifität für L-N-Acetyl-Phosphinothricin, ihre Herstellung und Verwendung

DE 43 08 061 A 1

Das Konzept einer chemisch induzierbaren, reversiblen männlichen Sterilität bei Pflanzen durch antherenspezifische Expression einer L-N-Acetyl-Phosphinothricin (L-N-Ac-PPT) spezifischen Deacetylase wird in der Europäischen Patentanmeldung EP-A-0 191 736 beschrieben.

In der Anmeldungen EP-A-0 304 021 werden Mikroorganismen mit Aminosäure-Acylase-Aktivitäten genannt, die zur enantioselektiven Darstellung von L-Aminosäuren aus den entsprechenden D,L-N-Acetyl-Derivaten verwendet werden können. Es wurde kein Enzym identifiziert, das L-PPT aus L-N-Ac-PPT freisetzen kann. Von den in der Literatur beschriebenen Aminosäure-Acylasen ist keine Spezifität für nicht-proteino-

gene Aminosäuren bekannt. In der EP-A-0 358 428 wird ein Verfahren zur Herstellung von L-PPT mittels Bakterien der Gattung *Serratia*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Achromobacter* und *Alcaligenes* sowie *Actinoplanes*, *Streptosporangium* und *Sebekia* beschrieben. Bei diesem Verfahren wurden jedoch die Mikroorganismen oder deren Fermentationsbrühe eingesetzt.

Für die in der industriellen Herstellung erforderlichen Bedingungen ist es jedoch wesentlich vorteilhafter, ein gereinigtes Enzym einsetzen zu können.

Die vorliegende Anmeldung umfaßt eine neue L-N-Ac-PPT spezifische Deacetylase, ein neues und effektives Verfahren zur Reinigung und Charakterisierung dieses Enzyms aus einer Anreicherungskultur von Bodenmikroorganismen sowie die Verwendung dieser Deacetylase.

Die Erfindung betrifft somit:

1. Eine Deacetylase mit

- einem Molekulargewicht von 20 000 bis 100 000 Dalton
- einem pH Optimum von pH = 6,5-9,5
- einer Substratspezifität gegenüber L-N-Acetyl-Phosphinothricin.

2. Ein Verfahren zur Herstellung einer Deacetylase, das dadurch gekennzeichnet ist, daß ein nicht sporenbildender Mikroorganismus in Krabbenchitin enthaltenden Medium kultiviert wird, und die Deacetylase aus diesen Mikroorganismen isoliert wird.

3. Die Verwendung der unter 1. charakterisierten Deacetylase zur Herstellung männlich steriler Pflanzen sowie zur stereoselektiven Darstellung von L-Phosphinothricin.

Die Erfindung betrifft insbesondere ein Enzym, das ein Temperaturoptimum hat, das zwischen 30°C und 50°C liegt.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung der unter 1. charakterisierten Deacetylase, wird vorzugsweise mit Mikroorganismen durchgeführt, ausgewählt aus der Gruppe, welche aus *Variovorax paradoxus* (DSM-Hinterlegungsnummer 7470 vom 16.2.1993), *Pseudomonas diminuta* (ATCC 11568), *Nocardia globerula* (ATCC 19370), *Cellulomonas cartae* (ATCC 21681) und *Agrobacterium radiobacter* (ATCC 19358) besteht.

Krabbenchitin kann wie von Shimahara, Kenzo und Takiguchi, Yasuyuki beschrieben (Methods in Enzymology, Vol 161, Seiten 417-423, 1988) erhalten werden oder ist käuflich bei der Firma Sigma erhältlich. Die Mikroorganismen können als Reinkultur zur Reinigung der Deacetylase eingesetzt werden oder sie werden vorzugsweise gemeinsam kultiviert.

Zur Reinigung der Deacetylase wird der Mikroorganismus in einem für sein Wachstum optimalen Nährmedium kultiviert. Die Anzucht des Mikroorganismus erfolgt aerob, beispielsweise submers unter Schütteln oder Rühren in Schüttelkolben oder Fermentern, gegebenenfalls unter Einführung von Luft oder Sauerstoff. Die Fermentation kann in einem Temperaturbereich von etwa 20 bis 40°C, vorzugsweise bei etwa 25 bis 37°C, insbesondere bei 30 bis 37°C, erfolgen. Es wird in einem pH-Bereich zwischen 5 und 8,5, vorzugsweise zwischen 5,5 und 8,0, kultiviert.

Unter diesen Bedingungen zeigen die Mikroorganismen im allgemeinen nach 1 bis 3 Tagen eine nennenswerte Akkumulation des Enzyms. Die Synthese der Deacetylase beginnt in der log-Phase. Die Produktion des Enzyms kann mit Hilfe von Aktivitätstests durch HPLC-Analyse bzw. photometrisch verfolgt werden. Die zur Produktion der Transaminase verwendete Nährlösung enthält 0,2 bis 5%, bevorzugt 0,5 bis 2%, Krabbenchitin sowie anorganische Salze.

An anorganischen Salzen kann die Nährlösung beispielsweise Chloride, Carbonate, Sulfate oder Phosphate der Alkali- oder Erdalkalimetalle, Eisen, Zink und Mangan enthalten, aber auch Ammoniumsalze und Nitrate.

Die Isolierung und Reinigung des Enzyms kann nach klassischen Verfahren über Ammoniumsulfat-Fällung, Ionenaustauscher- und Gelpermeationschromatographie erfolgen.

Das Enzympräparat läßt sich charakterisieren durch ein Molekulargewicht von 20 000 bis 100 000 Dalton, bevorzugt 30 000 bis 80 000, insbesondere 40 000 bis 70 000 Dalton. Das pH-Optimum des Enzymprodukts liegt in dem pH-Bereich 6,0 bis 10,0, insbesondere 7,0 bis 8,0. Das Temperatur-Optimum des Enzyms liegt zwischen 30 und 50°C, insbesondere zwischen 35 und 45°C.

Erfindungsgemäß können wirksame Mengen der Deacetylase in freier oder immobilisierter Form zur Deacetylierung eingesetzt werden.

Das Enzym besitzt eine Substratspezifität für L-N-Acetyl-Phosphinothricin, kann aber auch andere Substrate, wie z. B. L-N-Acetyl-Glutamat, umsetzen.

Für die Fixierung kommen die bekannten Verfahren in Betracht, wie die in den Deutschen Offenlegungsschriften 32 37 341 und 32 43 591 beschriebenen Verfahren.

Die anschließenden Beispiele dienen dazu, die Erfindung weitergehend zu erläutern. Prozentangaben beziehen sich, wenn nicht anders angegeben, auf das Gewicht. Ferner wird die Erfindung in den Patentansprüchen

definiert.

1. Anzucht des Mikroorganismus

Eine Mischkultur der folgenden Mikroorganismen

1. *Variovorax paradoxus* (DSM 7470),
2. *Pseudomonas diminuta* (ATCC 11568),
3. *Nocardia globerula* (ATCC 19370),
4. *Cellulomonas cartae* (ATCC 21681) und
5. *Agrobacterium radiobacter* (ATCC 19358)

wurde zur Reinigung der Deacetylase eingesetzt. Diese Mischkultur wird im folgenden als K9 bezeichnet. K9 wurde unter Luftzufuhr bei 28°C bis zu Ende der log-Phase in folgendem Medium kultiviert:
10 g/l Krabbenchitin; 1 g/l Ammoniumsulfat; 0,5 g/l $MgSO_4$; 2,5 g/l K_2HPO_4 pH 7,2; 1 ml/l Standard-Spurenelemente-Lösung.

Diese Standard-Spurenelemente-Lösung enthält:

- 0,25 g/ml $FeSO_4$
0,05 g/ml H_3BO_3
0,1 g/ml $ZnSO_4$
0,1 g/ml $CaCl_2$
0,1 g/ml $MnSO_4$
0,1 g/ml Na_2MoO_4
0,1 g/ml $CuSO_4$

Die Mikroorganismen wurden durch Zentrifugation geerntet.

Die Isolierung und Reinigung des Enzyms kann nach klassischen Verfahren über Aufschluß durch Ultraschall und French-Press, Ammoniumsulfat-Fällung, Ionentauscher, Affinitätschromatographie und Gelpermeation erfolgen.

Nach tryptischer Verdauung der gereinigten Deacetylase konnte mittels Reversed-Phase-HPLC mehrere Peptide isoliert und deren partielle Aminosäuresequenz bestimmt werden:

1. Thr-Gln-Val-Pro-Ala-Ser-Pro-Xaa-Xaa-Thr-Xaa-Xaa-Xaa-Lys-Ala
2. Val-Pro-Val-Tyr-Glu-Met-Tyr-Pro-Tyr
3. Phe-Leu-Val-Thr-Met-Phe-Asn-Glu-Gly-Gln-Lys
4. Val-Met-Ala-Lys

Die Aminosäuresequenz zeigt keine Homologie zu bereits aus der Literatur bekannten Deacetylasen.

2. Kultivierung der Mikroorganismen

K 9 wurde wie in der Anmeldung EP-A 0 191 736 beschrieben gewonnen und in Chitinmedium (s. o.) bei 28°C für etwa 3 bis 4 Tage unter Luftzufuhr kultiviert. Die Deacetylase-Aktivität der Mikroorganismen erreichte nach 3 bis 4 Tagen Kulturdauer ein Maximum und nahm bei fortdauernder Kultur kontinuierlich wieder ab.

3. Isolierung der Deacetylase aus K 9

Die durch Zentrifugation geernteten Zellen von K 9 wurden in dem zweifachen Volumen, d. h. 2 ml/g Mikroorganismen, Puffer A (50 mM Phosphatpuffer pH 8,0; 5 mM Mercaptoethanol, 1 mM Phenylmethylsulfonylchlorid [PMSF]) suspendiert und durch Ultraschall (15 min.) und anschließende Passage durch eine "French Press" aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation entfernt und der klare Überstand durch Ammonsulfatfällung fraktioniert. Die gewünschte Deacetylaseaktivität fiel bei einer Sättigung der Lösung zwischen 35 und 60% Ammonsulfat und wurde durch Zentrifugation gewonnen und gegen Puffer-A dialysiert.

Das Dialysat wurde durch eine 0,25 µm Membran filtriert und über eine Anionentauscher-Säule mit quarternären Aminogruppen (Q-Sepharose HP, Pharmacia) gegeben. Das gewünschte Protein befand sich im Durchlauf der Säule und wurde über die Gelpermeationssäule (Superdex 200) in Puffer A, der 0,1 M KCl enthält, getrennt. Die aktiven Fraktionen wurden gegen 10 mM Tris, 5 mM Mercaptoethanol, pH 7,5 dialysiert, an eine Hydroxyapatit Säule (HTP Cartridge; BioRad) gebunden und mit einem Phosphat-Gradienten eluiert. Die aktiven Fraktionen wurden gegen 10 mM HEPES, 5 mM Mercaptoethanol, pH 7,5 dialysiert und über eine Mono-S-Säure (Kationentauscher, Pharmacia) gegeben. Die Enzymaktivität befand sich wiederum im Durchlauf, wurde gegen 25 mM Imidazol (pH 7,5) dialysiert und über Chromatofocussierung an Mono P (Pharmacia) weiter gereinigt. Als weiterer Reinigungsschritt erfolgte dann eine Chromatographie an Blue Sepharose (Blue Cartridge, BioRad). Nach diesem Reinigungsschritt war das Protein von allen Fremdproteinen abgetrennt.

4. Charakterisierung des Proteins

— Molekulargewicht: ca. 50 000 Dalton (bestimmt mittels denaturierender Polyacrylamid Gelelektrophore-

se)

- pH Optimum: pH = 7,5
- Temperaturoptimum: 40°C
- Substratspezifität gegenüber L—N-Acetyl Phosphinothricin und L—N-Acetyl Glutamat
- Enzymaktivität: siehe Beispiel 5

5. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte nach zwei verschiedenen Methoden

5.1 Test 1 (Radioaktiver Test)

1—15 µl Enzym (in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5; 5 mM Mercaptoethanol) wurden mit 5 µl 0,25 mM ¹⁴C—N—Ac—PPT (150 000 dpm) für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 5 µl des Reaktionsansatzes auf aktivierten Kieselgel-DC-Platten mit dem Laufmittel 2-Propanol : Ammoniak (25%) = 6 : 4 getrennt und die Platten per Autoradiographie analysiert.

5.2 Test 2 (Quantitativer Test)

1—50 µl Enzym (in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5; 5 mM Mercaptoethanol) plus 10 mM N—Ac—PPT wurden bei 40°C inkubiert und die Reaktion durch Ansäuern auf pH 2 gestoppt. Das von der Deacetylase gebildete L-Phosphinothricin wurde im Aminosäureanalysator quantifiziert.

Die Sequenz mehrerer tryptischer Peptide der Deacetylase wurde mittels Gasphasen-Sequenator bestimmt (Xaa bezeichnet nicht eindeutig bestimmte Aminosäuren):

1. Thr-Gln-Val-Pro-Ala-Ser-Pro-Xaa-Xaa-Thr-Xaa-Xaa-Xaa-Lys-Ala
2. Xaa-Val-Pro-Val-Tyr-Glu-Met-Tyr-Prn-Tyr
3. Xaa-Xaa-Phe-Leu-Val-Thr-Met-Phe-Asn-Glu-Gly-Gln-Lys
4. Xaa-Val-Met-Ala-Lys

6. Produktion von L—PPT aus DL—N—Ac—PPT mit der gereinigten Deacetylase

Die gereinigte Deacetylase wurde mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml (spez. Enzymaktivität 15 U/mg Protein) in 50 mM Tris Puffer pH 8,0 mit 50 mM DL—N—Ac—PPT bei 37°C inkubiert. Zwischen 0 und 24 Stunden Inkubationszeit wurden Proben entnommen und auf gebildetes L-Phosphinothricin untersucht. Nach Abschluß der Reaktion waren etwa 50% des eingesetzten DL—N—Ac—PPT in L—PPT umgesetzt worden.

7. Nachweis der Deacetylase Aktivität in Antherenextrakten

Aus Tabakblüten wurden je 100 mg reife Antheren isoliert und mit Puffer (50 mM Tris pH 7,2; 10 mM MgCl₂; 1 mM EDTA; 10 mM Mercaptoethanol; 1% unlösliches PVP) homogenisiert und anschließend zentrifugiert.

Die löslichen Überstände wurden wie folgt behandelt:

- A: plus 5 mM DL—N—Ac—PPT
- B: plus 5 mM DL—N—Ac—PPT; plus 0,1 unit Deacetylase
- C: ohne Zusatz

und für 15 min bei 28°C inkubiert.

Anschließend wurde in den Ansätzen das gebildete L—PPT bestimmt. Während in den Ansätzen A und C kein L—PPT nachweisbar war, konnte im Ansatz B eine Konzentration von 2 mM L—PPT festgestellt werden.

Des weiteren wurde in den Ansätzen die Aktivität des Enzyms Glutamin-Synthetase (auf der Inhibierung des Enzyms Glutamin-Synthetase durch L—PPT beruht der Wirkmechanismus des Herbizids BASTA.). In den Ansätzen A und C konnte eine Glutaminsynthetase-Aktivität von 2 bzw. 5 nkat/mg Protein nachgewiesen werden. Im Ansatz B war das Enzym nicht mehr aktiv.

Der Versuch zeigt, daß in den Antheren die Glutamin-Synthetase, das Enzym durch das Herbizid Phosphinothricin gehemmt wird, exprimiert wird und die von uns isolierte L—N—Ac—PPT-spezifische Deacetylase in Pflanzengewebe aktiv ist.

Patentansprüche

1. Eine Deacetylase aus einem Bodenisolat mit
 - einem Molekulargewicht von 20 000 bis 100 000 Dalton
 - einem pH-Optimum in einem Bereich von 6,5 bis 9,5 und
 - einer Substratspezifität gegenüber N-Acetyl-Phosphinothricin.
2. Ein Verfahren zur Herstellung einer Deacetylase gemäß Anspruch 1, das dadurch gekennzeichnet ist, daß ein nicht sporenbildender Mikroorganismus in Krabbenchitin enthaltenden Medium kultiviert wird, und die Deacetylase aus diesen Mikroorganismen isoliert wird.
3. Deacetylase nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens eine der folgenden Aminosäuresequenzen enthält:

- Thr-Gln-Val-Pro-Ala-Ser-Pro-Xaa-Xaa-Thr-Xaa-Xaa-Xaa-Lys-Ala
 - Val-Pro-Val-Tyr-Glu-Met-Tyr-Pro-Tyr
 - Phe-Leu-Val-Thr-Met-Phe-Asn-Glu-Gly-Gln-Lys
 - Val-Met-Ala-Lys.
4. Verfahren zur Herstellung der Transaminase nach Anspruch 1 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß ein Mikroorganismus ausgewählt aus der Gruppe welche aus *Variovorax paradoxus* (DSM-Hinterlegungsnummer 7470), *Pseudomonas diminuta* (ATCC 11568), *Nocardia globerula* (ATCC 19370), *Cellulomonas cartae* (ATCC 21681) und *Agrobacterium radiobacter* (ATCC 19358) besteht, in einem Medium, das Krabbenchitin enthält, kultiviert und die Deacetylase isoliert wird. 5
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß bei einer Temperatur zwischen 20 und 40°C kultiviert wird. 10
6. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß bei einer Temperatur zwischen 25 und 37°C kultiviert wird.
7. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 4 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß bei einem pH-Wert von 5 bis 8,5 kultiviert wird. 15
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß bei einem pH-Wert von 5,5 bis 8,0 kultiviert wird.
9. Verwendung der Transaminase nach Anspruch 1 oder 3 zur Deacetylierung von N-Acetyl-Phosphinothricin.
10. Verwendung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Deacetylierungsreaktion zwischen 30 und 50°C durchgeführt wird. 20
11. Verwendung nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Reaktion bei einem pH-Wert von 6 bis 10 durchgeführt wird.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

02 72 10

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/00		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/27201
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 25. Juni 1998 (25.06.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/06755		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HU, ID, IL, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ARIPO Patent (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 3. Dezember 1997 (03.12.97)		Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(30) Prioritätsdaten: 196 52 284.6 16. Dezember 1996 (16.12.96) DE			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): HOECHST SCHERING AGREVO GMBH [DE/DE]; Miraustrasse 54, D-13509 Berlin (DE).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BARTSCH, Klaus [DE/DE]; Im Kleinfeld 54, D-61462 Königstein (DE). KRIETE, Guido [DE/DE]; Winnebrouckerstrasse 5, D-33790 Halle (DE). BROER, Inge [DE/DE]; Kreuzberger Strasse 24, D-33619 Bielefeld (DE). PÜHLER, Alfred [DE/DE]; Am Waldschlößchen 2, D-33793 Bielefeld (DE).			
(54) Title: NOVEL GENES CODING FOR AMINO ACID DEACETYLASES WITH SPECIFICITY FOR N-ACETYL-L-PHOSPHINOTHRICIN, THEIR ISOLATION AND THEIR USE			
(54) Bezeichnung: NEUE GENE CODIEREND FÜR AMINOSÄURE-DEACETYLASEN MIT SPEZIFITÄT FÜR N-ACETYL-L-PHOSPHINOTHRICIN, IHRE ISOLIERUNG UND VERWENDUNG			
(57) Abstract			
The invention concerns DNA molecules which code for deacetylases or proteins having the biological activity of a deacetylase, and transgenic plant cells which are transformed with the DNA molecules according to the invention. These molecules can be used to produce plants having parts which can be deliberately destroyed, that is plants which have male or female sterility, by the specific expression of a deacetylase gene.			
(57) Zusammenfassung			
Die Erfindung betrifft DNA-Moleküle, die für Deacetylasen oder Proteine mit der biologischen Aktivität einer Deacetylase kodieren sowie transgene Pflanzenzellen, die mit den erfindungsgemäßen DNA-Molekülen transformiert wurden. Diese Moleküle können zur Herstellung von Pflanzen mit gezielt zerstörbaren Teilen, d.h. männlich oder weiblich sterile Pflanzen, durch die spezifische Expression eines Deacetylasegens verwendet werden.			

23
11

Patentansprüche

1. DNA-Molekül codierend ein Protein mit der biologischen Aktivität einer N-Acetyl-Phosphinothricin-Deacetylase. (xal-PPT) *Enzima concuendo*
2. DNA-Molekül codierend ein Protein mit der biologischen Aktivität einer N-Acetyl-Phosphinothricin-Deacetylase ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
 - a) DNA-Molekülen, die für ein Protein mit der unter SEQ ID No 2 angegebenen Aminosäuresequenz und Fragmenten und/oder Derivaten davon kodieren;
 - b) DNA-Molekülen, die für eine unter der SEQ ID No 1 angegebenen Nukleotidsequenz kodieren oder Sequenzen, die im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes von dieser Sequenz abweichen;
 - c) DNA-Molekülen, die für ein Protein mit der unter SEQ ID No 4 angegebenen Aminosäuresequenz oder Fragmenten und/oder Derivaten davon kodieren und
 - d) DNA-Molekülen, die für eine unter der SEQ ID No 3 angegebenen Nukleotidsequenz kodieren oder Sequenzen, die im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes von dieser Sequenz abweichen.
3. Verfahren zur Isolierung von Mikroorganismen mit hoher N-Acetyl-Phosphinothricin-Deactylase-Aktivität.
4. *Stenotrophomonas* sp. (DSM 9734) und *Comamonas acidovorans* (DSM 11070). *M.O. productor de enzima concuendo*

7A
+2

5. Pflanzenzellen oder Pflanzen, die ein DNA-Molekül nach Anspruch 1 enthalten.
6. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit gezielt zerstörbaren Teilen durch spezifische Expression eines Deacetylasegens.
7. Verfahren zur Herstellung männlich oder weiblich steriler Pflanzen durch spezifische Expression eines Deacetylasegens.

EUROPEAN PATENT APPLICATION

Application number: 89308930.0

Date of filing: 04.09.89

Int. Cl.⁵: **C 12 P 41/00**

C 12 N 13/00, C 12 N 1/20
/(C12N1/20,C12R1:425,1:44,
1:07,1:20,1:025,1:05,1:045,1:62)

Priority: 05.09.88 JP 221899/88
 23.12.88 JP 325125/88
 19.01.89 JP 10826/89
 20.01.89 JP 11636/89
 14.03.89 JP 61711/89
 28.04.89 JP 110281/89
 07.06.89 JP 144437/89
 14.07.89 JP 181823/89

Date of publication of application:
 14.03.90 Bulletin 90/11

Designated Contracting States:
 AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

Applicant: **NISSAN CHEMICAL INDUSTRIES, LIMITED**
 7-1, Kanda-Nishiki-cho 3-chome
 Chiyoda-ku Tokyo 101 (JP)

Inventor: **Kuwahara, Masao**
 2578 Komuro-cho
 Funabashi-shi Chiba-ken (JP)

Tagawa, Michito
 205 Matsuda-Manshon 3-14-46 Higashi-Omiya
 Omiya-shi Saitama-ken (JP)

Furusato, Takashi
 6-7-3-301 Oto
 Yono-shi Saitama-ken (JP)

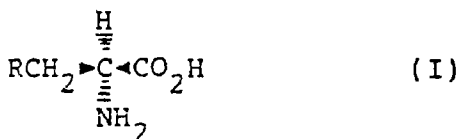
Narushima, Hiroyuki
 5-28-2 Higashi
 Kuki-shi Saitama-ken (JP)

Shinke, Shuzo
 1-5-17-104 Narashino
 Funabashi-shi Chiba-ken (JP)

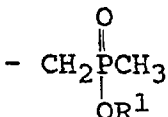
Representative: **Woods, Geoffrey Corlett et al**
J.A. KEMP & CO. 14 South Square Gray's Inn
London WC1R 5EU (GB)

Process for producing optically active compounds.

A process for producing an L-amino acid of formula (I):



wherein R is -CH₂CO₂H, -CH₂CONH₂, -CO₂H or



in which R¹ is a hydrogen atom, an alkyl group having 1 to 10 carbon atoms or a halogen-substituted alkyl group having 1 to 10 carbon atoms,

which process comprises carrying out an optical resolution of an N-substituted carbonyl-D,L-amino acid of formula (II):

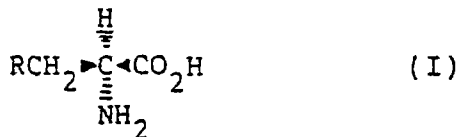


wherein R is as defined above and R² is an alkanoyl group having 1 to 5 carbon atoms, a benzoyl group, a halogen-substituted alkanoyl group having 1 to 5 carbon atoms or a halogen-substituted benzoyl group, or a salt thereof, or a mixture thereof,

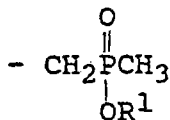
with cells of a microorganism, a microorganism fermentation broth, a treated microorganism fermentation broth, or a mixture thereof, said microorganism being selected from the bacteria of the genera Serratia, Staphylococcus, Bacillus, Flavobacterium, Achromobacter and Alcaligenes and actinomycetes of the genera Actinoplanes, Streptosporangium and Sebekia.

Claims

1. A process for producing an L-amino acid of formula (I):



wherein R is $-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$, $-\text{CO}_2\text{H}$ or



in which R^1 is a hydrogen atom an alkyl group having 1 to 10 carbon atoms or a halogen-substituted alkyl group having 1 to 10 carbon atoms, which process comprises carrying out an optical resolution of an N-substituted carbonyl-D,L-amino acid of formula (II):



wherein R is as defined above and R^2 is an alkanoyl group having 1 to 5 carbon atoms, a benzoyl group, a halogen-substituted alkanoyl group having 1 to 5 carbon atoms or a halogen-substituted benzoyl group, or a salt thereof, or a mixture thereof,

with cells of a microorganism, a microorganism fermentation broth, a treated microorganism fermentation broth, or a mixture thereof, said microorganism being selected from the bacteria of the genera *Serratia*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Achromobacter* and *Alcaligenes* and actinomycetes of the genera *Actinoplanes*, *Streptosporangium* and *Sebekia*.

2. A process according to claim 1, wherein the microorganism is strain IFO 12648 of *Serratia marcescens*, strain IFO 12732 of *Staphylococcus aureus*, strain NCB 11 of *Bacillus brevis* strain NCB 12-2 of *Flavobacterium* sp., strain IFO 13495 of *Achromobacter* sp., or strain NCB 4-12 of *Alcaligenes latus*.

3. A process according to claim 1, wherein the microorganism is strain IFO 13997 of *Actinoplanes liguriae*, strain NC 26 of *Streptosporangium* sp., or strain IFO 14309 of *Sebekia benihana*.

4. A process according to any one of the preceding claims, wherein R^2 is an acetyl group.

5. A process according to any one of the preceding claims, wherein the optical resolution is carried out at a temperature of from 20 to 50°C.

6. A process according to any one of the preceding claims, wherein the optical resolution is carried out at a pH of from 6 to 9.

7. Strain NCB 11 of *Bacillus brevis*, and variants thereof capable of producing an L-amino acid of formula (I) as defined in claim 1 by optical resolution of an N-substituted carbonyl-D,L-amino acid of formula (II) as defined in claim 1.

8. Strain NCB 12-2 of *Flavobacterium* sp., and variants thereof capable of producing an L-amino acid of formula (I) as defined in claim 1 by optical resolution of an N-substituted carbonyl-D,L-amino acid of formula (II) as defined in claim 1.

9. Strain NCB 4-12 of *Alcaligenes latus*, and variants thereof capable of producing an L-amino acid of formula (I) as defined in claim 1 by optical resolution of an N-substituted carbonyl-D,L-amino acid of formula (II) as defined in claim 1.

10. Strain NC 26 of *Streptosporangium* sp., and variants thereof capable of producing an L-amino acid of formula (I) as defined in claim 1 by optical resolution of an N-substituted carbonyl-D,L-amino acid of formula (II) as defined in claim 1.

D9
27
11

(12) UK Patent Application (19) GB (11) 2 031 896 A

- (21) Application No 7933176
(22) Date of filing 25 Sep 1979
(23) Claims filed 25 Sep 1979
(30) Priority data
(31) 53/120390
(32) 2 Oct 1978
(33) Japan (JP)
(43) Application published
30 Apr 1980
(51) INT CL³
C07F 9/30
(52) Domestic classification
C2P 1L1 2E11A 2E12B
2E14 2E18C 2E19A 2E26A
2E26B 7 B
(56) Documents cited
None
(58) Field of search
C2P
(71) Applicants
Meiji Seika Kaisha Ltd.
4-16, Kyobashi 2-chome,
Chuo-ku,
Tokyo,
Japan.
(72) Inventors
Akira Suzuki,
Tomizo Niwa,
Yujiro Yamada,
Hitoshi Goi,
Shinji Miyado,
Takashi Shomura.
(74) Agents
Brewer & Son

(54) A process for the optical resolution of D,L-2-amino-4-methylphosphinobutyric acid

(57) L-2-Amino-4-methylphosphinobutyric acid (L-MPGA) which is useful as bactericide and herbicide can be prepared by optical resolution of its racemic mixture, D,L-MPGA with the action of a microbial acylase. The process comprises providing D,L-MPGA in the form of its N-acyl derivative, reacting N-acyl-D,L-MPGA in an aqueous medium with a microbial acylase having an optically specific hydrolytic activity, whereby selectively eliminating the acyl group of N-acyl-L-MPGA to give a mixture of L-MPGA and N-acyl-D-MPGA and isolating L-MPGA from the mixture. The acylase is produced by cultivating a microbial strain belonging to the genus *Pseudomonas*, *Streptomyces* or *Aspergillus*, particularly *Pseudomonas maltophilia* BN-233, *Streptomyces violaceus* SF 2072, *Streptomyces diastatochromogenes* SF 2073, *Aspergillus* sp. KS-101 or *Aspergillus* sp. KS-102.

GB 2 031 896 A

there may be exemplified soybean meal, wheat germs, meat extract, peptone, corn steep liquor, dried yeast, ammonium nitrate, sodium nitrate and the like. If required, inorganic salts such as sodium chloride, potassium chloride, calcium carbonate, phosphates and the like and other additives which can promote the growth of the strain used whereby to accelerate the production of the desired acylase may be incorporated into the culture medium in any suitable combination thereof.

Liquid and solid culture methods conventionally used for the cultivation of usual microorganisms may be applied to the cultivation for the purpose of the present invention, a submerged culture being preferred for large scale operations. The cultivation is carried out under aerobic conditions at a temperature ranging 25-37°C, most preferably at a temperature of around 28°C. The time of cultivation is of course dependent upon the cultivation conditions, particularly upon cultivation apparatus, composition of the culture medium, temperature, etc. Preferably, the cultivation may be continued until the activity of acylase produced reaches a maximum level. In most cases, the acylase-activity appears after one day from the start of cultivation, reaches a maximum level after two to three days and then lowers gradually and disappears. Usually, therefore, a period of 2-4 days will be suitable for the cultivation intended.

The culture thus obtained or "an enzyme material" derived from the culture by certain after-treatments thereof contains an acylase which acts as optically specific hydrolytic enzyme and can be used for the optical resolution according to the present invention. By the expression "an enzyme material" herein used is meant any desired form of materials obtained by subjecting the culture of the strains above-mentioned to a certain treatment or treatments suitable to transform the culture into a more advantageous form for the purpose of the enhancement in efficiency of the acyl-elimination by optically specific hydrolysis for the production of L-MPGA and N-acyl-D-MPGA. Thus, examples of said "enzyme material" include cells collected from the culture, either in a washed or unwashed form or in a dried or undried form, disintegrated cells, their extracts rich in the desired acylase which are derived by extraction of the ultrasonically or mechanically disintegrated cells followed by purification and immobilized acylase preparations derived from the cells, disintegrated cells or their extracts.

In carrying out the process of the present invention, the starting D,L-MPGA to be optically resolved is used in the form of its N-acyl derivative as already stated. The enzymatic deacylating reaction by optically specific hydrolysis of N-acyl-L-MPGA with the action of a microbial acylase is carried out in an aqueous medium. The reaction conditions should be chosen to make the best use of the properties of the acylase. If the acylase is used in the form of intact cells separated from the culture, the enzymatic activity thereof is satisfactorily high at a pH ranging 6-8.5 and lowers or disappears at a pH below 5 or above 9, no substantial difference in enzymatic properties being observed among acylases produced by different genera of microorganisms. The reaction temperature may be in the range of 20-45°C for any of acylases concerned, the most preferred range being 28-35°C. above 50°C, the acylases are observed to lose their activities.

Thus, the reaction conditions should preferably be at a pH ranging 6.5-8.5 and at a temperature ranging 25-40°C. We have found that the microbial acylase to be used in the process of the present invention has little or a little activity on any of substrates other than N-acyl-L-MPGA, for example on N-acyl derivatives of known, usual L-amino acids.

In cases where the microbial acylase is used in the form of washed cells, it is preferred to disperse the cells in a solution of the substrate and to carry out the reaction in the dispersion. Effectively, the reaction is conducted with a suitable shaking or stirring. Alternatively, the reaction may be carried out by filling a column with the culture or an enzyme material derived therefrom and continuously passing the substrate solution through the column so that the deacylation occurs successively. The time of reaction depends upon the concentration of substrate, degree of deacylating activity, reaction temperature and other factors and usually is in the range of 2-40 hours. The termination of the reaction may be determined by examining the time at which the production of the desired L-MPGA becomes maximum. The substrate concentration may be determined mainly in relation to the degree of deacylating activity and usually is in the range of 0.1-10%. If desired, any suitable antiseptic may be added to prevent any possible contamination of the reaction mixture with other microorganisms during the reaction.

The separation of L-MPGA and N-acyl-D-MPGA from the reaction mixture and the isolation and recovery of each of the compounds may be done in a known manner per se. Thus, the reaction mixture obtained may be subjected to filtration, centrifugal separation or any other separating operation to remove the cells or their derivative used. The filtrate or liquid fraction thus obtained may be passed through a column packing with an ion-exchange resin of a strongly acidic nature, e.g. "Dowex 50" (Dowex is a registered trade mark of Dow Chemical Company), where the L-MPGA is adsorbed on the column while the unreacted N-acyl-D-MPGA is passed through the column without being adsorbed. Then, the column may be developed with water to elute L-MPGA which is positive to ninhydrin reaction and the eluate is purified, if necessary, by a treatment with an activated carbon or an ion-exchange resin, e.g. "Dowex 1" produced by Dow Chemical Company, concentrated and crystallized or freeze-dried to give the pure L-MPGA in the form of crystals or white powder.

The fraction of N-acyl-D-MPGA already separated may be easily racemized in a known manner per se to a further amount of the starting N-acyl-D,L-MPGA. Thus, for example, the fraction of N-acyl-D-MPGA

acetic acid and adding an equimolar or less proportion of acetic anhydride thereto under heating. A number of repeat of the process of the optical resolution according to the present invention in combination with the subsequent racemization will result in the complete transformation of D-MPGA into L-MPGA.

The completion of the enzymatic deacylation may be determined by measuring the amount of L-MPGA 5 formed by the following method:

The amount of L-MPGA formed can be quantitatively determined by spectrophotometry using ninhydrin as reagent wherein a standard calibration curve is first prepared, with which the absorbancy of a sample tested is compared [see E.W. Yemm and E.C. Cocking, *Analyst*, 80, 209 (1955)].

10 Reagents:

Solution A: A 4M acetic acid buffer solution (pH: 5.50);

Solution B: A mixture of 5 ml of 0.01M potassium cyanide solution with 245 ml of methyl cellosolve;

Solution C: A solution of 2.5 g of ninhydrin in 50 ml of methyl cellosolve;

Solution D: A mixture of 250 ml of Solution B and 50 ml of Solution C;

15 Solution E: A 60% ethanol solution;

Measuring procedure:

A 1.0 ml aliquot of a sample solution to be tested is taken in a test tube, to which are added 0.5 ml of Solution A and 1.2 ml of Solution D. The resulting mixture is kept in a boiling water bath for 15 minutes and 20 then cooled in cold water for 5 minutes. Then, a 3.0 ml aliquot of Solution E is added to the mixture and the resulting solution is well stirred and measured its absorbancy at 570 nm on a spectrophotometer.

The standard curve of absorbancy of L-MPGA shows a straight relation in the concentrations ranging from 1 to 50 ug/ml, so that the comparison of the values measured with the standard curve gives the content of L-MPGA in the sample solution.

25 Embodiments of the present invention will now be described in the following non-limiting Examples.

Example 1

A loopful amount of a slant culture of *Pseudomonas maltophilia* BN-233 (FERM-P 4487) was inoculated to 200 ml of a sterilized culture medium containing 0.5% glucose, 0.3% meat extract, 0.5% peptone, 0.2% 30 sodium glutamate, 0.001% cobalt chloride and 0.001% ferrous sulfate. The inoculated medium was cultured with shaking at 28°C for 42 hours. The culture broth was centrifuged at 8000 rpm for 20 minutes to collect the cells which were then washed with 50 ml physiological salt solution to give 5 g (wet weight) of the washed cells.

A 1.6 g portion of the washed cells was suspended in 50 ml of a 0.05M phosphate buffer solution (pH 5), to 35 which was then added 240 mg of N-acetyl-D,L-MPGA and the mixture was maintained in a 200 ml Erlenmeyer flask at 28°C under shaking for 18 hours to complete the reaction. Thereafter, the reaction mixture was centrifuged to give a solid mass comprising the cells and a supernatant liquid. The solid mass comprising the cells and a supernatant liquid. The solid mass was washed twice with 5 ml portions of water and the washings were combined with the supernatant liquid. The combined liquid was passed through a 40 column (1.6 cm in diameter and 12 cm in height) of an ion exchange resin "Dowex 1 x 2" (CH₃COO⁻), through which were passed a large amount of water for washing and then an amount of 0.3N acetic acid as developer. The eluate fractions (total volume: 90 ml) which were positive to ninhydrin reaction were collected together, concentrated to dryness under a reduced pressure and freeze-dried to yield 84 mg of L-MPGA as white powder. Purity 85%, $[\alpha]_D^{22}$ 21.7° (c=1, 1N HCl), Yield 68%.

Example 2

A loopful amount of a slant culture of *Streptomyces violascens* SF-2072 (FERM-P 4617) was inoculated to 200 ml of a sterilized culture medium containing 1% soluble starch, 0.2% yeast extract and 0.2% peptone (pH 7.0 before sterilization). The inoculated medium was cultured with shaking at 28°C for 72 hours. The resulting 50 culture was suction-filtered using a filter paper of "Toyo No. 2" and the cells collected on the paper were washed with 50 ml of physiological salt solution to give 6.5 g (wet weight) of the washed cells.

A 3 g portion of the washed cells was thoroughly suspended in 200 ml of a 0.05 M phosphate buffer solution (pH 7.0). To the suspension was added 400 mg of N-acetyl-D,L-MPGA and the mixture was maintained at 30°C under shaking for 16 hours to complete the reaction. Then, the reaction mixture was 55 filtered through a filter paper of "Toyo No. 2" and the solid mass collected on the paper was washed with 20 ml of water. The filtrate and the washing were combined together and the mixture was passed through a column (1.2 cm in diameter and 15 cm in height) of an ion exchange resin "Dowex 50 x 2" (H⁺), through which was then passed an amount of water as developer. Eluate fractions (total volume: 160 ml) which were positive to ninhydrin reaction were collected together, concentrated to dryness under a reduced pressure 60 and freeze-dried to yield 158 mg of L-MPGA as white powder. Purity 92%, $[\alpha]_D^{22}$ 23° (c=1, 1N HCl), Yield 88.6%.

solution and concentrated to dryness under a reduced pressure. To the dried concentrate were added 2 ml of acetic acid and 0.11 ml of acetic anhydride and the mixture was refluxed at 100°C for 18 hours. The resulting mixture was concentrated to dryness under a reduced pressure and the solid residue was subjected to enzymatic deacetylation in the same manner as used in Example 2, yielding 55 mg of L-MPGA as white powder. $[\alpha]_D^{22}$ (c=1, 1N HCl).

Example 4

The following strains were used for the cultivation for the production of the desired microbial acylases in the same manner as described in the preceding Examples.

- 10 A: *Pseudomonas maltophilia* BN-233 (FERM-P 4487)
 B: *Streptomyces violascens* SF-2072 (FERM-P4617)
 C: *Streptomyces diastatochromogenes* SF-2073 (FERM-P 4618)
 D: *Aspergillus* sp. KS-101 (FERM-P 4614)
 E: *Aspergillus* sp. KS-102 (FERM-P 4615)

15 A 100 mg (wet weight) portion of each of the washed cells produced by the cultivation of the above-mentioned strains was suspended in 1 ml of a 0.05 M phosphate buffer solution (pH 7.0) and to the suspension was added 5 mg of each of the substrates given in the following table and the mixture was maintained in a tube shaker at 28°C for 6 hours to complete the reaction. The reaction mixture was after-treated as in the preceding Examples and the percent production of L-MPGA was measured by a spectrophotometry on each of the filtrates using ninhydrin as reagent. The results are given in the following table.

TABLE PERCENT PRODUCTION OF L-MPGA

Substrate	A	B	C	D	E
N-acetyl-L-MPGA	55.0	73.2	65.4	52.0	45.8
30 N-propionyl-L-MPGA	52.2	70.5	55.0	38.0	46.2
N-butyryl-L-MPGA	38.8	46.4	46.4	37.5	35.0
N-benzoyl-L-MPGA	24.3	36.1	26.1	24.0	22.4
35 N-p-chlorobenzoyl-L-MPGA	21.6	33.8	24.5	-	18.6

40 Details of the production of washed cells:

- Strain A: Similar to the method of Example 1
 Strains B and C: Similar to the method of Example 2
 Strains D and E: Shake-cultivated on a sterilized culture medium containing 1% peptone, 0.2% yeast extract, 2% glucose and 0.001% cobalt chloride (pH 7.0 before sterilization) at 28°C for 68 hours. The resulting culture was filtered and washed to yield the washed cells.

Example 5

A 3 g portion of the washed cells of *Streptomyces violascens* SF-2072 (FERM-P 4617) obtained in Example 2 was suspended in 100 ml of a 0.05 M phosphate buffer solution (pH 7.0). The resulting suspension was subjected to cell-disintegration treatment on a French pressure cell under a pressure of 1500 psi and then centrifuged at 1500 rpm. The supernatant liquid obtained was used as acylase in the following experiment.

A 20 ml portion of the acylase was mixed with 120 mg of N-acetyl-D,L-MPGA and the mixture was maintained at 30°C for 16 hours to complete the reaction. Then, the reaction mixture was passed through a column (1.2 cm in diameter and 10 cm in height) of an ion exchange resin "Dowex 50 x 2" (H⁺), through which was then passed an amount of water as developer. Eluate fractions which were positive to ninhydrin reaction were collected, the total volume of which amounting at 24 ml, treated with 100 mg of activated carbon at room temperature with stirring for 30 minutes and filtered. The carbon filtered off was washed twice with 5 ml portions of water. The filtrate was combined with the washings and the combined liquid was concentrated to dryness under a reduced pressure and then freeze-dried to yield 48 mg of L-MPGA as white powder. Purity 91%, $[\alpha]_D^{22}$ 21.5° (c=1 1N HCl), Yield 88.7%.

81
29

which had been well swollen with water and the mixture was stirred at 5°C for 3 hours to make complete the absorption of the acylase on the DEAE-Sephacel. The mixture was then centrifuged at 3000 rpm for 20 minutes to separate the DEAE-Sephacel in a gel state, which was then washed twice with 50 ml portions of a 0.05 M phosphate buffer solution (pH 7.0). A solution of 50 mg of N-acetyl-D,L-MPGA in 50 ml of a 0.05 M phosphate buffer solution (pH 7.0) was added to 10 ml of the DEAE-Sephacel gel so obtained and the mixture was stirred with a magnetic stirrer at 30°C for 16 hours to complete the reaction. The reaction mixture was centrifuged at 3000 rpm for 20 minutes to separate the DEAE-Sephacel gel, which was then washed with 5 ml of the same buffer solution. The supernatant liquid from the centrifuge was combined with the washing.

10 The same reaction as above was repeated by adding 50 ml of a 0.1% N-acetyl-D,L-MPGA-phosphate buffer solution to the washed DEAE-Sephacel gel. The percent production of L-MPGA was measured by a spectrophotometry on the supernatant liquid from the reaction using ninhydrin as reagent.

The reaction was carried out three times in all with the same DEAE-Sephacel-acylase gel, the results of which are shown below with respect to the percent production of L-MPGA.

15 1st run 86.1%
2nd run 85.0%
3rd run 81.2%

CLAIMS

- 20 1. A process for the optical resolution of D,L-2-amino-4-methylphosphinobutyric acid which comprises the steps of:-
providing D,L-2-amino-4-methylphosphinobutyric acid in the form of its N-acyl derivative;
reacting the N-acyl derivative of D,L-2-amino-4-methylphosphinobutyric acid in an aqueous medium
25 with a microbial acylase having an optically specific hydrolytic activity which is produced by cultivating a microbial strain belonging to the genus *Pseudomonas*, *Streptomyces* or *Aspergillus*; thereby
selectively eliminating the acyl group of N-acyl-L-2-amino-4-methylphosphinobutyric acid to give a mixture of L-2-amino-4-methylphosphinobutyric acid and N-acyl-D-2-amino-4-methylphosphinobutyric acid; and
30 isolating and recovering L-2-amino-4-methylphosphinobutyric acid from the mixture.
2. A process according to Claim 1 wherein the microbial strain is a strain of the species *Pseudomonas maltophilia*.
3. A process according to Claim 2 wherein the strain is *Pseudomonas maltophilia* BN-233 identified as FERM-P 4487 or ATCC No.31559.
- 35 4. A process according to Claim 1 wherein the microbial strain is a strain of the species *Streptomyces violascens*.
5. A process according to Claim 4 wherein the strain is *Streptomyces violascens* SF-2072 identified as FERM-P 4617 and ATCC No.31560.
6. A process according to Claim 1 wherein the microbial strain is a strain of the species *Streptomyces diastatochromogenes*.
- 40 7. A process according to Claim 6 wherein the strain is *Streptomyces diastatochromogenes* SF-2073 identified as FERM-P 4618 and ATCC No.31561.
8. A process according to Claim 1 wherein the microbial strain is a strain of the species *Aspergillus niger*.
9. A process according to Claim 8 wherein the strain is *Aspergillus* sp. KS-101 identified as FERM-P 4614 and ATCC No.20567.
- 45 10. A process according to Claim 1 wherein the microbial strain is a strain of the species *Aspergillus flavus-oryzae*.
11. A process according to Claim 10 wherein the strain is *Aspergillus* sp. KS-102 identified as FERM-P 4615 and ATCC No.20568.
12. A process according to Claim 1 wherein the microbial acylase is used in the form of a culture obtained 50 by the cultivation of a microbial strain stated or an enzyme material derived from the culture by an treatment thereof.
- A process according to Claim 12 wherein the enzyme material is cells collected from the culture in a washed or unwashed form or a dried or undried form, disintegrated cells, their extracts rich in the microbial components which are derived by extraction of the disintegrated cells followed by purification or immobilized 55 preparations derived from the cells, disintegrated cells or their extracts.
- A process according to Claim 1 wherein the microbial acylase is produced by the cultivation of a microbial strain stated under aerobic conditions in a suitable culture medium at a temperature of 25-37°C for a period of time at which the activity of acylase produced reaches a maximum level.
- A process according to Claim 1 wherein the unreacted N-acyl-D-2-amino-4-methylphosphinobutyric acid recovered from the reaction mixture and racemized in a known manner to produce a further amount 60 of D,L-2-amino-4-methylphosphinobutyric acid for recycling to the reaction with the microbial

821/10
80

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO
Folios: 10
Fecha: 2005-11-01 16:16:54
Tipo: 000 PATENTES D 1 REGISTRO/ 444 REPUESTA
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

11084

Señores
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
E. S. D.

Re: Expediente No. 000 52026
Solicitud de Patente
Solicitante: Aventis CropScience GmbH

Yo, LUIS PATIÑO LEYVA, vecino de Bogotá, D. C., portador de la tarjeta profesional No. 2698, obrando como apoderado sustituto del solicitante, en la solicitud de patente de la referencia, doy respuesta al Oficio No. 6874, notificado por fijación en lista en Agosto 11 de 2005, en los siguientes términos:

1. De acuerdo con el Oficio arriba citado, nuestro poderdante considera necesario someter a la consideración del examinador los siguientes comentarios con el fin de superar las objeciones a la altura inventiva: en el documento W098/27201, dos deacetilasas (una obtenida de estenotrofomonas y la otra obtenida de Comamonas) se han divulgado. La información divulgada en W098/27201 se relaciona con la identificación, el aislamiento y el clonado de estas dos deacetilasas así como su sobre expresión usando un vector de fusión GST.

2. En ningún lugar de la descripción el uso de éstas o alguna de estas enzimas en un ensayo a gran escala para la generación de L-PPT de alta pureza iniciando a partir de N-Acetil-D, L-PPT racemato o para generar el respectivo L-aminoácido cuando se inicia a partir del correspondiente N-Acetil-D, L-racemato se divulgó o sugirió. La única información divulgada en W098/27201 que va más allá del aislamiento de deac1 y deac2 y su uso en plantas transgénicas se menciona en la columna 7, línea 29-35 del documento US 6,177,616B1 (el cual es una patente US correspondiente a W098/27201) donde se lee: "La enzima tiene un espectro de sustrato relativamente amplio. Las conversiones superiores

fueron logradas con ácido hipúrico (N-benzoilglicina) y N-acetil-L-glutamato. La afinidad por N-acetil-L-PPT está aproximadamente 50% por debajo del de los dos sustratos arriba mencionados. La deacetilasa tiene una especificidad exclusiva para N-acetil-L-amino-ácidos. Usando los correspondientes D-enantiómeros, no se observaron reacciones." (La parte correspondiente en el escrito del PCT en su idioma alemán es: página 13, último párrafo).

3. La Tabla 3 no muestra la actividad enantio-selectiva de la deacetilasa debido a que los compuestos usados fueron proporcionados solamente como los L-enantiómeros (ver la nota de pie de página 1 de la Tabla 3). Las deacetilasas aquí descritas exhiben una exclusiva especificidad para los N-acetil-L-aminoácidos y que no se observó reacción cuando se usó el correspondiente D-enantiómero pero en ninguna parte de la divulgación de W098/27201 se mencionó o demostró que no había impacto negativo (como un efecto inhibitorio) de la presencia de N-acetil-D-aminoácido en tal N-acetil-D, L-racemato concerniente a la actividad de acetilasa dirigida al L-enantiómero empleando *deac1* o *deac2* en esta reacción.

4. En casos dirigidos a la aplicación de N-acetil-D, L-racemato en una planta, la cantidad aplicada del racemato estaba en un rango de 15 mM (ver el folleto PCT en la página 17, 2nd párrafo, última parte) y el folleto PCT en la página 15, 2nd párrafo 1st tercio). Cuando se mira estos números, el lector crítico debe tener en cuenta que la cantidad proporcionada se relaciona con la cantidad aplicada a las hojas de una planta y no a la cantidad tomada por la planta o que está presente en la célula de la planta (ver Tabla 4 de la W098/27201).

5. En el caso de *deac1*, una prueba no radiactiva se describe en el folleto PCT que inicia en la página 12, último párrafo. La misma se relaciona con *deac2* (ver Ejemplo 11 del folleto PCT en la página 22). En una clara diferencia con estas pequeñas cantidades que conciernen con el sustrato agregado, se describen concentraciones del sustrato de la presente solicitud de hasta 500 mM y el efecto tremendo de la cantidad incrementada de sustrato se vuelve claramente visible cuando se observa en la Tabla 2 en la página 11 de la presente solicitud. Mirando esta Tabla 2, la relación de conversión a una concentración dada de sustrato de 50 mM de N-Acetil-D, L-PPT se define como 100%. Incrementando la concentración del sustrato a 500 mM sin cambiar cualquier otra condición de reacción, la proporción de conversión baja a 66%.

6. Adicionalmente a la actividad de deacetilasa ya demostrada de las dos deacetilasas dadas que se describieron en W098/27201, en la presente descripción se demostró claramente que esta reacción también tiene lugar a una mucho mayor concentración de sustrato (como 500 mM) y que aún a estas concentraciones que son relevantes para una producción industrial del respectivo L-enantiómero la reacción resulta en aceptables proporciones de conversión.

7. Como resultado de los argumentos arriba establecidos se puede resumir que en W098/27201 no se divulgó nada que vaya más allá de la actividad de deacetilasa de *deac1* y *deac2* en presencia de bajas concentraciones de sustrato pero no se mencionó o sugirió nada concerniente a la aplicación de estas enzimas a una mucho mayor concentración de sustrato (como 500 mM). Tampoco se describe o sugiere en la W098/27201 que una enzima de esta clase en su forma aislada tiene un espacio de vida de por lo menos hasta 55 horas (página 12, Tabla 3, última línea) o 10 días en su forma inmovilizada (página 13, líneas 22-24) pero los cuales son adicionales prerequisites importantes con el fin de usar una enzima tal para la producción preparativa del respectivo L-enantiómero.

8. Iniciando de W098/27201, el problema dado fue adaptar / usar una o más enzimas de deacetilación recombinantes, aisladas, que pertenecen a la clase de las denominadas "Hidrolasas Hipurato", como "deac1" y/o "deac2" para el uso en un proceso a escala industrial con el fin de obtener L-PPT o algunos L-aminoácidos cuando se inicia de los N-acetil-D, L-derivados racémicos del respectivo L-PPT o L-aminoácido (ver la descripción en la página 3, línea 26, continuando en la página 4, línea 22. Con el fin de resolver este problema, la pureza de la enzima (ver Ejemplos 1, 2, y 5) debe incrementarse, los parámetros de la reacción bioquímica conocidos *per se* deben optimizarse (ver el Ejemplo 6) con el fin de llenar los requerimientos *in vitro*, como llevando a cabo el proceso a altas concentraciones de sustrato (como 500 mM en vez de 25 mM) o remover las moléculas de sustrato no convertidas (descripción en la página 4, líneas 3-5 "separando los L-aminoácidos deacetilados obtenidos preparativamente a partir de los no-deacetilados N-acetil-D-derivados y/o los incompletamente deacetilados de N-acetil-L derivados" (ver también página 5, líneas 25-29 y la Reivindicación 1(c) modificada).

9. Un aspecto adicional de la invención puede observarse en la inmovilización recta (manteniendo la reactividad y la estabilidad a largo término) (Ejemplo 6, página 13) de la enzima. Tabla 4 (página 13) por ejemplo divulga que a una concentración de sustrato de 500 mM N-acetil-D, L-PPT y un tiempo de reacción de 10 días a 37°C, se logra una proporción de conversión de 83% (ver página 13, líneas 16-24). Esto realmente muestra el reto de que no solamente el N-actil-D-PPT inerte debe separarse sino además el N-actil-L-PPT no convertido debe separarse del producto pretendido. Nada de esto ni se describe ni se sugiere en W098/27201 sino que se describió por primera vez para esta solicitud especial en la página 5, línea 31 continuando en la página 6, línea 3, que dice en su texto Inglés: "En este contexto, los procesos utilizables son el uso de cromatografía de intercambio de iones en un intercambiador de iones ácido o también la extracción de N-actil-D, L-derivados mediante un solvente orgánico, tal como, por ejemplo, de metil isobutil cetona, el L-aminoácido o el L-PTC producido arriba pasando a la fase acuosa, forma que es entonces concentrada mediante secado."

10. De acuerdo con los elementos discutidos de la anterior reivindicación 10 (dirigida al rango de concentraciones de sustrato [dadas desde 10 a 1 500 mM]) debe eliminarse de las reivindicaciones modificadas. En vez de esta reivindicación separada, el rango de las concentraciones de sustrato empleadas [dadas desde 50 a 1 500 mM] deben ser parte de la nueva reivindicación 1 modificada (ver abajo). Este nuevo rango es soportado por la divulgación de la página 5, líneas 18-23 en combinación con las Tablas 2 y 3 y distingue la invención reivindicada claramente del arte previo, como se citó en la página 2, líneas 12-20 de esta solicitud, que se lee como: "Significativas desventajas de los procesos en las tres solicitudes de patente descritas arriba, sin embargo, consisten en el hecho de que sólo baja concentración de sustrato (alrededor de 0,5% en el caso de la solicitud de patente DE-A-2939269) puede emplearse, por lo cual la aplicabilidad industrial debe lograrse tan baja como, ..."

11. Con el fin de contribuir significativamente en la ubicación de esta solicitud para su aceptación, en adición, basándose en los argumentos anteriores, se ha restringido el rango de la concentración de sustrato dada

en la reivindicación 1(a) a 50 mM hasta 500 mM lo cual está claramente sustentado por la cantidad empleada en los Ejemplos 4 y 6,

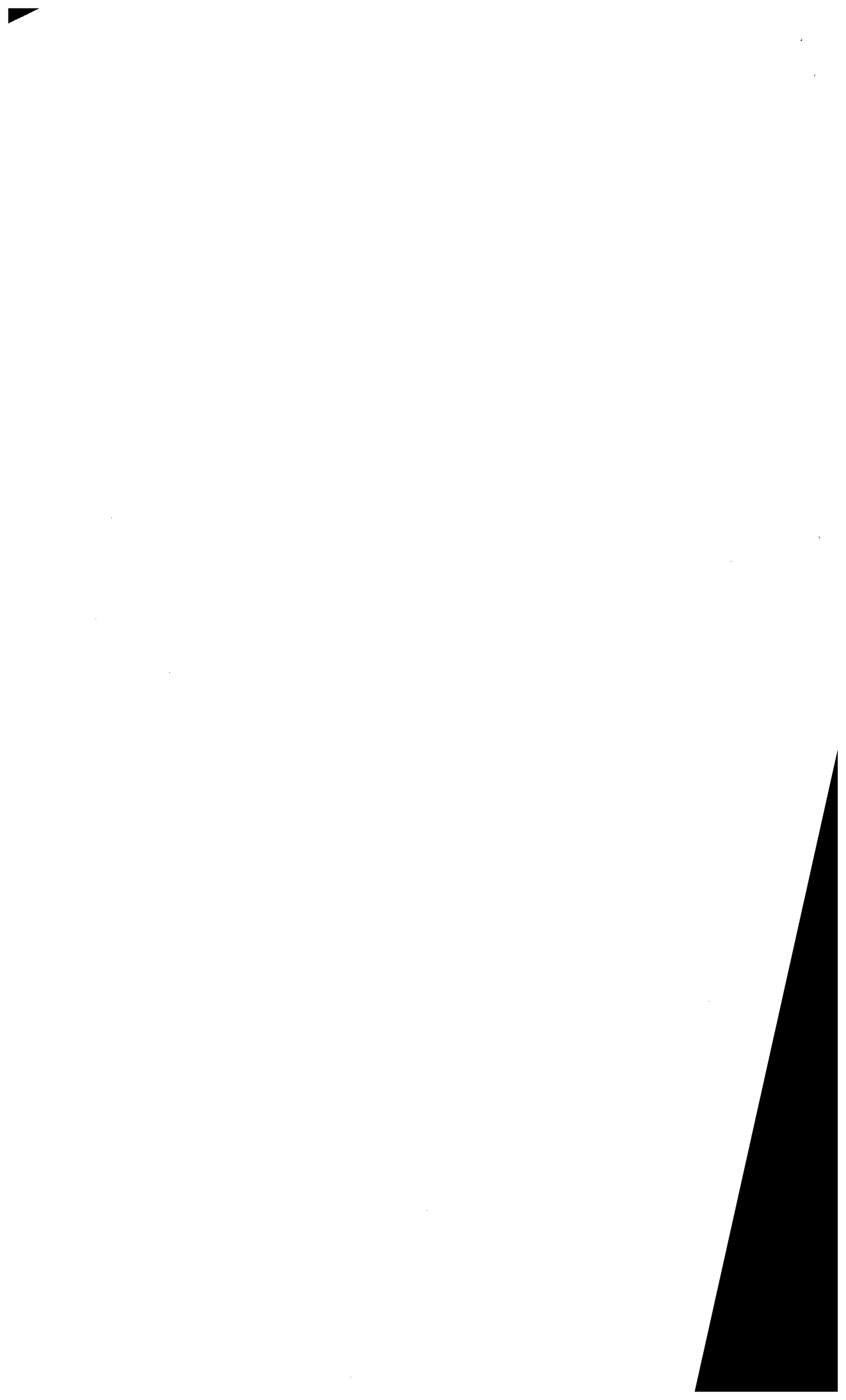
12. Aún una combinación del Documento WO 98/27201 (el cual describe la actividad de deacetilasa de *deac1* y *deac2* bajo condiciones no preparativas) con GB2031896 que describe la separación de L-MPGA de N-Acil-MPGA no hace obvia la materia sujeto de la presente solicitud. Por ejemplo, en GB2031896 sólo se usaron deacetilasas no recombinantes (ver en la página 6, líneas 15-25), y - adicionalmente- en estos ensayos sólo concentraciones bajas de sustrato de L-MPGA se aplicaron para todos los cuales solo un caso de muy pobre o ninguna actividad del uso de N-Acil-Derivados de naturales L-aminoácidos se observaron (página 6, líneas 36-38), lo cual está en total contradicción con los datos dados en la Tabla 1 de la presente solicitud de patente.

ya

ver

13. Una correlación directa de los resultados dados en GB2031896 y aquellos obtenidos en la presente solicitud demuestra claramente el superior resultado espacio/ tiempo de la reacción (columna derecha) el cual es un criterio de eficiencia relevante de un proceso enzimático. En todos los casos las condiciones aplicadas en la presente solicitud son superiores a aquellas descritas en GB2031896.

Ejemplo	Concentración de sustrato N-Acetil D, L-PPT (mg/ml)	Proporción de conversión (%)	Obtenido espacio/tiempo (mg/g/h) <i>ver</i>
1 (biotransformación con células completas)	1,2	68,0	2,9
2 (biotransformación con células completas)	2,0	88,6	3,3
4 (GB2031896 biotransformación con células completas de varias tensiones)	5,0	55,0	4,6
	5,0	73,2	6,1
	5,0	65,4	5,5
	5,0	52,0	4,3
	5,0	45,8	3,8
5 (biotransformación con lisatos de células)	6,0	88,7	5,0



6 (proteína inmovilizada obtenida de células lisadas)	0,8	86,1	1,8
	0,8	85,0	1,8
	0,8	81,2	1,7

Solicitud de Patente Colombiana No.: 00052026

Ejemplo	Concentración de sustrato N-Acetil D, L-PPT (mg/ml)	Proporción de conversión (%)	Obtenido espacio/tiempo (mg/g/h)
1 (células liofilizadas de tensión de recombinante E. coli-deacetilasa-producción	133	66	483
2 (enzima inmovilizada recombinante)	133	83	82

14. Establecido lo anterior, la materia sujeto reivindicada en la presente solicitud no es obvia conociendo solamente WO 98/27201 o partiendo de WO 98/27201 en combinación con GB 2031896. Partiendo de WO 98/27201 en combinación con la información divulgada en EP O 358 428 no hace obvia la materia sujeto de la presente solicitud puesto que la EP O 358 428 solo enseña el uso de enzima no aislada (ver en la página 4, líneas 22-25) o preparaciones de enzima enriquecida como una clase máxima de fraccionamiento (ver en la pagina 10, líneas 15-36). Únicamente varios microorganismos se proporcionan y varios ensayos se describen en donde estos microorganismos se emplean en soluciones de fermentación en crudo.

15. Las proporciones de conversación observadas obtenidas a varias concentraciones de sustrato de aproximadamente 40 mM fueron determinadas como 18% (Ejemplo 2), 15% (Ejemplo 3) 35% (Ejemplo 4) 30% (Ejemplo 5) 25% (Ejemplo 6), 78% (Ejemplo 7), 23% (Ejemplo 8) y 97%-100% (Ejemplo 11).

16. Cuando se usa la misma tensión bacterial que se empleó también en el Ejemplo 11 pero a una concentración de sustrato mayor (208 mM) así

como células inmovilizadas (ver Ejemplo 13 en conexión con el Ejemplo 12), una máxima proporción de conversión (a 40°C) se reportó una bastante pobre proporción de conversión de 24,8% (ver la Tabla respectiva del Ejemplo 13, columna 3), Contrario a lo anterior, en la presente solicitud una proporción de conversión de 83% y por encima se demostró aplicando la aproximación reivindicada, es decir, usando hidrolasas de hipurato recombinante, aisladas, aún a muy altas concentraciones de sustrato como 500 mM.

17. Una vez establecido lo anterior, la materia sujeto reivindicada en la presente solicitud no es obvia a partir de la WO 98/27201 en combinación con la EP O 358 428. Partiendo de WO 98/27201 en vista de la información divulgada en DE 43 08 061, no vuelve obvia la materia sujeto de la presente solicitud. Lo anterior debido a que DE 43 08 061 únicamente divulga el uso de N-Ac-D, L-PPT a concentración a un máximo de 50 mM (0,25 mM [Ejemplo 5.1], 5 mM [Ejemplo 7], 10 mM [Ejemplo 5.2] y 50 mM [Ejemplo 6]. En ninguna parte se ha divulgado estudios cinéticos que puedan proporcionar a la persona experta cualquier clase de información, y si es así, bajo cuales condiciones una conversión bajo condiciones preparativas como bajo concentraciones de sustrato de 500 mM podría llevarse a cabo. Teniendo en cuenta lo anterior, la materia sujeto reivindicada en la presente solicitud no es obvia a partir de WO 98/27201 en combinación con DE 43 08 061.

ESTADO
DE
LA
SOLICITUD

18. Como conclusión de todo lo anterior, se debe establecer que en ninguno de los documentos citados, la requerida alta proporción de conversión (obtenido de espacio/tiempo) de L-PPT o L-aminoácidos a partir de sus correspondientes N-acetil-D, L-precursores a las altas concentraciones de sustrato se han reportado o sugerida. La persona experta en el arte no podría recibir a partir de cualquiera de los documentos citados solo o en combinación de varias de éstas información suficiente con el fin de llevar a cabo la invención tal como se reivindicó.

19. No obstante lo anteriormente expresado, y con el fin de referirse más al uso de mayor concentración de sustrato en vista de las diferencias de la presente solicitud y el arte previo citado, nuestro poderdante considera pertinente proponer una nueva reivindicación 1, la cual remplace a la inicialmente presentada.

En consecuencia se presenta una nueva Reivindicación 1, para remplazar la No. 1 inicialmente presentada.

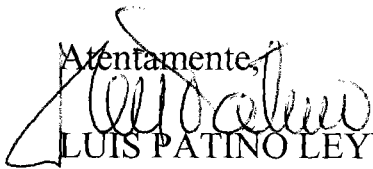
Se mantienen las reivindicaciones 2 a 10 del pliego inicialmente presentado.

Se desiste de las reivindicaciones Nos. 11 a 14 del pliego inicial.

Acompaño al presente memorial la sustitución del Poder a mi favor para este caso.

De la señora Jefe,

Atentamente,


LUIS PATINO LEYVA
CC 2.930.616 de Bogotá
T.P. No. 2698

REIVINDICACIÓN 1 MODIFICADA

1. Un procedimiento para la preparación de L-aminoácidos proteinogénicos o no proteinogénicos a partir de sus derivados racémicos N-acetil-D, L, el cual comprende:

- (a) emplear derivados racémicos N-acetil-D, L a una concentración de desde 50 mM a 1 500 mM,
- (b) deacetilar selectivamente N-acetil-L-derivados de los correspondientes L-aminoácidos mediante una resolución enzimática utilizando hidrolasas de hipurato recombinante, aislado, mientras que los N-acetil-D-derivados de los correspondientes D-aminoácidos no están deacetilados, y
- (c) separar los L-aminoácidos deacetilados obtenidos preparativamente a partir de los N-acetil-L-derivados no deacetilados y/o los N-acetil-L-derivados incompletamente deacetilados.

(9110)
37

G. HOLLMANN RESTREPO
ABOGADOS LTDA.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

REF: Poder otorgado por la sociedad Aventis CropScience GmbH, domiciliada Berlin, Alemania, a GUSTAVO HOLLMANN RESTREPO, con facultades para sustituir y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, aquí incluido.

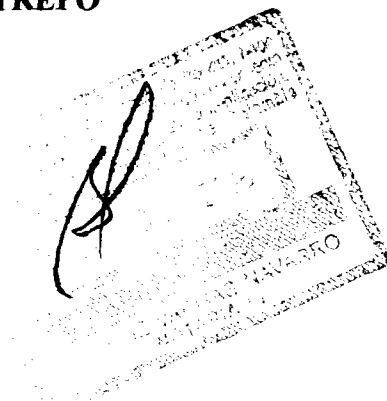
Yo, **GUSTAVO HOLLMANN RESTREPO**, mayor de edad, domiciliado en Bogotá D.C., portador de la tarjeta profesional No. 5903, atentamente digo a usted, que sustituyo el poder con que obro al doctor **LUIS PATIÑO LEYVA**, domiciliado en Bogotá D.C., portador de la tarjeta profesional No. 2698, con las mismas facultades con que me fue conferido para este caso.

Señor Superintendente,


GUSTAVO HOLLMANN RESTREPO
C.C. No. 2.878.023 de Bogotá
T.P. No. 5903

Acepto la sustitución,


LUIS PATIÑO LEYVA
C.C. No. 2.930.616 de Bogotá
T.P. No. 2698



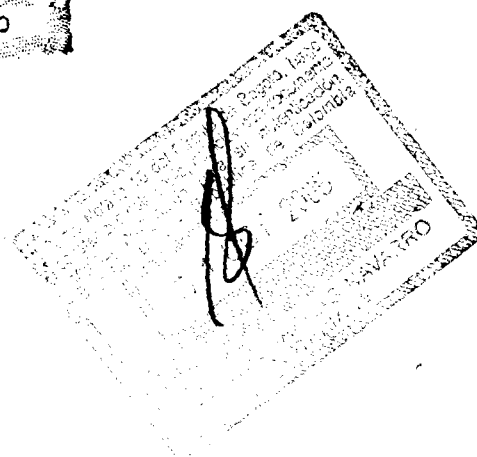
ATENCION DE FIRMAS
MEDIANTE COMPARECENCIA PERSONAL
(Art. 84 C.P.C. mod. Decr. 2282 de 1989, art. 1 mod. 36)
Ante el Notario Cuarenta y Uno (41) del círculo
de esta ciudad compareció personalmente:
Gustavo Hollman
identificado con C.C. 28.980.023
expedida en: 374 y tarjeta profesio-
nal de abogado(a) No. 5905 del Consejo
Superior de la Judicatura, con documento di-
gital Supra ind. en
y declaró que la firma puesta en este escrito es
suya.

Gustavo Hollman
Firma del declarante

13 JUL. 2005

En Bogotá D.C. a

AUTORIZO ESTA DILIGENCIA EL SUSCRITO NOTARIO



92
90
1

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES**

2020
Bogotá, D.C.,

Doctor
GUSTAVO HOLLMANN RESTREPO
(Apoderado)
AVENTIS CROPSOURCE

375
2005-12-09

ASUNTO	Radicación	00-52026
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	430
	Oficio	11700
	Folios	

Como resultado del examen de fondo, realizado con fundamento en el artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica:

Documentos estudiados:

Los textos estudiados fueron la descripción (Folios: 24 a 38) y las reivindicaciones 2 a 14 (folios: 39 a 41).

La nueva reivindicación 1 anexada en el folio 91.

Concepto técnico 1148 de 11 de agosto de 2005.

La respuesta al concepto técnico 1148 de 1 de noviembre de 2005.

La presente solicitud reivindica prioridad alemana N° 199362.9 de 20 de julio de 1999 y cumple con lo establecido en los artículos 9, 10 y 11 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

Objeto de invención:

El objeto de la presente solicitud se refiere a un procedimiento para la producción de L-Aminoácidos a partir de la mezcla racémica de los acilderivados D,L. El procedimiento se caracteriza por el uso de hipurato hidrolasas recombinantes aisladas, que deacilan selectivamente los N-acetil-L- derivados para generar L-aminoácidos. Adicionalmente, el procedimiento comprende la separación preparativa de los L-aminoácidos obtenidos, de los N-acetil-D derivados que no son deacilados y del exceso de N-acetil-L- derivados que no alcanzan a reaccionar.

El objeto de la solicitud definido anteriormente se clasificó en la IPC C12P41/00, C12N15/55, C12N9/80, C12P13/04.

Reivindicaciones de uso:

El artículo 14 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina establece: "Los Países Miembros otorgarán patentes para las invenciones, sean de producto o procedimiento, en todos los campos de la tecnología, siempre que sean nuevas, tengan nivel inventivo y sean susceptibles de

aplicación industrial".

Tal como se mencionó en el concepto 1148, las reivindicaciones 11 a 14 reclaman el uso de una o varias hipurato hidrolasas, para la producción enantio-selectiva de uno o varios L-aminoácidos. Siendo que la Decisión 486 contempla el otorgamiento de patentes para invenciones de producto y procedimiento, más no de uso, las reivindicaciones 11 a 14 no se encuentran dentro del campo de la patentabilidad nombrado en el artículo 14.

Determinación del estado de la técnica:

El artículo 16 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina establece que "El estado de la técnica comprenderá todo lo que haya sido accesible al público por una descripción escrita u oral, utilización, comercialización o cualquier otro medio antes de la fecha de presentación de la solicitud de Patente o, en su caso, de la prioridad reconocida.

Sólo para el efecto de la determinación de la novedad, también se considerará dentro del estado de la técnica, el contenido de una solicitud de patente en trámite ante la oficina nacional competente, cuya fecha de presentación o de prioridad fuese anterior a la fecha de presentación o de prioridad de la solicitud de patente que se estuviese examinando, siempre que dicho contenido esté incluido en la solicitud de fecha anterior cuando ella se publique o hubiese transcurrido el plazo previsto en el artículo 40".

Considerando que la fecha de presentación de la primera solicitud de patente de la cual se reivindica prioridad es: 20de julio de 1999, se buscaron documentos del estado de la técnica relacionados, con fecha de publicación anterior a esta.

Se hizo la búsqueda de documentos relevantes en el estado de la técnica, entendiendo como estado de la técnica la definición provista en el artículo 16 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina y las excepciones fijadas en el artículo 17 de la misma.

Se encontró como anterioridades (documentos cuya fecha de publicación es anterior a la fecha de presentación de la primera solicitud de patente sobre la cual se reivindica prioridad o de la fecha de presentación de esta solicitud) que pueden afectar la patentabilidad del objeto de la presente solicitud:

Nº	Documento	Título	Fecha de Publicación
1	DE4308061	Neue Aminosäure-deacetylase mit Spezifität für L-N-Acetylphosphinotricin, ihre Herstellung und Verwendung.	1994-09-15
2	WO9827201	Novel Genes Coding For Aminoacid Deacetylases With Specificity For N-Acetyl-L-Phosphinothricin, Their Isolation And Their Use.	1998-06-25
3	EP 0358428	Process for producing optically active compounds.	1990-03-14
4	GB2031896	A Process For The Optical Resolution Of D,L-2-Amino-4-Metilphodphinobutiric Acid (L-MPGA)	1980-04-30

Evaluación de los requisitos de Patentabilidad:

El Artículo 14 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina el cual establece: "Los Países Miembros otorgarán Patentes para las invenciones, sean de producto o de procedimiento en todos los campos de la tecnología siempre que sean nuevas, tengan nivel inventivo y sean susceptibles de aplicación industrial".

Se procedió a evaluar los requisitos de novedad, nivel inventivo y aplicación industrial con el fin de establecer la patentabilidad de la invención reivindicada en la solicitud en estudio.

Evaluación de Nivel Inventivo:

El artículo 18 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina establece que "Se considerará 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 Nivel Inventivo se evaluó por comparación entre lo solicitado y encontrado en el estado de la técnica y que se relaciona con el objeto reivindicado y de acuerdo con la definición de nivel inventivo del Artículo 18 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

La reivindicación 1 reclama un procedimiento para la producción de L-aminoácidos a partir de N-acetil D,L-derivados. El procedimiento que está caracterizado por el uso de hipurato hidrolasas recombinantes aisladas, que de-acetilan selectivamente los N-acetil L-derivados para formar L-aminoácidos, con la posterior separación de dichos L-aminoácidos de los N-acetil D-derivados, no de-acetilados y de los N-acetil L-derivados, incompletamente de-acetilados, donde la concentración del sustrato es de 50 a 500mM. La reivindicación 7 reclama el anterior procedimiento donde las enzimas son deac1 de *Stenotrophomonas* sp. y/o deac2 de *comamonas acidovorans*.

Los documentos citados en el concepto técnico 1148 siguen afectando el nivel inventivo de la invención de la siguiente manera:

El documento (WO98 27201) o D2, revela la obtención de N-acetil-fosfinotricin-deacetilasa a partir de *Stenotrophomonas* sp. y *Comamonas acidovorans*. Aún cuando el solicitante insista en que las enzimas usadas en la presente solicitud son "recombinantes", esto no las hace diferentes a aquellas divulgadas en D2, dado que el proceso de obtención de la enzima bien sea aislamiento o producción recombinante, no modifica la identidad de la enzima ni su actividad. Por esta razón, se establece que las enzimas empleadas en la presente solicitud ya habían sido divulgadas en la anterioridad D2, así como su especificidad por los enantiómeros L. lo que sugiere que dicha enzima en mezclas racémicas cataliza únicamente la de-acetilación de la forma L.

El Documento (GB 2031 896) o D4 revela un procedimiento para la resolución de una mezcla racémica de un N-acil derivado de D,L-MPGA empleando una de-acilasa estéreo específica de origen microbiano, la cual tiene una actividad hidrolítica específica ópticamente, que elimina el grupo acil del N-acil-L-MPGA para dar una mezcla de L-MPGA y N-acil-D-MPGA, y la posterior separación de L-MPGA de la mezcla. La separación del producto L-MPGA del sustrato N-acil-D,L-MPGA, se efectúa a través de cromatografía de intercambio iónico hasta alcanzar una pureza del 90%, sin la necesidad de emplear material estereo-específico en la columna para

lograr una separación eficiente del L-aminoácido del derivado N- acil-D MPGA que no reacciona y del exceso de N- acil-L MPGA.

De acuerdo con lo anterior, y siendo que la especificidad enantiomérica de las N-acetil- fosfinotricin-acetilinas provenientes de *Stenothrophomonas* sp. y *Comamonas acidovorans* ya era conocida a partir de D2, la respuesta al problema técnico que se pretendía resolver, que era proveer un proceso para la obtención de L-aminoácidos a partir de las mezclas racémicas de derivados N-acetil -L-D-aminoácidos, resulta obvio para una persona medianamente versada en la materia, quien simplemente podría partir de la enzimas divulgadas en D2, y emplearlas en el procedimiento ya descrito en D4, para efectuar la resolución óptica de derivados acilados de D,L aminoácidos.

Por otra parte cabe mencionar que en la práctica normal de investigación los procedimientos de separación empleando cromatografía de intercambio iónico son comúnmente empleados. Y por ende, el proceso de separación usado en la solicitud en estudio no constituye un aporte significativo al estado de la técnica, más aún cuando existía evidencia que habían sido utilizados en D4 con el mismo propósito con el que se usaron en la presente invención.

La reivindicación 8 de la solicitud en estudio contempla la inmovilización de las desacetilasas. En el ejemplo 6 y en la reivindicación 13 del documento D4, se describe la inmovilización de la enzima sobre DEAE*Sephacel-gel y la deacetilación de N-Acetil-D,L-MPGA con dicha enzima inmovilizada. Como se observa, el objeto de esta solicitud podría resultar obvio para una persona del oficio normalmente versada en la materia y derivarse de manera evidente del estado de la técnica.

La reacción de conversión del procedimiento reclamado (reiv.9) se efectúa a temperaturas iguales a aquellas divulgadas en el estado del arte (D1-D4)

Ahora bien, el solicitante presenta en su respuesta del 1 de noviembre un cambio en el rango de concentraciones de sustrato empleado en el procedimiento reclamado (reiv-10), el cual ahora se encuentra entre 50 y 500mM y argumenta que el presente procedimiento presenta un estudio a escala industrial, y que para ello encontró que es necesario emplear una enzima con una mayor pureza, optimizar los parámetros de reacción y remover el sustrato no transformado del medio de la reacción.

Un técnico en la materia conoce que las enzimas presentan un punto de saturación por sustrato, y es por esto que en los procesos industriales las condiciones de reacción deben ajustarse, a la vez que se recomienda la remoción de sustrato no transformado para evitar dicha saturación (este es el principio de los procesos continuos). Adicionalmente, el rango de concentración de sustrato empleado en el proceso reclamado es tan amplio que no podría decirse que se trata únicamente de un proceso industrial, incluso la concentración de 50mM es cercana a las concentraciones de sustrato empleadas en los ensayos de las anterioridades.

Así mismo, es claro para un profesional en la materia que el escalonamiento de un proceso se logra mediante ensayos sistemáticos y de rutina propios de la actividad investigativa. Por esta razón, los ajustes realizados al proceso derivado de la anterioridad D4 y de las enzimas divulgadas en D2 para dar como resultado el procedimiento reclamado en la presente solicitud, resultan derivados evidentemente del estado de la técnica.

Por otra parte, el solicitante anota que comparando los resultados obtenidos en la anterioridad D4, y la presente solicitud, en esta última se presentan resultados sorprendentes reflejados en un factor denominado "espacio/tiempo". Aún cuando el

solicitante argumente que este parámetro es un criterio de eficiencia relevante en un proceso enzimático, es claro que dicho factor depende directamente de la concentración de L-aminoácido resuelto y teniendo en cuenta que la concentración de sustrato empleada en la presente solicitud es hasta 166 veces mayor a aquella empleada en la anterioridad y haciendo uso de los ajustes descritos anteriormente es de esperarse una cantidad de producto resuelto a la vez muy alto proporcional a la concentración de sustrato. Así pues, que los resultados obtenidos y la magnitud de dicho factor espacio tiempo obtenido no es inesperado, ni representa un salto cualitativo en la formulación de la regla técnica.

Así las cosas, un técnico versado en la materia podría llegar sin ningún nivel inventivo a la solución propuesta en la presente solicitud. Por ende se considera que la invención la presente invención (reivindicaciones 1 a 10) es obvia y se deriva evidentemente del estado de la técnica.

En conclusión los requisitos de patentabilidad de la presente solicitud se encuentran afectados así:

Nº	Documento	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
1	DE4308061	1-10	Nivel inventivo
2	WO9827201	9	Nivel inventivo
3	EP 0358428	9	Nivel inventivo
4	GB2031896	1-10	Nivel inventivo

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de sesenta días contados a partir de la fecha de la notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha 09 Dic 2011

CONCEPTO TÉCNICO Nº: 1945	EXAMINADOR TÉCNICO Código Nº: 202063	EXAMINADOR JURÍDICO Código Nº: N.A.
------------------------------	---	--