



**SOLICITUD DE
ENTE DE
VENCION**

DATOS DEL SOLICITANTE

(71) Nombres y Apellidos o Razón Social Aventis CropScience GmbH

No.de Identificación _____

Representante Legal (Persona Jurídica) _____

País de Domicilio Alemania

Departamento o Estado _____

Dirección _____

Ciudad Berlín

Teléfono _____

(74) DATOS DEL APODERADO

Nombre GUSTAVO HOLLMANN RESTREPO

Dirección y Domicilio Carrera 11A No. 94-76 Of. 308

Ciudad Santafé de Bogotá, D.C.

Teléfono 6161948

DATOS DEL INVENTOR

(72) Nombre del Inventor (es) Dr. Klaus BARTSCH

Identificación _____

Dirección _____

Ciudad Königstein, Alemania

Teléfono _____

DATOS DE LA PATENTE DE INVENCION

(54) Título de la Invención "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE L-AMINOACIDOS A PARTIR DE SUS DERIVADOS N-ACETIL-D,L RACEMICOS MEDIANTE DISOCIACION ENZIMATICA DE RACEMATOS POR MEDIO DE ENZIMAS RECOMBINANTES AISLADAS".

PRIORIDAD REIVINDICADA SI ☒ NO ☐ TIPO DE PRIORIDAD ANDINA ☐ UNIONISTA ☒

(33) País Alemania

(32) Fecha Julio 20, 1999

(31) No. Solicitud 199 33 362.9

Para Publicar a los ☐ 6 meses ☐ 12 meses ☐ 18 meses a partir de la fecha de la presente solicitud

(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL C12 P 41/00

RESUMEN CON EL OBJETO Y LA FINALIDAD DE LA INVENCION

Procedimiento para la preparación de L-aminoácidos a partir de sus derivados racémicos N-acetil-D,L mediante disociación racémica enzimática por medio de enzimas recombinantes aisladas.

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

(a) deacetilar selectivamente los derivados N-acetil-L de los correspondientes L-aminoácidos mediante disociación racémica enzimática por medio de enzimas recombinantes aisladas, mientras que no se deacetilan los derivados N-acetil-D de los correspondientes D-aminoácidos; y

(b) separar de los derivados no-deacetilados N-acetil-D y/o de los derivados N-acetil-L incompletamente deacetilados los L-aminoácidos deacetilados obtenidos preparativamente.

ANEXOS DE LA SOLICITUD

Certificado de Existencia y Representación Legal cuando el solicitante sea Persona Jurídica	☐
Los poderes debidamente otorgados, o mención de su protocolización ante la SIC	☒
Recibo de la tasa respectiva	☒
Recibo de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación	☐
Si se reivindica prioridad Andina:	
Copia de la primera solicitud	☐
Traducción oficial	☐
Si se reivindica prioridad Unionista: Convenio de Paris	
Copia certificada de la primera solicitud:	☒
Nota: Debe presentarse dentro de los tres (3) meses, contados a partir de la fecha de radicación de la solicitud posterior	
Traducción simple	☒
Capítulo descriptivo	☒
Dibujos, planos necesarios	☐
Capítulo reivindicatorio	☒
Tarjeta archivo propietarios según formato	☒
Tarjeta archivo temático según formato	☒
Extracto para publicación según formato	☒
Arte final 12 x 12 cms Y 6x6 cms	☐
Otros Documentos	☐

SOLICITO LA CONCESION DE LA PATENTE DE INVENCION Y DECLARO QUE LA INVENCION ES NUEVA Y DE MI PROPIEDAD

FIRMA

NOMBRE

GUSTAVO HOLLMANN RESTREPO

CC. 2.878.023 de Bogotá

T.P.No. 5903



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Oficina General de Asesoría
Bogotá D.C. 2000000 - 0000000
Sitio Web: www.ica.gov.co
Teléfono: 011 271 31 25 - 31 25 31 25
Dependencia: Oficina de Asesoría y Estudios

BOGOTÁ, D.C. 2000000

BOGOTÁ, D.C. 2000000

BOGOTÁ, D.C. 2000000

BOGOTÁ, D.C. 2000000

BOGOTÁ, D.C. 2000000

BOGOTÁ, D.C. 2000000

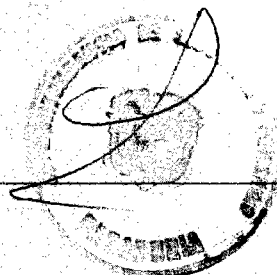
BOGOTÁ, D.C. 2000000

BOGOTÁ, D.C. 2000000

BOGOTÁ, D.C. 2000000

BOGOTÁ, D.C. 2000000

BOGOTÁ, D.C. 2000000



Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5 y 10
Conmutador: 334 12 21
Fax: 281 31 25
Santa Fe de Bogotá, D.C., Colombia



CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA

Fürstenberger Str. 223, 60323 Frankfurt am Main, R.F.A.
Teléfono: 49-69-5963050 * Fax: 49-69-5962080

0340

LA SUSCRITA VICE-CONSUL DE COLOMBIA EN FRANKFURT AM MAIN

CERTIFICA

Que el señor Schlitz ejercía las funciones de Representante del Presidente del Tribunal Regional en Frankfurt am Main en la fecha indicada y su firma corresponde a la registrada en esta Oficina Consular.

Que la empresa Aventis CropScience GmbH es una sociedad constituida de acuerdo con las leyes de la República Federal de Alemania y cumple su objeto conforme a las mismas.

Que los señores Dr. Hans-Christoph Rippel y Dr. Peter Loß, quienes en su calidad de apoderados, y cuyas firmas fueron autenticadas ante el Notario, señor Klaus Armin Knipfer, son sus representantes legales en este país.

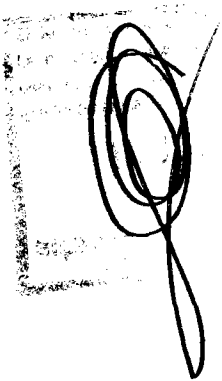
Frankfurt am Main, Junio 26, 2000


MARCELA RODRIGUEZ
VICE-CONSUL DE COLOMBIA



Derechos cancelados:
Impuesto de Timbre:
Fondo Rotatorio:

US\$ 7.00
US\$ 100.00



MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

190636

Marcelo Rodryas

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2000 JUL -6 A 10:13

Mujer

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

G. HOLLMANN RESTREPO

ABOGADOS LTDA.

GENERAL POWER OF ATTORNEY PARA PATENTES, MARCAS Y LICENCIAS FARMACEUTICAS FOR PATENTS, TRADE MARKS AND PHARMACEUTICAL LICENSES

The undersigned

acting on behalf of and representing

Company's
Name

domicilled in

Company's
Domicile

hereby appoint/s

Leave blank

domicilled in Bogotá, Republic of Colombia.

as our true and legal attorneys with the necessary powers; 1) to apply to the administrative, judicial and police authorities of the Republic of Colombia, in any instance or appeal, for obtaining letter patents, industrial designs and models, trademark registrations, registration of commercial names as well as their assignments, extensions, renewals and changes of name; 2) to prepare, apply for, obtain, execute and register contracts, licenses, authorizations and registrations of any kind; 3) to intervene as plaintiffs or defendants, in any instance or appeal, before any judge, court, tribunal, corporation, public offices or authority in any judicial, administrative or police action, such as: actions dealing with commercial names; oppositions against trademark registrations; caducity and nullity actions; recovery actions, actions arising from obtainment and exploitations of licenses; actions dealing with unfair competition; criminal actions; actions claiming indemnity for damages; claims or remarks on patent applications, industrial designs and models; the performance of precautionary measures, and in any other similar action, measures or appeals related to industrial property matters.

To this effect, I (we) hereby authorize him (them) to file applications, make descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, appeals and claims; to pay taxes, quotas and liens as provided by law; to waive or abandon granted rights or rights in process of being granted, to receive all kind of documents and securities; to issue the respective releases and, in general, to take, before said authorities, pertinent steps to the above mentioned purposes and take all measures he (they) may deem convenient to protect my (our) interests, with all other necessary legal faculties, and I (we) hereby declare as good and valid whatever the attorneys should do to my (our) benefit.

This power comprises the authority to ratify or confirm on my (our) behalf any actions, as well as the faculty of receiving, desisting, transacting, compromising, substituting and revoking substitutions, taking notifications and appointing judicial or extrajudicial attorneys.

Signed in Frankfurt/Main ,

On this 4th day of April 2000

Dr. Rippel

Patents and

Signature(s)

Firma(s)

Yo(nosotros)

obrando a nombre y representación de
Aventis CropScience GmbH

con domicilio en

13509 Berlin /Alemania

nombro(amos) a

GUSTAVO HOLLMANN RESTREPO

domiciliado(s) en Bogotá, República de Colombia, en
Cra. 11A No. 94-76 - Of. 308

apoderados verdaderos y legales con poder especial amplio y suficiente: 1) Para recabar de las oficinas y autoridades colombianas, administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, de dibujos y modelos industriales, registro de marcas, depósito de nombres comerciales y enseñanzas, así como sus traspasos, prórrogas, renovaciones y cambios de nombre; 2) elaborar, tramitar, solicitar, obtener, realizar, ejecutar y registrar contratos, licencias, autorizaciones y registros de cualesquiera clases; 3) intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso y ante cualquier juez, entidad, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía, tales como acciones derivadas del nombre comercial, oposición al registro de marcas; acciones de caducidad y nulidad; acciones reivindicatorias; acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales y civiles; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos u observaciones a solicitudes de patentes, modelos y dibujos industriales; en el ejercicio de medidas cautelares y en otras acciones, medidas o recursos similares relacionados con la propiedad industrial.

A este efecto, lo(s) faculto(amos) para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotes y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis (nuestros) intereses, con todas las demás facultades necesarias, y por este documento desde ahora declaro(amos) válido y bueno todo cuanto los apoderados hicieren en mi (nuestro) beneficio.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi(nuestro) nombre lo actuado, así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, sustituir y revocar sustituciones, recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Firmado en

el de

Aventis CropScience GmbH

Dr. Loss

Signature(s)

Firma(s)

Licenses, Frankfurt

CONSULAR CERTIFICATION

COMPANIES

The undersigned Consul certifies; that the preceding
signature(s) reading
Dr. Rippel; Dr. Loss

is (are) authentic; that the signer(s) at present fills
(fill) the position of

Patents and Licenses

Corporation
Company's

of

Aventis CropScience GmbH

that he (they) is (are) empowered to grant this power;
and that said company exists and is organized in

13509 Berlin
in accordance with the laws of

Germany

All the foregoing facts are known to the Consul due to
his having examined the respective documents to which
he, the Consul, attests.

Signed in

On this day of

CERTIFICACION CONSULAR

SOCIEDADES

El infrascrito Cónsul certifica: que la(s) firma(s)
antecede(n) y dice(n)

es(son) auténtica(s); que el(los) signatario(s) desempe-
ña(n) actualmente el(los) cargo(s) de

de

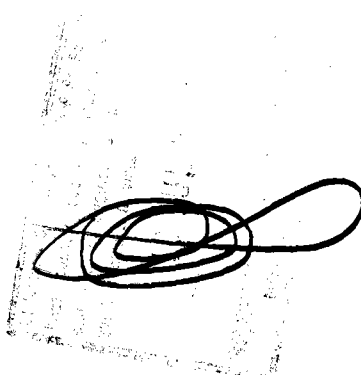
que tiene(n) facultad para otorgar este poder; y que dicha
compañía existe y está organizada en

conforme a las leyes de

Todos los hechos anteriores le constan, por haber
i-
nado los documentos respectivos y de todo ello da fe.

Firmado en

El de de

A handwritten signature in dark ink is written over a rectangular official stamp. The signature is a cursive, looping scribble. The stamp is mostly illegible but appears to contain some text and possibly a date or reference number.

xx

Die Hoechst Schering AgrEvo GmbH
ist nunmehr umfirmiert in Aventis
CropScience GmbH. Die Eintragung im
Handelsregister B Nr. 31850 des
Amtsgerichts Charlottenburg er-
folgte am 01.03.2000

Nummer 152 der Urkundenrolle für das Jahr 2000

Die vorstehenden vor mir anerkannten Unterschriften von

1. Herrn Dr. Hans-Christoph Rippel Aventis CropScience GmbH
dienstansässig: ~~Hoechst Schering AgrEvo GmbH~~
Patent und Lizenzabteilung
65926 Frankfurt/M.

-von Person bekannt-

2. Herrn Dr. Peter Loß Aventis CropScience GmbH
Dienstansässig: ~~Hoechst Schering AgrEvo GmbH~~
Patent und Lizenzabteilung
65926 Frankfurt/M.

-von Person bekannt-

beglaubige ich hiermit.

In meiner Eigenschaft als Notar bestätige ich die Unter-
schriftsberechtigung des Herrn Dr. Hans-Christoph Rippel für
die Bereiche Patente und Warenzeichen der Hoechst Schering
AgrEvo GmbH, erteilt am 02.05.1998 durch die Hoechst Schering
AgrEvo GmbH.

xx

Frankfurt/M

den 04. April 2000

Notar

Kostenrechnu.	DM 10.000,00
Geb. § 45 I KostO	DM 20,00
16 % MwSt.	DM 3,20
	DM 23,20
	=====

Notar

Dr. Rippel

Dr. Loss

Patents and

Signature(s)
Firma(s) Licenses, Frankfurt

Die Echtheit vorstehender Unterschrift des

Notars

Krupp

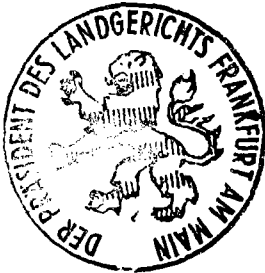
und die Echtheit des beigedruckten Dienststempels wird hiernit bestätigt.

Zugleich wird beurteilt, daß der Vorgenannte zur Vornahme der Amtshandlung befugt war.

Frankfurt am Main, den 16. Mai 2000

DER PRÄSIDENT DES LANDGERICHTS

In Vertretung



[Handwritten signature]
[Illegible text]

[Handwritten scribble]

6

DR. STÖCKLE · DR. WEYL · A. KNIPFER
NOTARE

Dr. Walther Weyl †
Dr. Karl Stöckle †
Armin Knipfer
Meinolf F. Nierhof
- Rechtsanwälte -

Königsteiner Straße 139
65929 Frankfurt/M.-Höchst
Telefon 069/30 09 52 - 0
Telefax 069/30 09 52 - 22
Gerichtsfach 430

Dr. Stöckle & Partner · Königsteiner Straße 139 · 65929 Ffm.-Höchst

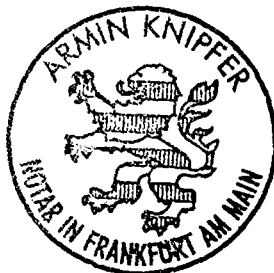
19.06.2000

Datum:
Durchwahl: 30 09 52 - 15
Unser Zeichen (bitte stets angeben):

Bescheinigung in Ergänzung zu meiner UR 152/2000

Hiermit bestätige ich in Ergänzung der Vertretungsbescheinigung vom 04. April 2000 -UR 152/2000-, dass der Unterzeichner Herr Dr. Peter Loß gleichfalls für die Bereiche Patente und Warenzeichen der Hoechst Schering AgrEvo GmbH -Ermächtigung erteilt am 27.11.1998 durch die Hoechst Schering AgrEvo GmbH-unterschriftsberechtigt ist.

Frankfurt/M.-Höchst, den 19. Juni 2000




Knipfer, Notar



7

Traducción oficial del alemán de las autenticaciones de firmas y de las certificaciones adjuntas al poder que la compañía Aventis CropScience GmbH domiciliada en Berlín, República Federal de Alemania, otorga a Gustavo Hollmann Restrepo.

La compañía Hoechst Schering AgrEvo GmbH cambió su razón social y ahora se llama Aventis CropScience GmbH. La correspondiente anotación en el Registro Comercial HRB No. 31850 del Juzgado Municipal de Charlottenburg se efectuó el 01.03.2000.

Registro Notarial Número 152 para el año 2000

Por medio de este documento autentico las firmas que aparecen anteriormente, reconocidas como propias en mi presencia por

1. Señor Dr. Hans-Christoph Rippel,

domicilio comercial: Aventis CropScience GmbH

Departamento de Patentes y Licencias

65926 Frankfurt/Main

2. Señor Dr. Peter Loss,

domicilio comercial: Aventis CropScience GmbH

Departamento de Patentes y Licencias

65926 Frankfurt/Main

a quienes yo, el suscrito Notario, conozco personalmente.

Al mismo tiempo, en mi calidad de Notario, confirmo la autorización del Señor Dr. Hans-Christoph Rippel para firmar por el Area de Patentes y Marcas de Hoechst Schering AgrEvo GmbH otorgada el 02.05.1998 por Hoechst Schering AgrEvo GmbH.

Frankfurt/Main, 4 de Abril del 2000

ARMIN KNIPFER, Notario en Frankfurt am Main

(Firma y Sello Oficial)

------(continúa en la 2ª página)-----

Nota de gastos: Valor del negocio = DM 10.000,00

Impuesto Artículo 45I Disp. Impuestos DM 20,00

16% Impuesto sobre el Valor Agregado DM 3,20

Total DM 23,20

Armin Knipfer, Notario

(firma)

Por medio de este documento se confirma la autenticidad de la firma que aparece anteriormente, perteneciente al Notario Knipfer en Frankfurt am Main y también la autenticidad del sello oficial que aparece al lado de dicha firma.

Al mismo tiempo se certifica que la persona mencionada se encontraba legalmente autorizada para la ejecución de ese acto oficial.

Frankfurt am Main, 16 de Mayo del 2000

Schlitz

Representante del Presidente del Tribunal Regional

(Firma y Sello Oficial)

----- (continúa en la 3ª página) -----

DR. STÖCKLE - DR. WEYL - A. KNIPFER

NOTARIOS

19.06.2000

Certificación complementaria al Reg. Notarial 152/2000

Por medio de este documento, complementariamente a la certificación de representación del 4 de Abril del 2000 -Registro Notarial 152/2000, confirmo que el signatario Señor Dr. Peter Loss también está autorizado para firmar por el Area de Patentes y Marcas de Hoechst Schering AgrEvo, según consta en el poder otorgado el 27.11.1998 por Hoechst Schering AgrEvo GmbH.

Frankfurt/Main-Höchst, 19 de Junio del 2000

ARMIN KNIPFER, Notario en Frankfurt am Main
(Firma y Sello Oficial)



El documento traducido del alemán fue legalizado bajo el No. 190636 el día 6 de Julio del 2000 en la Oficina de Legalizaciones del Ministerio de Relaciones Exteriores.



ADOLF WATZKE
Traductor Oficial
Res. 2433 Minjusticia

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

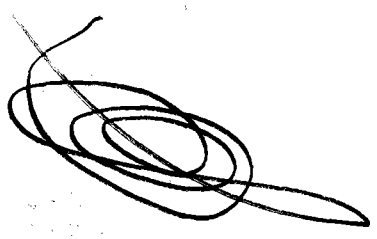
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS

092345

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD POR EL TEXTO

2000 JUL 10 A las 38

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.



BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Bescheinigung

Die Hoechst Schering AgrEvo GmbH in Berlin/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren aus ihren racemischen N-Acetyl-D,L-Derivaten durch enzymatische Racemat-Spaltung mittels isolierter, rekombinanter Enzyme"

am 20. Juli 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Der Firmenname der Anmelderin wurde geändert in:

Aventis CropScience GmbH.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol C 12 P 41/00 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 10. Mai 2000

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

A handwritten signature in black ink, likely belonging to the President of the German Patent and Trademark Office.

Aktenzeichen: 199 33 362.9

Weihmayer

Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren aus ihren racemischen
N-Acetyl-D,L-Derivaten durch enzymatische Racemat-Spaltung mittels isolierter,
5 rekombinanter Enzyme

- Die Erzeugung der nicht-proteinogenen Aminosäure L-PPT (L-Phosphinothricin) durch Racemat-Trennung ist bisher mit hoher Reinheit und Ausbeute nur durch Spaltung von Phenacetyl Phosphinothricin mit Penicillin-G-Acylase aus *Escherichia*
10 *coli* beschrieben worden (DE-A-3048612). Die Synthese von Phenacetyl-PPT ist aber im Vergleich zu N-Ac-PPT aufwendiger und teurer. Jedoch besitzt Penicillin-G-Acylase keine Spezifität für aliphatische Acylreste und somit auch nicht für N-Ac-PPT. Andere bekannte Acylasen haben ebenfalls keine oder nur geringe Substratspezifität für N-Ac-PPT und wurden bisher nur in mikrobiellen
15 Biotransformationen ohne Aufreinigung der Enzyme eingesetzt (wie z.B. in DE-A-2939269 beschrieben). Dadurch waren nur sehr geringe Raum/Zeit-Ausbeuten erreichbar. Aus der Patentanmeldung EP-A-0382113 ist die L-spezifische Spaltung von N-Ac-PPT Carbonsäureestern durch Acylase I bekannt. Auch dieses Enzym hat jedoch keine Spezifität für die freie Carbonsäure und erfordert deshalb eine
20 Veresterung als zusätzlichen Syntheseschritt bei der Substratbereitstellung.

- Die Patentanmeldung DE-A-19652284 beschreibt die gezielte Isolierung von mikrobiellen Deacetylasen aus Bodenproben mit Spezifität für N-Acetyl-Aminosäuren, vorzugsweise N-Acetyl-Phosphinothricin (N-Ac-PPT), sowie die
25 Klonierung der korrespondierenden Gene aus *Stenotrophomonas sp.* und *Comamonas acidovorans*.

- Aufgrund der gefundenen Sequenzhomologien und der durchgeführten Substratspezifitätstests konnte gezeigt werden, daß die beschriebenen Deacetylasen zur Gruppe der Hippurat-Hydrolasen (EC 3.5.1.32) gehören, deren
30 natürliches Substrat N-Benzoyl-Glycin, ein Aminosäure-Derivat mit einer aromatischen N-Acylfunktion ist. Daher war es interessant, daß diese Enzyme auch N-acetylierte Aminosäuren, insbesondere N-Acetyl-Phosphinothricin, als Substrat

akzeptieren können, wobei es sich um Aminosäure-Derivate mit aliphatischen N-Acyfunktionen handelt. Aus den Patentanmeldungen DE-A-2939269 und DE-A-2717440 ist bekannt, daß die herbizide Wirkung von racemischem Phosphinothricin allein von dessen L-Enantiomer (L-PPT) ausgeht.

- 5 In diesem Zusammenhang war es interessant, daß die gefundenen Deacetylasen ausschließlich die L-Enantiomere von N-Acetyl-PPT, sowie von N-Acetyl-Derivaten einiger proteinogener Aminosäuren mit hoher Spezifität spalten. Daher eignen sich diese Enzyme ausgezeichnet zur Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere des herbiziden Wirkstoffs L-Phosphinothricin, aus deren racemischen N-Acetyl-
- 10 Derivaten nach dem Prinzip der Racemat-Spaltung, wie es z.B. in den Patentanmeldungen EP-A-0304021, DE-A-2939269 und DE-A-3048612 beschrieben wird. Wesentliche Nachteile der Verfahren in den drei vorangehend beschriebenen Patentanmeldungen bestehen jedoch darin, daß (1) nur geringe Substratkonzentrationen (ca. 0.5% im Falle der Patentanmeldung DE-A-2939269))
- 15 eingesetzt werden können, wodurch eine technische Eignung als gering zu bewerten ist, daß (2) mit nicht isolierten Enzymen gearbeitet wird, wodurch sich die Problematik von Nebenreaktionen und anschließender Aufreinigungsschritte nicht oder nur sehr kostenintensiv lösen läßt und daß (3) eine kostenintensive Produktbereitstellung notwendig ist (wie im Falle der Patentanmeldung DE-A-
- 20 3048612).

- Die der Erfindung zugrunde liegende Aufgabe liegt darin, eine oder mehrere neue Deacetylasen (wie in DE-A-19652284 bereits charakterisiert) in geeigneter Form und Menge zu exprimieren, und es mit Hilfe dieser Enzyme zu ermöglichen, L-PPT sowie
- 25 einige proteinogene L-Aminosäuren aus den chemisch sehr einfach zugänglichen racemischen N-Acetyl-D,L-Derivaten durch Racemat-Spaltung mit hoher Ausbeute und Enantiomerenreinheit herzustellen.

- Für den Fall, daß die enzymatische Aktivität bereits annähernd bekannt ist, und in dem auch bereits eine Klonierung der das Enzym codierenden Nukleinsäuresequenz
- 30 erfolgt ist, besteht die erste Tätigkeit darin, das entsprechende

Nukleinsäurefragment in einen geeigneten Vektor zu überführen, um dann entweder eine Überproduktion in einem geeigneten Bakterienstamm durchzuführen, und/oder um das Protein nach der Überexpression zu isolieren. Das so isolierte Enzym kann entweder direkt zur enzymatischen Reaktion verwendet werden oder aber über
5 geeignete Kopplungsgruppen an eine Matrix fixiert werden.

Eine erster enzymatischer Test ist empfehlenswert, um die generelle Bestätigung zu erhalten, ob die gewünschte Reaktion abläuft. Alle weiteren Schritte dienen der
10 Parameteroptimierung hinsichtlich der Reaktionsspezifität (bezogen auf Edukt und Produkt), der Reaktionsgeschwindigkeit, der Reaktionseffizienz, der Halbwertszeit des eingesetzten Enzyms, sowie der möglichen Substratkonzentrationen. Für den Fall, daß einzelne Parameter nicht genau den Anforderungen entsprechen, ist man in der Lage, geeignete Veränderungen an der das Enzym kodierenden
15 Nukleinsäuresequenz vorzunehmen, die eine weitere Optimierung des vorhandenen natürlichen Enzyms zur Folge haben.

Die Klonierung einzelner verwendeter Deactylasen wurde bereits in der Anmeldung DE-A-19652284 beschrieben. Die für die entsprechenden Deacetylasen
20 kodierenden Nukleinsäurefragmente wurden wie im Beispiel 1 weiter unten ausgeführt in die entsprechenden Expressionsvektoren umklontiert, um somit ein notwendiges Maß an eindeutiger Substratspezifität und die Abwesenheit von Nebenreaktionen sicherzustellen. So konnte in der Anmeldung DE-A-19652284 zwar gezeigt werden, daß N-Acetyl-L-PPT deacetyliert wird, jedoch konnte nicht gezeigt werden, daß N-Acetyl-D-PPT nicht ebenfalls deacetyliert wird. Die ausschließliche
25 Umsetzung von N-Acetyl-L-Aminosäuren und N-Acetyl-L-PPT stellt jedoch eine elementare Vorbedingung für die hier beabsichtige technische Verwendung dar.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von proteinogenen oder nicht-proteinogenen L-Aminosäuren aus deren racemischen N-Acetyl-D,L-Derivaten
30 dadurch gekennzeichnet, daß

(a) durch eine enzymatische Racemat-Spaltung mittels isolierter, rekombinanter Enzyme selektiv N-Acetyl-L-Derivate der korrespondierenden L-Aminosäuren deacetyliert werden, während N-Acetyl-D-Derivate der korrespondierenden D-Aminosäuren nicht deacetyliert werden

und

(b) die erhaltenen deacetylierten L-Aminosäuren präparativ von den nicht deacetylierten N-Acetyl-D-Derivaten und/oder den nicht vollständig deacetylierten N-Acetyl-L-Derivaten getrennt werden.

Die Erfindung betrifft insbesondere ein Verfahren zur Herstellung von L-Phosphinothricin (L-PPT) aus N-Acetyl-D,L-Phosphinothricin durch enzymatische Racemat-Spaltung mittels isolierter, rekombinanter Enzyme.

Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von L-Glutaminsäure, L-Histidin, L-Leucin, L-Glutamin und/oder L-Phenylalanin aus deren korrespondierenden N-Acetyl-D,L-Derivaten durch enzymatische Racemat-Spaltung.

Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren, das dadurch gekennzeichnet ist, daß die enantioselektive Erzeugung einer oder mehrerer L-Aminosäuren aus deren korrespondierenden racemischen N-Acetyl-D,L-Derivaten mit einer oder mehreren Deacetylasen aus der Gruppe der Hippurat-Hydrolasen durchgeführt wird, wobei insbesondere die enantioselektive Erzeugung von L-Phosphinothricin, L-Glutaminsäure, L-Histidin, L-Leucin, L-Glutamin und/oder L-Phenylalanin aus deren korrespondierenden racemischen N-Acetyl-D,L-Derivaten mit einer oder mehreren Deacetylasen aus der Gruppe der Hippurat-Hydrolasen durchgeführt wird.

Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren, das dadurch gekennzeichnet ist, daß die enantioselektive Erzeugung einer oder mehrerer L-Aminosäuren aus deren korrespondierenden racemischen N-Acetyl-D,L-Derivaten mit den Enzymen *deac 1* aus *Stenotrophomonas sp.* und/oder *deac 2* aus *Comamonas acidovorans* (beide

Deacetylasen sind in DE-A-19652284 beschrieben) durchgeführt wird, und hierbei ganz besonders die Verfahren, die dadurch gekennzeichnet sind, daß die enantioselektive Erzeugung von L-Phosphinothricin, L-Glutaminsäure, L-Histidin, L-Leucin, L-Glutamin und/oder L-Phenylalanin aus deren korrespondierenden

5 racemischen N-Acetyl-D,L-Derivaten mit den Enzymen *deac 1* aus *Stenotrophomonas sp.* oder/und *deac 2* aus *Comamonas acidovorans* (beide Deacetylasen sind in DE-A-19652284 beschrieben) durchgeführt wird. Beide Enzyme weisen eine signifikante Sequenzhomologie auf, die eine identische oder zumindest ähnliche Funktion bei der Spaltung von N-Acetyl-D,L-Derivaten ergeben.

10

Des weiteren betrifft die Erfindung die Verwendung der erzeugten rekombinanten Deacetylasen als Biokatalysatoren, die es erlauben, die entsprechenden Reaktionen mit hohen Substratkonzentrationen und/oder der Erzielung hoher Raum/Zeit-Ausbeuten durchzuführen, insbesondere unter Verwendung der rekombinanten

15 Deacetylasen in immobilisierter Form.

15

Weiterhin betrifft die Erfindung die Durchführung der oben beschriebenen Verfahren bei Reaktionstemperaturen von etwa 25°C bis 65°C, bevorzugt bei Reaktionstemperaturen von etwa 30°C bis 45°C und besonders bevorzugt bei

20 Reaktionstemperaturen von etwa 35°C bis 40°C.

20

Des weiteren betrifft die Erfindung die Durchführung der oben beschriebenen Verfahren bei Substratkonzentrationen von etwa 10 mM bis 1500 mM, bevorzugt bei Substratkonzentrationen größer als 50 mM, besonders bevorzugt bei

25 Substratkonzentrationen größer als 250 mM und ganz besonders bevorzugt bei Substratkonzentrationen größer als 500 mM.

25

Weiterhin betrifft die Erfindung die Trennung der mit Hilfe der oben beschriebenen Schritte erzeugten L-Aminosäure oder des L-PTC von den korrespondierenden N-Acetyl-D,L-Derivaten, die entweder - wie im Falle von N-Acetyl-D-Derivat - nicht oder

30 - wie im Falle von N-Acetyl-L-Derivat - nicht vollständig umgesetzt worden sind.

30

Nutzbare Verfahren sind hierbei die Verwendung der Ionenaustauscherchromatographie an einem sauren Ionenaustauscher oder aber die Extraktion der N-Acetyl-D,L-Derivate mittels eines organischen Lösungsmittels, wie beispielsweise von Methylisobutylketon, wobei die vorangehend erzeugte L-Aminosäure oder das L-PTC in die wäßrige Phase übergeht, aus der es dann durch Trocknung aufkonzentriert wird.

Beispiele:

1. Produktion des *deac*-Enzyms als rekombinantes Protein in *Escherichia coli*:

Das *deac* 1-Strukturgen aus *Stenotrophomonas sp.*, codierend für eine N-Ac-PPT-spezifische Deacetylase, wurde als 1,4-kb BamHI/SalI Fragment (beschrieben in DE-A-19652284) in die Bam HI/Sal I-Schnittstelle des HisTag-Expressionsvektor pQE30 der Firma Quiagen kloniert [Quiaexpress Kit, Type IV, Katalog Nr. 32149, Stüber et al. (1990), in: Immunological Methods, Lefkovits, I. and Pernis, B., eds., vol. IV, Academic Press, New York, pp. 121-152].

Alle molekularbiologischen Arbeiten wurden nach Standardprotokollen durchgeführt, wie z.B. bei Ausubel et al. (1995), Current protocols in molecular biology, John Wiley and Sons, New York, beschrieben. Das religierte Konstrukt wurde in den vom Hersteller (Qiagen) empfohlenen Bakteriestamm *E. coli* M15 transformiert, und rekombinante Klone wurden auf 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin selektiert. Die Expression von rekombinantem Fusionsprotein wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Zellen wurden 4-5 h nach Induktion abgeerntet und bis zur Aufarbeitung des Proteins bei -20°C aufbewahrt.

Durch SDS/Polyacrylamid-Elektrophorese von Zellaliquots der induzierten Klone konnte das HisTag-*deac*1-Fusionsprotein als zusätzliche Bande von 49-kDa nachgewiesen werden.

Der Nachweis der enzymatischen Aktivität des Deacetylase-Fusionsproteins erfolgte im radioaktiven Assay mit [¹⁴C]-N-Acetyl-L-PPT als Substrat. Dazu wurden je 200 µl

der induzierten Kulturen mit 0,5 % Toluol, 0,5 % Ethanol für 30 min. bei 37°C permeabilisiert. Die Zellpellets wurden anschließend in je 25 µl 0,1 mM [¹⁴C]-N-Acetyl-L-PPT, 10 mM NaCl, 10 mM NaPhosphat, pH = 7,5 resuspendiert und für 1 h bei 37°C inkubiert. Zur qualitativen Bestimmung des gebildeten [¹⁴C]-L-PPT wurden

5 je 5 µl Aliquots der Testansätze durch Dünnschichtchromatographie auf HPTLC-Zellulose-Platten (Merck) mit n-Propanol : 25 % Ammoniak = 3 : 2 als Laufmittel analysiert. Die radioaktiven Banden wurden durch Autoradiographie auf Röntgenfilm sichtbar gemacht.

Zur Quantifizierung der Enzymumsetzung wurden die Testansätze in der Radio-

10 HPLC mit Spherisorb® SAX als Trennsäule gemessen (Laufmittel: 5 mM KH₂PO₄, 10 % Methanol, pH = 1,92, Flußrate: 0,5 ml/min.). Unter diesen Bedingungen eluiert [¹⁴C]-L-PPT bei 4,5 min. und [¹⁴C]-N-Acetyl-L-PPT bei 6,5 min.

Der Expressionsklon mit der höchsten N-Acetyl-L-PPT-spezifischen Deacetylase-Aktivität produziert das Deacetylase-Protein gemäß einer semiquantitativen

15 Bestimmung mit einem Anteil von ca. 10 % am Gesamtprotein und wurde für die Enzymreinigung und die nachfolgend beschriebenen Biotransformationen verwendet.

2. Reinigung der Deacetylase durch Affinitätschromatographie:

20 Die Isolierung des Deacetylase-Proteins aus dem nach der im Beispiel 1 beschriebenen Klonierung neu benannten Expressionsstamm pQEDEAC erfolgte nach Quiagen Protokoll (Qiaexpress-Kit) durch Affinitätschromatographie an Nickel-Nitrilotriacetat-Matrix (Ni-NTA) unter nativen Bedingungen. Dazu wurden 800 ml

25 Kultur des Expressionsstammes pQEDEAC wie in Beispiel 1 beschrieben fermentiert und induziert. Das geerntete Zellpellet (4 g) wurde in 20 ml Lysispuffer resuspendiert und mit Ultraschall aufgeschlossen. Nach Abzentrifugieren wurde das klare Proteinlysate (120 mg Gesamtprotein) mit 4 ml 50 % iger Ni-NTA-Suspension zur Bindung des HisTag-Fusionsproteins versetzt und das Material anschließend auf

30 eine Enzymsäule geladen. Die Affinitätsmatrix wurde mit 10 Volumen Waschpuffer gewaschen und dann mit 4 ml Elutionspuffer eluiert. Zur Überprüfung der

Affinitätsreinigung wurden Aliquots des Zellaufschlusses, der Waschlösungen und des Eluats mittels SDS/Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert. Die Deacetylase-Aktivität der verschiedenen proteinhaltigen Fraktionen wurde mit den in Beispiel 1 beschriebenen radioaktiven Assays bestimmt (Reaktionsansätze: 9 µl Proteinlösung + 1 µl 1 mM [^{14} C]-N-Acetyl-L-PPT, Reaktionsbedingungen: siehe oben). Zur quantitativen Enzymbestimmung wurden die Proteinfractionen mit 50 mM N-Acetyl-D,L-PPT (9 µl Proteinlösung + 1 µl 500 mM N-Acetyl-D,L-PPT) für 30 min. bei 37°C inkubiert. Das entstandene PPT wurde anschließend im Aminosäureanalysator (Biotronic LC 5001) gemessen.

Das Protein im Rohextrakt nach Zellaufschluß hatte eine spezifische Deacetylase-Aktivität von 3 nkat/mg Protein (1 nkat = 1 nmol Substrat/sec.). Aus 800 ml Kultur des Expressionsstammes konnten durch Affinitätschromatographie 10 mg HisTag-deac-Fusionsprotein mit einer spezifischen Aktivität von 20 nkat/mg Protein und einer Reinheit von ca. 80 % isoliert werden.

3. Substratspezifität und Stereoselektivität der Deacetylase:

Zur Untersuchung von Substrat- und Stereospezifität des deac1-Proteins wurden je 5 µg gereinigtes Enzym in 20 µl Ansätzen in 10 mM NaCl, 10 mM NaPhosphat, pH = 7,5 mit je 25 mM der in Tabelle 1 genannten N-Acetyl-L-Aminosäuren bzw. der entsprechenden D-Enantiomere inkubiert. Zum Vergleich wurde Hippursäure (N-Benzoyl-Glycin), das natürliche Substrat der Deacetylase, eingesetzt. Die Reaktionen wurden für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend auf Bildung der freien Aminosäuren im Aminosäureanalysator gemessen (Biotronic LC 5001).

Tabelle 1 gibt die relativen Deacetylase-Aktivitäten für die L-Enantiomere der verschiedenen Substrate an. Neben Hippursäure und N-Ac-L-PPT spaltet das deac1-Enzym auch noch die N-Acetyl-Derivate einer Reihe natürlicher Aminosäuren, insbesondere N-Ac-L Glutaminsäure, N-Ac-Glycin, N-Ac-L-Histidin, N-Ac-L-Ornithin, N-Ac-L-Leucin, N-Ac L-Glutamin und N-Ac-L-Phenylalanin. In allen Fällen war das Enzym ausschließlich mit den L-Enantiomeren aktiv, während die entsprechenden D-Verbindungen in keinem Fall umgesetzt werden konnten. In allen anderen

getesteten Fällen (siehe Tabelle 1) fand die Umsetzung der N-Acetyl-L-Derivate nur in einem sehr geringen Maß oder aber überhaupt nicht statt.

Tabelle 1: Substratspezifität des *deac*-Enzyms

5

Substrat ¹	Rel. Aktivität ² [%]
Hippursäure (N-Benzoyl-Glycin)	100
N-Ac-L-Phosphinothricin	43
N-Ac-L-Ornithin	37
N-Ac-L-Methionin	0
N-Ac-L-Tryptophan	0,4
N-Ac-L-Phenylalanin	24
N-Ac-L-Tyrosin	11
N-Ac-L-Glutaminsäure	100
N-Ac-L-Glutamin	30
N-Ac-Glycin	59
N-Ac-L-Histidin	43
N-Ac-L-Leucin	33
N-Ac-L-Valin	2
N-Ac-L-Serin	4
N-Ac-L-Prolin	0

¹ Bei allen Verbindungen handelt es sich um die L-Enantiomere

² Die mit Hippursäure gemessene spezifische Aktivität [nmol Glycin/min./mg Protein] wurde gleich 100 % gesetzt, und die anderen Werte wurden darauf bezogen

4. Racemat-Spaltung von N-Acetyl-D,L-Phosphinothricin durch Biotransformation mit Zellen des *deac*-Produzentenstammes:

- 5 Eine 400 ml Kultur des Expressionsstammes pQEDEAC wurde, wie in Beispiel 1 beschrieben, fermentiert und induziert. Die geernteten Zellen wurden anschließend in 10 mM NaCl, 10 mM NaPhosphat, pH = 7,5 gewaschen und über Nacht lyophilisiert. Die so behandelten Zellen konnten über mehrere Wochen bei 4°C unter Beibehaltung einer hohen spezifischen Deacetylase-Aktivität gelagert werden und
- 10 dienten in den folgenden Versuchen als Biokatalysator.
2 mg der lyophilisierten Zellen wurden in 1 ml der folgenden Substratlösungen variierender Konzentrationen resuspendiert:
- | | | | | |
|----|-----|--------|----------------------------------|----------|
| | (1) | 10 mM | N-Acetyl-D,L-PPT, Dinatrium-Salz | (0,3 %) |
| 15 | (2) | 50 mM | " " | (1,3 %) |
| | (3) | 100 mM | " " | (2,6 %) |
| | (4) | 250 mM | " " | (6,7 %) |
| | (5) | 500 mM | " " | (13,3 %) |
- 20 Die Ansätze enthielten als Reaktionspuffer 10 mM NaCl, 10 mM NaPhosphat, pH = 8,0 und wurden für 48 h auf dem Schüttler bei 100 rpm und 37°C inkubiert. Das bei der Hydrolyse-Reaktion gebildete freie PPT wurde im Aminosäureanalysator (Biotronic LC 5001) bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Die Enantiomerenreinheit des Reaktionsproduktes wurde durch chirale HPLC mit
- 25 der Trennsäule Chirex® (D) Penicillamin (Phenomenex) analysiert. Als Laufmittel wurde 2 mM CuSO₄, 10 % Methanol mit einer Flußrate von 0,5 ml/min. verwendet. Die Detektion erfolgt photometrisch bei 254 nm. Unter diesen Bedingungen eluieren Referenzlösungen von L-PPT bei 17 min. und D-PPT bei 21 min. In allen Testproben konnte ausschließlich L-PPT als Reaktionsprodukt nachgewiesen werden. Die
- 30 erzielten Konversionsraten [produziertes L-PPT/N-Acetyl-L-PPT im Substrat x 100]

lagen zwischen 100 % bei den niedrigen Substratkonzentrationen (10 mM, 50 mM) und 66 % bei der höchsten verwendeten Substratkonzentration (500 mM).

Tabelle 2: Racemat-Spaltung von N-Acetyl-D,L-PPT in Abhängigkeit von der Substratkonzentration

Substratlösung N-Acetyl-D,L-PPT [mM]	Produktlösung* L-PPT [mM]	Konversionsrate L-PPT/N-Acetyl-D,L-PPT in %
10	5	100
50	25	100
100	48	96
250	108	86
500	164	66

*: Konzentration an Biokatalysator: 2 mg/ml

- Im folgenden Versuch wurde die Konzentration an Biokatalysator erhöht und eine Reaktionskinetik der Substratspaltung aufgenommen. 13 mg der lyophilisierten Zellen wurden in 1 ml Substratlösung, bestehend aus 500 mM N-Acetyl-D,L-PPT, Dinatrium Salz (13,3 % w/v), 10 mM NaCl, 10 mM NaPhosphat, pH = 8,0 resuspendiert und auf einem Schüttler bei 100 rpm und 37°C inkubiert. Zur Bestimmung des gebildeten L PPT wurden über einen Zeitraum von 55 h je 50 µl Aliquots aus dem Reaktionsansatz abgenommen, zentrifugiert und die Überstände bis zur Analyse bei -20°C eingefroren. Die quantitative Analyse des Reaktionsproduktes L-PPT, sowie die Bestimmung der Enantiomerenreinheit wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Unter den gewählten Bedingungen war die L-spezifische Substrat-Spaltung nach ca. 55 h abgeschlossen. Dabei wurden eine Konversionsrate von ca. 90 % und eine Raum/Zeit-Ausbeute von 483 [mg L-PPT/g Biokatalysator/h] erreicht.

Tabelle 3: Reaktionskinetik der Racemat-Spaltung von N-Acetyl-D,L-PPT

Reaktionszeit [h]	L-PPT [mM]*
0	0
1	27,7
4	59,7
9	106,0
23	181,6
31	186,5
47	208,6
55	221,8

*: Konzentration an Biokatalysator: 13 mg/ml

5 Substratkonzentration: 500 mM N-Acetyl-D,L-PPT

5. Immobilisierung des gereinigten *deac*-Proteins:

- 10 Um die Enzymreaktion mit dem isolierten *deac*-Protein durchführen zu können, wurde das in Beispiel 2 als HisTag-Fusionsprotein gereinigte Enzym an den Polymer-Träger VINA-Epoxy Biosynth[®] (Riedel de Haen) immobilisiert. Dazu wurde das *deac*-Protein durch Ammoniumsulfat-Fällung auf 15 mg/ml aufkonzentriert und über Nacht gegen 1 M NaPhosphat, pH = 8,0 dialysiert. Für eine Standard-
- 15 Kopplungsreaktion wurden 10 mg des Proteins mit 100 mg VINA-Träger für 2 Tage bei Raumtemperatur langsam geschüttelt. Anschließend wurde das Immobilisat abzentrifugiert und je 1x in Immobilisierungspuffer, sowie in 50 mM NaPhosphat,

pH = 7,0 gewaschen. Zum Blocken freier Epoxy-Gruppen wurde der Träger dann für 1 h bei Raumtemperatur mit 50 mM NaPhosphat, pH = 7,0, 50 mM 2-

Mercaptoethanol inkubiert. Der Biokatalysator wurde danach in 1ml 5 mM

NaPhosphat, pH = 7,0, 0,02 % NaAzid bei 4°C gelagert. Zur Bestimmung der

- 5 Proteinkopplung wurde der Proteingehalt der Lösung vor und nach Immobilisierung, sowie in den Waschlösungen mit Hilfe der Bradford Methode bestimmt [Bradford (1976), Anal. Biochem. 72: 248-254]. Die spezifische Aktivität der Deacetylase wurde vor und nach Immobilisierung mit dem in Beispiel 1 beschriebenen radioaktiven Assay gemessen. Die relative Enzymaktivität war nach Kopplung > 90
- 10 % des für das gelöste Protein bestimmten Wertes.

6. Racemat-Spaltung von N-Acetyl-D,L-Phosphinothricin mit immobilisiertem deac-Enzym im Säulenreaktor:

- 15 1 g Enzym-Immobilisat (Feuchtgewicht) wurde in einen Säulenreaktor geladen und als Biokatalysator für die Racemat-Spaltung von verschiedenen konzentrierten Substratlösungen mit verschiedenen Flußraten benutzt. Die Substratlösungen enthielten die in Tabelle 4 angegebenen Konzentrationen an N-Acetyl-D,L-PPT, Diammoniumsalz in 10 mM NaCl, 10 mM NaPhosphat, pH = 8,0. Die Reaktionen
- 20 wurden bei 37°C über insgesamt 10 Tage durchgeführt. Die Umsetzungen wurden durch Bestimmung des im Säulendurchfluß vorhandenen L-PPT mittels Aminosäureanalyse und chiraler HPLC quantifiziert (siehe Beispiel 4). Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt. Die höchste Konversionsrate von 83 % wurde mit der höchsten Substratkonzentration (500 mM) und dem niedrigsten
- 25 Substratfluß (0,03 ml/min.) erreicht. Die Raum/Zeit-Ausbeute stieg mit der Flußrate und der Substratkonzentration an und erreichte den höchsten Wert von 181 [mg L-PPT/g Biokatalysator/h] bei einer Substratkonzentration von 500 mM und einem Fluß von 0,3 ml/min. Die immobilisierte Deacetylase zeigte über den gesamten Versuchszeitraum eine gute Stabilität und besaß nach 10 Tagen bei 37°C noch ca.
- 30 80 % der Ausgangsaktivität.

17

Tabelle 4: Racemat-Spaltung von N-Acetyl-D,L-PPT mit immobilisiertem *deac*-Enzym im Säulenreaktor

Substratlösung N-Acetyl-D,L-PPT [mM]	Flußrate [ml/min.]	Produktlösung L-PPT [mM]	Konversionsrate [%]	Raum/Zeit- Ausbeute [mg L-PPT/g Biokatalysator/h]*
100	0,1	29,7	59	39
	0,3	22,0	44	87
	0,5	13,8	28	91
250	0,1	38,4	31	50
	0,3	25,0	20	99
	0,5	18,1	14	119
500	0,1	71,1	28	93
	0,3	46,0	18	181
	0,5	26,3	11	173
500	0,03	208,2	83	82

5 *: Reaktionen bei 37°C

17

**Patentansprüche:****AGR 99/M 217**

1. Verfahren zur Herstellung von proteinogenen oder nicht-proteinogenen L-Aminosäuren aus deren racemischen N-Acetyl-D,L-Derivaten dadurch gekennzeichnet, daß
5
(a) durch eine enzymatische Racemat-Spaltung mittels isolierter, rekombinanter Enzyme selektiv N-Acetyl-L-Derivate der korrespondierenden L-Aminosäuren deacetyliert werden, während N-Acetyl-D-Derivate der korrespondierenden D-Aminosäuren nicht
10 deacetyliert werden
und
(b) die erhaltenen deacetylierten L-Aminosäuren präparativ von den nicht deacetylierten N-Acetyl-D-Derivaten und/oder den nicht vollständig deacetylierten N-Acetyl-L-Derivaten getrennt werden.
15
2. Verfahren gemäß Anspruch 1 zur Herstellung von L-Phosphinothricin (L-PPT) aus N-Acetyl-D,L-Phosphinothricin.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1 zur Herstellung von L-Glutaminsäure, L-Histidin, L-Leucin, L-Glutamin und/oder L-Phenylalanin aus deren
20 korrespondierenden N-Acetyl-D,L-Derivaten.
4. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 2 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die enantioselektive Erzeugung einer oder mehrerer
25 L-Aminosäuren aus deren korrespondierenden racemischen N-Acetyl-D,L-Derivaten mit einer oder mehreren Deacteylasen aus der Gruppe der Hippurat-Hydrolasen durchgeführt wird.
5. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 2 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die enantioselektive Erzeugung von L-Phosphinothricin, L-Glutaminsäure, L-Histidin, L-Leucin, L-Glutamin und/oder L-Phenylalanin
30

aus deren korrespondierenden racemischen N-Acetyl-D,L-Derivaten mit einer oder mehreren Deacetylasen aus der Gruppe der Hippurat-Hydrolasen durchgeführt wird.

- 5 6. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 2 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die enantioselektive Erzeugung einer oder mehrerer L-Aminosäuren aus deren korrespondierenden racemischen N-Acetyl-D,L-Derivaten mit den Enzymen *deac 1* aus *Stenotrophomonas sp.* und/oder *deac 2* aus *Comamonas acidovorans* durchgeführt wird.
- 10 7. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 2 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die enantioselektive Erzeugung von L-Phosphinothricin, L- Glutaminsäure, L-Histidin, L-Leucin, L-Glutamin und/oder L-Phenylalanin aus deren korrespondierenden racemischen N-Acetyl-D,L-Derivaten mit den
- 15 Enzymen *deac 1* aus *Stenotrophomonas sp.* und/oder *deac 2* aus *Comamonas acidovorans* durchgeführt wird.
8. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 4 bis 7, wobei die erzeugten rekombinanten Deacetylasen in immobilisierter Form eingesetzt
- 20 werden.
9. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 4 bis 8, wobei die Reaktionstemperaturen etwa 25°C bis 65°C betragen.
- 25 10. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 4 bis 8, wobei das Substrat in einer Konzentration von etwa 10 bis 1500 mM vorliegt.
11. Verwendung von einer oder mehreren Hippurat-Hydrolasen zur enantioselektiven Erzeugung einer oder mehrerer L-Aminosäuren aus deren
- 30 korrespondierenden racemischen N-Acetyl-D,L-Derivaten.

12. Verwendung von einer oder mehreren Hippurat-Hydrolasen zur enantioselektiven Erzeugung von L-Phosphinothricin, L-Glutaminsäure, L-Histidin, L-Leucin, L-Glutamin und/oder L-Phenylalanin aus deren korrespondierenden racemischen N-Acetyl-D,L-Derivaten.

5

13. Verwendung von *deac 1* aus *Stenotrophomonas sp.* und/oder *deac 2* aus *Comamonas acidovorans* zur enantioselektiven Erzeugung einer oder mehrerer L-Aminosäuren aus deren korrespondierenden racemischen N-Acetyl-D,L-Derivaten.

10

14. Verwendung von *deac 1* aus *Stenotrophomonas sp.* und/oder *deac 2* aus *Comamonas acidovorans* zur enantioselektiven Erzeugung von L-Phosphinothricin, L-Glutaminsäure, L-Histidin, L-Leucin, L-Glutamin, L-Phenylalanin aus deren korrespondierenden racemischen N-Acetyl-D,L-Derivaten.

15

Zusammenfassung:

AGR 99/M 217

Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren aus ihren racemischen N-Acetyl-D,L-Derivaten durch enzymatische Racemat-Spaltung mittels isolierter, rekombinanter Enzyme

Ein Verfahren zur Herstellung von proteinogenen oder nicht-proteinogenen L-Aminosäuren, insbesondere L-Phosphinotricin, aus deren racemischen N-Acetyl-D,L-Derivaten ist, dadurch gekennzeichnet, daß

(a) durch eine enzymatische Racemat-Spaltung mittels isolierter, rekombinanter Enzyme selektiv N-Acetyl-L-Derivate der korrespondierenden L-Aminosäuren deacetyliert werden, während N-Acetyl-D-Derivate der korrespondierenden D-Aminosäuren nicht deacetyliert werden

und

(b) die erhaltenen deacetylierten L-Aminosäuren präparativ von den nicht deacetylierten N-Acetyl-D-Derivaten und/oder den nicht vollständig deacetylierten N-Acetyl-L-Derivaten getrennt werden.

7

REPUBLICA FEDERAL DE ALEMANIA**Certificación**

La compañía Hoechst Schering AgrEvo GmbH domiciliada en Berlín, República Federal de Alemania, presentó el día 20 de Julio de 1999 ante la Oficina Alemana de Patentes y Marcas una solicitud de patente bajo el título

"Procedimiento para la preparación de L-aminoácidos a partir de sus derivados racémicos N-acetil-D,L mediante disociación racémica enzimática por medio de enzimas recombinantes aisladas".

La razón social de la compañía fue modificada y ahora es: Aventis CropScience GmbH.

El documento adjunto es una copia fiel y exacta del documento original de esta solicitud de patente.

La solicitud recibió provisionalmente en la Oficina Alemana de Patentes y Marcas el símbolo C 12 P 41/00 de la clasificación internacional de patentes.

Munich, 10 de Mayo del 2000

El Presidente de la Oficina Alemana de Patentes y Marcas

Por encargo: Weihmayr

(Firma y Sello Oficial)

Número de referencia: 199 33 362.9

Reivindicaciones de patente:

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) deacetilar selectivamente los derivados N-acetil-L de los correspondientes L-aminoácidos mediante disociación racémica por medio de enzimas recombinantes aisladas, mientras que no se deacetilan los derivados N-acetil-D de los correspondientes D-aminoácidos; y

(b) separar de los derivados N-acetil-D no-deacetilados y/o de los derivados N-acetil-L incompletamente deacetilados los L-aminoácidos deacetilados obtenidos preparativamente.

2. Procedimiento conforme a la reivindicación 1 para la preparación de L-fosfinotricina (L-PPT) a partir de N-acetil-D,L-fosfinotricina.

3. Procedimiento conforme a la reivindicación 1 para la preparación de L-ácido glutámico, L-histidina, L-leucina, L-glutamina y/o L-fenilalanina a partir de sus correspondientes derivados N-acetil-D,L.

4. Procedimiento conforme a una o varias de las reivindicaciones 2 a 3, caracterizado porque la producción enantioselectiva de uno o varios L-aminoácidos a partir de sus correspondientes derivados racémicos N-acetil-D,L se efectúa usando una o varias deacetilasas del grupo de las hipurato hidrolasas.

5. Procedimiento conforme a una o varias de las reivindicaciones 2 a 3, caracterizado porque la producción enantioselectiva de L-fosfinotricina, L-ácido glutámico, L-histidina, L-leucina, L-glutamina y/o L-fenilalanina a partir de sus correspondientes derivados racémicos N-acetil-D,L se efectúa

usando una o varias deacetilasas del grupo de las hipurato hidrolasas.

6. Procedimiento conforme a una o varias de las reivindicaciones 2 a 3, caracterizado porque la producción enantio-selectiva de uno o varios L-aminoácidos a partir de sus correspondientes derivados racémicos N-acetil-D,L se efectúa usando las enzimas deac1 de *Stenotrophomonas* sp. y/o deac2 de *Comamonas acidovorans*.

7. Procedimiento conforme a una o varias de las reivindicaciones 2 a 3, caracterizado porque la producción enantio-selectiva de L-fosfinotricina, L-ácido glutámico, L-histidina, L-leucina, L-glutamina y/o L-fenilalanina a partir de sus correspondientes derivados racémicos N-acetil-D,L se efectúa usando las enzimas deac1 de *Stenotrophomonas* sp. y/o deac2 de *Comamonas acidovorans*.

8. Procedimiento conforme a una o varias de las reivindicaciones 4 a 7, en el cual las deacetilasas recombinantes producidas se emplean en forma inmovilizada.

9. Procedimiento conforme a una o varias de las reivindicaciones 4 a 8, en el cual las temperaturas de reacción son de aproximadamente 25°C a 65°C.

10. Procedimiento conforme a una o varias de las reivindicaciones 4 a 8, en el cual el sustrato está presente en una concentración de aproximadamente 10 a 1500 mM.

11. Uso de una o varias hipurato hidrolasas para la producción enantio-selectiva de uno o varios L-aminoácidos a partir de sus correspondientes derivados racémicos N-acetil-D,L.

12. Uso de una o varias hipurato hidrolasas para la producción enantio-selectiva de L-fosfinotricina, L-ácido glutámico, L-histidina, L-leucina, L-glutamina y/o L-fenilalanina a partir de sus correspondientes derivados racémicos N-acetil-D,L.

13. Uso de deac1 de *Stenotrophomonas* sp. y/o deac2 de *Comamonas acidovorans* para la producción enantio-selectiva de uno o varios L-aminoácidos a partir de sus correspondientes derivados racémicos N-acetil-D,L.

14. Uso de deac1 de *Stenotrophomonas* sp. y/o deac2 de *Comamonas acidovorans* para la producción enantio-selectiva de L-fosfinotricina, L-ácido glutámico, L-histidina, L-leucina, L-glutamina y/o L-fenilalanina a partir de sus correspondientes derivados racémicos N-acetil-D,L.

Procedimiento para la preparación de L-aminoácidos a partir de
sus derivados N-acetil-D,L racémicos mediante disociación
enzimática de racematos por medio de enzimas
recombinantes aisladas

La producción de aminoácido L-PPT (L-fosfinotricina) no-proteinogénico mediante separación de racémica con alta pureza y rendimiento ha sido descrita anteriormente tan sólo mediante la disociación de fenacetilfosfinotricina con penicilina G acilasa de *Escherichia coli* (DE-A-3048612). La síntesis de fenacetil-PPT, sin embargo, es más complicada y más costosa en comparación con N-Ac-PPT (N-acetil-fosfinotricina). Pero la penicilina G acilasa no posee especificidad alguna por los radicales acilo alifáticos y por lo tanto tampoco posee especificidad alguna por N-Ac-PPT. Igualmente otras acilasas conocidas no tienen especificidad o solamente tienen baja especificidad de sustrato por N-Ac-PPT y han sido utilizadas anteriormente tan sólo en biotransformaciones sin purificación de enzimas (tal como se describe por ejemplo en DE-A-2939269). Debido a esto únicamente se podían lograr rendimientos espacio/tiempo muy bajos. La solicitud de patente EP-A-0382113 ha dado a conocer la disociación L-específica de ésteres de ácido N-Ac-PPT carboxílico mediante acilasa I. Sin embargo, incluso esta enzima no tiene especificidad por el ácido carboxílico libre y por consiguiente necesita esterificación como paso de síntesis adicional en la preparación del sustrato.

La solicitud de patente DE-A-19652284 describe el aislamiento específico de deacetilasas microbianas de muestras de suelo con especificidad por ácidos N-acetilamino, preferentemente N-acetilfosfinotricina (N-Ac-PPT), y la clonación de los correspondientes genes de *Stenotrophomonas ps.* y *Comamonas acidovorans*.

Teniendo en cuenta las homologías de secuencia y las pruebas de especificidad de substrato llevadas a cabo fue posible mostrar que las deacetilasas descritas pertenecen al grupo de las hipurato hidrolasas (EC 3.5.1.32), cuyo substrato natural es la N-benzoilglicina, un derivado aminoácido que tiene una función N-acilo aromático. Resultó entonces interesante el hecho de que estas enzimas también puedan aceptar como substrato aminoácidos N-acetilados, en particular N-acetilfosfinotricina, los cuales son derivados aminoácidos que tienen funciones N-acil alifático. Las solicitudes de patente DE-A-2939269 y DE-A-2717440 dan a conocer que la acción herbicida de la fosfinotricina racémica emana exclusivamente de su enantiómero L (L-PPT).

En este sentido resultó interesante que las deacetilasas halladas disocien exclusivamente los enantiómeros L de N-acetil-PPT y de derivados N-acetil de ciertos aminoácidos proteínogénicos con alta especificidad. Estas enzimas son por consiguiente notablemente apropiadas para la preparación de L-aminoácidos, en particular del compuesto herbicida activo L-fosfinotricina, a partir de sus derivados N-acetil racémicos de acuerdo con el principio de la disociación racémica, tal como se describe por ejemplo en las solicitudes de patente EP-A-0304021, DE-A-2939269 y DE-A-3048612. Sin embargo, las desventajas substanciales de estas tres solicitudes de patente radican en: (1) que únicamente se pueden emplear concentraciones de substrato bajas (aproximadamente 0,5% en el caso de la solicitud de patente DE-A-2939269), debido a lo cual su idoneidad industrial ha de ser considerada como exigua; (2) que la reacción se lleva a cabo con enzimas no-aisladas, debido a lo cual los problemas de las reacciones secundarias y de los subsiguientes pasos de purificación no pueden ser resueltos o únicamente pueden ser resueltos a muy alto costo; y (3) que es

necesaria una preparación costosa del producto (como en el caso de la solicitud de patente DE-A-3048612).

La tarea subyacente de la invención es expresar una o varias deacetilasas nuevas (tal como se caracterizaron ya en la solicitud de patente DE-A-3048612) en forma y cantidad apropiadas, y hacer posible con la ayuda de estas enzimas la preparación de L-PPT y de algunos L-aminoácidos proteinogénicos a partir de los -químicamente muy fácilmente accesibles- derivados N-acetil-D,L racémicos mediante disociación racémica con alto rendimiento y pureza de enantiómeros.

En el caso en que la actividad enzimática ya se conoce poco más o menos y en que ya se ha efectuado clonación de la secuencia de ácido nucleico que codifica la enzima, la primera operación consiste en transferir el correspondiente fragmento de ácido nucleico a un vector adecuado para entonces efectuar una sobre-producción en una cepa bacteriana apropiada y/o bien para aislar la proteína después de la sobre-expresión. La enzima así aislada puede ya sea ser utilizada directamente para la reacción enzimática o bien ser fijada a una matriz mediante grupos de acoplamiento apropiados.

Es aconsejable una primera prueba enzimática para obtener confirmación general respecto a si se está desarrollando la reacción deseada. Todos los pasos posteriores sirven para optimizar los parámetros respecto a la especificidad de la reacción (en relación con el material inicial y el producto), a la velocidad de reacción, a la eficiencia de la reacción, a la vida media de la enzima empleada, y a las posibles concentraciones del sustrato. En caso de que los parámetros individuales no correspondan exactamente con los requisitos entonces se pueden efectuar cambios apropiados a la secuencia de ácido nucleico que codifica la enzima, lo cual resulta en una optimización adicional de la enzima natural presente.

La clonación de deacetilasas usadas individualmente ya ha sido descrita en la solicitud DE-A-19652284. Tal como se especifica más abajo en el Ejemplo 1, los fragmentos de ácido nucleico que codifican las deacetilasas apropiadas fueron re-clonados en los vectores de expresión apropiados para asegurar así un grado necesario de especificidad inequívoca del sustrato y la ausencia de reacciones secundarias. Así, aunque en la solicitud DE-A-19652284 fue posible mostrar que la N-acetil-L-PPT es deacetilada, no fue posible mostrar que la N-acetil-D-PPT no es deacetilada. La reacción exclusiva de N-acetil-L-aminoácidos y N-acetil-L-PPT, sin embargo, es un pre-requisito elemental para el uso industrial propuesto aquí.

La invención se refiere a un procedimiento para la preparación de L-aminoácidos proteinogénicos o no-proteinogénicos a partir de sus derivados N-acetil-D,L, procedimiento que comprende:

(a) deacetilar selectivamente los derivados N-acetil-L de los correspondientes L-aminoácidos mediante disociación racémica enzimática por medio de enzimas recombinantes aisladas, mientras que los derivados N-acetil-D de los correspondientes D-aminoácidos no son deacetilados; y

(b) separar preparativamente los L-aminoácidos deacetilados de los derivados N-acetil-D no-deacetilados y/o de los derivados N-acetil-L incompletamente deacetilados.

La invención se refiere en particular a un procedimiento para la preparación de L-fosfinotricina (L-PPT) a partir de N-acetil-D,L-fosfinotricina mediante disociación racémica enzimática por medio de enzimas recombinantes aisladas.

La invención se refiere además a un procedimiento para la preparación de ácido L-glutámico, L-histidina, L-leucina, L-glutamina y/o L-fenilalanina a partir de sus correspondientes

derivados N-acetil-D,L mediante disociación racémica enzimática.

La invención se refiere además a un procedimiento que comprende efectuar la producción enantio-selectiva de uno o varios L-aminoácidos a partir de sus correspondientes derivados racémicos N-acetil-D,L utilizando una o varias deacetilasas del grupo de las hipurato hidrosilasas, y en particular efectuar la producción enantio-selectiva de L-fosfinotricina, L-ácido glutámico, L-histidina, L-Leucina, L-glutamina y/o L-fenilalanina a partir de sus correspondientes derivados racémicos N-acetil-D,L utilizando una o varias deacetilasas del grupo de las hipurato hidroxilasas.

En particular la invención se refiere a un procedimiento que comprende efectuar la producción enantio-selectiva de uno o varios L-aminoácidos a partir de sus correspondientes derivados racémicos N-acetil-D,L utilizando las enzimas deac1 de *Stenotrophomonas* sp. y/o deac2 de *Comamonas acidovorans* (ambas deacetilasas se describen en la solicitud DE-A-19652284), y en este contexto los procedimientos que comprenden efectuar la producción enantio-selectiva de L-fosfinotricina, L-ácido glutámico, L-histidina, L-leucina, L-glutamina y/o L-fenilalanina a partir de sus correspondientes derivados racémicos N-acetil-D,L utilizando las enzimas deac1 de *Stenotrophomonas* sp. y/o deac2 de *Comamonas acidovorans* (ambas deacetilasas se describen en la solicitud DE-A-19652284). Ambas enzimas tienen una significativa homología de secuencia, lo cual resulta en una función idéntica o por lo menos similar en la disociación de los derivados N-acetil-D,L.

Además la invención se refiere al uso de las deacetilasas recombinantes producidas como biocatalizadores que permiten que las reacciones apropiadas se efectúen utilizando altas concentraciones de sustrato y/o logrando altos rendimientos espa-

cio/tiempo, en particular utilizando las deacetilasas en forma inmovilizada.

La invención se refiere además a la realización de los procedimientos descritos arriba a temperaturas de reacción de aproximadamente 25°C hasta 65°C, preferentemente a temperaturas de aproximadamente 30°C hasta 45°C, y lo más preferentemente a temperaturas de reacción de aproximadamente 35°C hasta 40°C.

Además la invención se refiere a la realización de los procedimientos descritos arriba con concentraciones de sustrato de aproximadamente 10 mM hasta 1500 mM, preferentemente con concentraciones de sustrato mayores de 50 mM, más preferentemente con concentraciones de sustrato mayores de 250 mM, y lo más preferentemente con concentraciones de sustrato mayores de 500 mM.

La invención se refiere además a la separación de L-aminoácido o del L-PTC producido de los correspondientes derivados N-acetil-D,L con la ayuda de los pasos descritos arriba, derivados los cuales no han reaccionado (como en el caso del derivado N-acetil-D) o no han reaccionado completamente (como en el caso del derivado N-acetil-L).

En este contexto, procedimientos utilizables son el uso de cromatografía de intercambio de iones en un intercambiador de iones ácidos o bien la extracción de los derivados N-acetil-D,L por medio de un disolvente orgánico, como por ejemplo metil isobutil cetona, para lo cual el L-aminoácido o el L-PTC producido anteriormente pasa a la fase acuosa, a partir de la cual se concentra mediante secamiento.

Ejemplos:

1. Producción de la enzima deac como proteína recombinante en *Escherichia coli*:

El gene estructural deac1 de *Stenotrophomonas* sp., codificante para una deacetilasa N-Ac-PPT-específica (es decir específica a N-Ac-PPT), fue clonado como fragmento 1,4 kb Bam HI/Sal I (descrito en la solicitud DE-A-19652284) en el sitio de disociación Bam HI/Sal I del vector de expresión His Tag pQE30 de la compañía Quiagen [Quiaexpress Kit, Tipo IV, Catálogo No. 32149, Stüber y colaboradores (1990), en *Immunological Methods*, Lefkovits I. y Pernis B., editores, Vol. IV, Academic Press, New York, páginas 121-152].

Todos los estudios biológicos-moleculares se efectuaron de acuerdo con los protocolos estándar, tal como se describe por ejemplo en Ausubel y colaboradores (1995), *Current protocols in molecular biology*, John Wiley and Sons, New York. El constructo religado fue transformado en la cepa bacteriana *E. Coli* M15 recomendada por el fabricante (Quiagen), y se seleccionaron genes recombinantes en 100 µg/ml de ampicilina y 25 µg/ml de canamicina. La expresión de la proteína de fusión recombinante fue inducida mediante adición de 1 mM de IPTG. Las células se cosecharon 4-5 horas después de la inducción y se almacenaron a -20°C hasta el desarrollo de la proteína.

Mediante electroforesis de SDS/poliacrilamida de alicuotas de células de los clones inducidos fue posible detectar la proteína de fusión His Tag deac1 como banda adicional de 49-kDa.

La actividad enzimática de la proteína de fusión de deacetilasa se detectó en una prueba radioactiva utilizando como sustrato [¹⁴C]-N-acetil-L-PPT. Para esto, 200 µl de cada uno de los cultivos inducidos se permeabilizaron a 37°C con 0,5% de tolueno, 0,5% de etanol durante 30 minutos. Las bolitas de células se re-suspendieron luego respectivamente en 25 µl de 0,1 mM de [¹⁴C]-N-acetil-L-PPT, de 10 mM de NaCl, de 10 mM de fosfato Na, pH = 7,5 y se incubaron a 37°C durante una hora. Para la determinación cualitativa de la [¹⁴]-L-PPT formada, 5 µl de

cada una de las alicuotas de las preparaciones de prueba se analizaron mediante cromatografía de capa delgada en láminas de celulosa HPTLC (Merck) utilizando n-propanol:25% amoniaco = 3:2 como eluente. Las bandas radioactivas fueron hechas visibles mediante auto-radiografía en una película de rayos X.

Para la cuantificación de la reacción enzimática, las preparaciones de prueba se midieron en radio-HPLC utilizando Spherisorb® SAX como columna separadora (eluente: 5 mM KH_2PO_4 , 10% metanol,

pH = 1,92, tasa de flujo: 0,5 ml/minuto). Bajo estas condiciones se eluye [^{14}C]-L-PPT a 4,5 minutos y [^{14}C]-N-acetil-L-PPT a 6,5 minutos.

El clon de expresión que tiene la más alta actividad de deacetilasa N-acetil-L-PPT-específica (es decir específica a N-acetil-L-PPT) produce la proteína de deacetilasa de acuerdo con una determinación semi-cuantitativa con una proporción de aproximadamente 10% de la proteína total y se utilizó para la purificación enzimática y la biotransformación descrita abajo.

2. Purificación de la deacetilasa mediante cromatografía de afinidad:

El aislamiento de la proteína de deacetilasa de la cepa de expresión pQEDEAC (denominada así recientemente de acuerdo con la clonación descrita en el Ejemplo 1) se efectuó conforme al protocolo Quiagen (Quiaexpress kit) por cromatografía de afinidad en matriz de níquel nitrilotriacetato (Ni-NTA) bajo condiciones naturales. Para esto, 800 ml de la cepa de expresión pQEDEAC se fermentaron y fueron inducidos tal como se describió en el Ejemplo 1. La bolita de células (4 gr) cosechada se re-suspendió en 20 ml de lisis amortiguadora y se disgregó con ultrasonido. Después de centrifugación, el claro lisato de proteína (120 gr de proteína total) se trató con 4 ml de suspensión de Ni-NTA al 50% para el enlace de la proteína de fu-

sión His Tag y luego el material se cargó en una columna enzimática. La matriz de afinidad fue lavada con 10 volúmenes de amortiguador de lavado y luego se eluyó con 4 ml de amortiguador de elución. Para comprobar la purificación de afinidad se analizaron alicuotas de la disgregación de células, de las soluciones de lavado y del eluato mediante electroforesis de gel de SDS/poliacrilamida. La actividad de la deacetilasa de las diferentes fracciones contenedoras de proteína se determinó utilizando las pruebas radiactivas descritas en el Ejemplo 1 (preparaciones de reacción: 9 μ l de solución de proteína + 1 μ l de 1 mM de [^{14} C]-N-acetil-LPPT, ver arriba las condiciones de la reacción). Para la determinación cuantitativa de enzimas, las fracciones de proteína se incubaron a 37°C con 50 mM de N-acetil-D,L-PPT (9 μ l de solución de proteína + 1 μ l de 500 mM de N-acetil-D,L-PPT) durante 30 minutos. La PPT (fosfinotricina) resultante fue entonces medida en un analizador de aminoácidos (Biotronic LC 5001).

La proteína en el extracto bruto después de la disgregación de células tenía una actividad específica de deacetilasa de 3 ncat/mg de proteína (1 ncat = 1 nmol de sustrato/segundo). De los 800 ml de cultivo de la cepa de expresión fue posible aislar mediante cromatografía de afinidad 10 mg de proteína de fusión His Tag deac con una actividad específica de 20 ncat/mg de proteína y una pureza de aproximadamente 80%.

3. Especificidad de sustrato y estereo-selectividad de la deacetilasa:

Para la investigación de la especificidad de sustrato y la estereo-especificidad de la proteína deac1, 5 μ l de enzima purificada fueron incubados respectivamente en preparaciones de 20 μ l de 10 mM de NaCl, 10 mM de fosfato Na, pH = 7,5, cada uno con 25 mM de N-acetil-L-aminoácidos o de los correspondientes enantiómeros D mencionados en la Tabla 1. Para la com-

paración se empleó ácido hipúrico (N-benzoilglicina), el sustrato natural de la deacetilasa. Las reacciones fueron incubadas a 37°C durante 1 hora y luego se midieron en el analizador de aminoácidos (Biotronic LC 5001) en lo referente a la formación de aminoácidos libres. La Tabla 1 indica las actividades relativas de deacetilasa para los enantiómeros L de los diferentes sustratos. Además del ácido hipúrico y de la N-Ac-L-PPT, la enzima deac1 también disocia adicionalmente los derivados N-acetilo de varios aminoácidos naturales, en particular el ácido N-Ac-L-glutámico, la N-Ac-glicina, la N-Ac-L-histidina, la N-Ac-L-ornitina, la N-Ac-L-leucina, la N-Ac-L-glutamina y la N-Ac-L-fenilalanina. En todos los casos la enzima fue activa exclusivamente con los enantiómeros L, no siendo posible hacer reaccionar los correspondientes compuestos D en ningún caso. En todos los otros casos sometidos a prueba (ver Tabla 1) la reacción de los derivados N-acetil-L sólo tuvo lugar en un grado muy pequeño o no tuvo lugar en absoluto.

Tabla 1: Especificidad del sustrato de la enzima deac

<u>Substrato¹</u>	<u>Actividad rel.² [%]</u>
Acido hipúrico (N-benzoilglicina)	100
N-Ac-L-fosfinotricina	43
N-Ac-L-ornitina	37
N-Ac-L-metionina	0
N-Ac-L-triptofano	0,4
N-Ac-L-fenilalanina	24
N-Ac-L-tirosina	11
N-Ac-L-ácido glutámico	100
N-Ac-glutamina	30
N-Ac-glicina	59
N-Ac-L-histidina	43

N-Ac-L-leucina	33
N-Ac-L-valina	2
N-Ac-L-prolina	4
N-Ac-L-prolina	0

¹ Todos los compuestos son los enantiómeros L

² La actividad específica [nmol de glicina/min/mg de proteína medida usando ácido hipúrico se tomó como igual al 100%, y los otros valores se basaron en ella

4. Disociación racémica de N-acetil-D,L-fosfinotricina mediante biotransformación utilizando células de la cepa productora de deac

Un cultivo de 400 ml de la cepa de expresión pQEDEAC se fermentó y se indujo tal como se describió en el Ejemplo 1. Las células cosechadas se lavaron luego en 10 mM de NaCl, 10 mM de fosfato Na, pH = 7,5 y se liofilizaron durante la noche. Fue posible almacenar durante varias semanas a 4°C las células tratadas de este modo manteniendo simultáneamente una alta actividad de deacetilasa específica y utilizarlas en los siguientes experimentos como biocatalizador.

2 mg de las células liofilizadas fueron re-suspendidos en 1 ml de la siguientes soluciones de substrato de diferentes concentraciones:

(1)	10 mM de N-acetil-D,L-PPT, sal disódica	(0,3%)
(2)	50 mM de "	" (1,3%)
(3)	100 mM de "	" (2,6%)
(4)	250 mM de "	" (6,7%)
(5)	500 mM de "	" (13,3%)

Como amortiguador de la reacción las preparaciones contenían 10 mM de NaCl, 10 mM de fosfato Na, pH = 8,0 y se incubaron en un agitador a 100 rpm y 37°C durante 48 horas. Se determinó en una analizador de aminoácidos (Biotronic LC 5001) la fosfino-

tricina (PPT) formada en la reacción de hidrólisis. Los resultados aparecen resumidos en la Tabla 2. La pureza enantiomérica del producto de reacción se analizó mediante HPLC disimétrica utilizando la columna separadora Chirex® (D) Penicillamine (Phenomenex). El eluato usado fue 2 mM de CuSO_4 , 10% metanol con una tasa de flujo de 0,5 ml/min. La detección se efectuó fotométricamente a 254 nm. Bajo estas condiciones las soluciones de referencia de L-PPT se eluyen a 17 minutos y las de D-PPT a 21 minutos. En todas las muestras de prueba la L-PPT se detectó exclusivamente como producto de reacción. Las tasas de conversión logradas [L-PPT producida/N-acetil-L-PPT en el substrato X 100] estuvieron entre 100% en las concentraciones de substrato bajas (10 mM, 50 mM) y 66% en la concentración de substrato más alta usada (500 mM).

Tabla 2: Disociación racémica de N-acetil-D,L-PPT como función de la concentración del substrato.

Solución de substrato	Solución de producto*	Tasa de conversión
N-acetil-D,L-PPT [mM]	L-PPT [mM]	L-PPT/N-acetil-D,L-PPT
		en %
10	5	100
50	25	100
100	48	96
250	108	86
500	164	66

* Concentración del biocatalizador: 2 mg/ml

En el siguiente experimento la concentración del catalizador se aumentó y fue registrada la cinética de la disociación del substrato. 13 mg de las células liofilizadas se re-suspendieron en 1 ml de solución de substrato consistente en 500 mM de N-acetil-D,L-PPT, sal disódica (13,3% peso/volumen), 10 mM de NaCl, 10 mM de fosfato Na, pH = 8,0 y se incubaron a

100 rpm y a 37°C en un agitador. Para la determinación de la L-fosfinotricina (L-PPT) formada se extrajeron cada vez 50 µl de alícuotas de la preparación de reacción a lo largo de un período de 55 horas, se centrifugaron y los sobrenadantes se congelaron a -20°C hasta el análisis. El análisis cuantitativo del producto de reacción L-PPT y la determinación de la pureza enantiomérica se llevaron a cabo tal como se describió arriba. Los resultados aparecen resumidos en la Tabla 3. Bajo las condiciones escogidas, la disociación del substrato L-específico (es decir específico a L) se completó después de aproximadamente 55 horas. En este caso se alcanzaron una tasa de conversión de aproximadamente 90% y un rendimiento espacio/tiempo de 483 [mg de L-PPT/gr de biocatalizador/hora].

Tabla 3: Cinética de reacción de la disociación racémica de N-acetil-D,L-PPT

Tiempo de reacción [horas]	L-PPT [mM] *
0	0
1	27,7
4	59,7
9	106,0
23	181,6
31	186,5
47	208,6
55	221,8 90%

* Concentración del biocatalizador: 13 mg/ml

Concentración del substrato: 500 mM de N-acetil-D,L-PPT

5. Inmovilización de la proteína deac purificada

Para poder efectuar la reacción enzimática con la proteína deac aislada, la enzima purificada en el Ejemplo 2 como proteína de fusión His Tag fue inmovilizada en el vehículo poli-

mérico VINA-Epoxy Biosynth® (Riedel de Haen). Para esto la proteína deac se concentró hasta 15 mg/ml mediante precipitación de sulfato de amonio y fue dializada durante la noche contra 1 M de fosfato Na, pH = 8,0. Para una reacción de acoplamiento estándar, 10 mg de la proteína se agitaron lentamente a temperatura ambiente durante 2 días con 100 mg de vehículo VINA. Luego el inmovilizato se centrifugó y se lavó 1 vez en cada caso en amortiguador de inmovilización y también en 50 mM de fosfato Na, pH = 7,0. Para bloquear los grupos epoxi libres, el vehículo fue incubado entonces a temperatura ambiente con 50 mM de fosfato Na y 50 mM de 2-mercapto-etanol durante 1 hora. Se almacenó luego el biocatalizador a 4°C en 1 ml de 5 mM de fosfato Na, pH = 7,0 y 0,02 % de azidas Na. Para la determinación del acoplamiento de proteína, el contenido de proteína de la solución se determinó antes y después de la inmovilización y también en las soluciones de lavado con la ayuda del método de Bradford [Bradford (1976), Anal. Biochem. 72: 248-254]. La actividad específica de la deacetilasa fue medida antes y después de la inmovilización utilizando la prueba radioactiva descrita en el Ejemplo 1. Después del acoplamiento la actividad enzimática relativa fue > 90% del valor determinado para la proteína disuelta.

6. Disociación racémica de N-acetil-D,L-fosfinotricina usando enzima deac inmovilizada en un reactor de columna

1 gr del inmovilizato enzimático (peso húmedo) se cargó en un reactor de columna y se utilizó como biocatalizador para la disociación racémica de varias soluciones de sustrato concentradas que tenían distintas tasas de flujo. Las soluciones de sustrato contenían las concentraciones de N-acetil-D,L-PPT, sal diamónica en 10 mM de NaCl, 10 mM de fosfato Na, pH = 8,0, que se indican en la Tabla 4. Las reacciones se efectuaron a 37°C durante un total de 10 días. Las reacciones se cuantificaron mediante determinación de la L-PPT presente en el flujo

de material a través de la columna por medio de análisis de aminoácidos y HPLC chiral (ver Ejemplo 4). Los resultados aparecen en la Tabla 4. La mayor tasa de conversión (83%) se obtuvo usando las más altas concentraciones (500 mM) y el más bajo flujo de substrato (0,03 ml/min). El rendimiento espacio/tiempo aumentó con la tasa de flujo y con las concentraciones de substrato y alcanzó el valor más alto de 181 [mg de L-PPT/gr de biocatalizador/hora] en una concentración de substrato de 500 mM y un flujo de 0,3 ml/min. A lo largo del período experimental total la deacetilasa inmovilizada mostró una buena estabilidad y todavía tenía aproximadamente 80% de la actividad inicial después de 10 días a 37°C.

Tabla 4: Disociación racémica de N-acetil-D,L-PPT usando enzima deac inmovilizada en un reactor de columna

Solución de substr. N-acetil-D,L-PPT [mM]	Tasa de flujo [Ml/min]	Solución de producto L-PPT [mM]	Tasa de conversión [%]	Rendimiento espacio/tiempo [mg L-PPT/gr de biocataliz./h]*
100	0,1	29,7	59	39
	0,3	22,0	44	87
	0,5	13,8	28	91
250	0,1	38,4	31	50
	0,3	25,0	20	99
	0,5	18,1	14	119
500	0,1	71,1	28	93
	0,3	46,0	18	181
	0,5	26,3	11	173
500	0,03	208,2	83	82

* Reacciones a 37°C

Reivindicaciones de patente:

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) deacetilar selectivamente los derivados N-acetil-L de los correspondientes L-aminoácidos mediante disociación racémica por medio de enzimas recombinantes aisladas, mientras que no se deacetilan los derivados N-acetil-D de los correspondientes D-aminoácidos; y

(b) separar de los derivados N-acetil-D no-deacetilados y/o de los derivados N-acetil-L incompletamente deacetilados los L-aminoácidos deacetilados obtenidos preparativamente.

2. Procedimiento conforme a la reivindicación 1 para la preparación de L-fosfinotricina (L-PPT) a partir de N-acetil-D,L-fosfinotricina.

3. Procedimiento conforme a la reivindicación 1 para la preparación de L-ácido glutámico, L-histidina, L-leucina, L-glutamina y/o L-fenilalanina a partir de sus correspondientes derivados N-acetil-D,L.

4. Procedimiento conforme a una o varias de las reivindicaciones 2 a 3, caracterizado porque la producción enantioselectiva de uno o varios L-aminoácidos a partir de sus correspondientes derivados racémicos N-acetil-D,L se efectúa usando una o varias deacetilasas del grupo de las hipurato hidrolasas.

5. Procedimiento conforme a una o varias de las reivindicaciones 2 a 3, caracterizado porque la producción enantioselectiva de L-fosfinotricina, L-ácido glutámico, L-histidina, L-leucina, L-glutamina y/o L-fenilalanina a partir de sus correspondientes derivados racémicos N-acetil-D,L se efectúa

usando una o varias deacetilasas del grupo de las hipurato hidrolasas.

6. Procedimiento conforme a una o varias de las reivindicaciones 2 a 3, caracterizado porque la producción enantio-selectiva de uno o varios L-aminoácidos a partir de sus correspondientes derivados racémicos N-acetil-D,L se efectúa usando las enzimas deac1 de *Stenotrophomonas* sp. y/o deac2 de *Comamonas acidovorans*.

7. Procedimiento conforme a una o varias de las reivindicaciones 2 a 3, caracterizado porque la producción enantio-selectiva de L-fosfinotricina, L-ácido glutámico, L-histidina, L-leucina, L-glutamina y/o L-fenilalanina a partir de sus correspondientes derivados racémicos N-acetil-D,L se efectúa usando las enzimas deac1 de *Stenotrophomonas* sp. y/o deac2 de *Comamonas acidovorans*.

8. Procedimiento conforme a una o varias de las reivindicaciones 4 a 7, en el cual las deacetilasas recombinantes producidas se emplean en forma inmovilizada.

9. Procedimiento conforme a una o varias de las reivindicaciones 4 a 8, en el cual las temperaturas de reacción son de aproximadamente 25°C a 65°C.

10. Procedimiento conforme a una o varias de las reivindicaciones 4 a 8, en el cual el sustrato está presente en una concentración de aproximadamente 10 a 1500 mM.

11. Uso de una o varias hipurato hidrolasas para la producción enantio-selectiva de uno o varios L-aminoácidos a partir de sus correspondientes derivados racémicos N-acetil-D,L.

12. Uso de una o varias hipurato hidrolasas para la producción enantio-selectiva de L-fosfinotricina, L-ácido glutámico, L-histidina, L-leucina, L-glutamina y/o L-fenilalanina a partir de sus correspondientes derivados racémicos N-acetil-D,L.

41

13. Uso de deac1 de *Stenotrophomonas* sp. y/o deac2 de *Comamonas acidovorans* para la producción enantio-selectiva de uno o varios L-aminoácidos a partir de sus correspondientes derivados racémicos N-acetil-D,L.

14. Uso de deac1 de *Stenotrophomonas* sp. y/o deac2 de *Comamonas acidovorans* para la producción enantio-selectiva de L-fosfinotricina, L-ácido glutámico, L-histidina, L-leucina, L-glutamina y/o L-fenilalanina a partir de sus correspondientes derivados racémicos N-acetil-D,L.

Resumen

Procedimiento para la preparación de L-aminoácidos apartir de sus derivados racémicos N-acetil-D,L mediante disociación racémica enzimática por medio de enzimas recombinantes aisladas

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

(a) deacetilar selectivamente los derivados N-acetil-L de los correspondientes L-aminoácidos mediante disociación racémica enzimática por medio de enzimas recombinantes aisladas, mientras que no se deacetilan los derivados N-acetil-D de los correspondientes D-aminoácidos; y

(b) separar de los derivados no-deacetilados N-acetil-D y/o de los derivados N-acetil-L incompletamente deacetilados los L-aminoácidos deacetilados obtenidos preparativamente.

rethorou telos 44 y 45 fajelato

202016

Extracto de Publicación
Folio 43
192047

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE

PATENTE DE INVENCION [X]

MODELO DE UTILIDAD []

- Nombre e identificación del Solicitante []
- Nombre e identificación del Inventor []
- Título o nombre de la Invención []
- Descripción 24 []
- Reivindicaciones 39 []
- Resumen 43+42 []
- Comprobante de Pago 2 []

COMPLETA [X]

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- Nombre e identificación del peticionario []
- Nombre e identificación del inventor o diseñador []
- Indicación del género de productos para los cuales debe utilizarse []
- Representación gráfica []
- Comprobante de pago []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Firma Responsable

Fecha:

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
PRIMER EXAMEN DE FORMA

430
 2000-07-13

EXPEDIENTE 00-52026

Practicado el examen jurídico de acuerdo con lo establecido en el art. 21 de la Decisión 344 se determinó que esta solicitud de Patente de Invención:

SI ☐ NO ☒ NO APLICABLE ☐ Presentó los poderes necesarios en forma correcta (Decisión 344, art. 14-a).

SI ☒ NO ☐ NO APLICABLE ☐ Acreditó, en forma correcta, la existencia y representación de la persona jurídica solicitante (art. 14-c de la Decisión 344; literal g) del art. 4 del Decreto 117/94).

SI ☒ NO ☐ NO APLICABLE ☐ Presentó, en forma correcta, el comprobante de pago por la tasa de presentación establecida (art. 13-f de la Decisión 344 y la Resolución 02 del 4 de Enero del 2000)

SI ☒ NO ☐ EXTEMPORANEAMENTE ☐ Reivindicó prioridad, dentro del plazo y de acuerdo con lo previsto en el Artículo 4 del Convenio de Paris.

SI ☒ NO ☐ NO APLICABLE ☐ Presentó copia, certificada su conformidad por la Administración que recibió la solicitud de la cual reivindica prioridad, al momento de radicar la solicitud nacional.

SI ☒ NO ☐ NO APLICABLE ☐ Presentó la traducción del capítulo reivindicatorio de la solicitud de la cual se reivindica prioridad (Art. 4, D-3 Convenio de Paris; Concepto: 5 de enero de 1999 S.I.C.).

SI ☐ NO ☒ CUMPLE LOS REQUISITOS JURIDICOS

OBSERVACIONES: Debe allegar la traducción oficial del poder, junto con el aval del traductor oficial, expedido por el Ministerio de Relaciones Exteriores, de conformidad con el artículo 260 del Código de Procedimiento Civil.

En consecuencia, se conceptúa que esta solicitud:

SI ☐ NO ☒ Se ajusta a los aspectos **FORMALES** indicados en la Decisión 344 y por tanto,

SI ☐ NO ☒ Se recomienda **PUBLICAR** el extracto correspondiente.

Santafé de Bogotá, D.C., 13 de Julio del 2000

EXAMINADOR JURIDICO.
 202022

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO.

PRIMER EXAMEN DE FORMA.

Radicación No. 00-52026

Concepto Técnico No. 1721

Clasificación Internacional de Patentes: C12P 41/00

372
2000-10-30

Practicado el examen, de acuerdo a lo establecido en el Art. 21 de la Decisión 344, se determinó que la presente solicitud de **Patente de Invención**:

- SI ☒ NO ☐ Contiene la identificación correcta del inventor (Art. 8, Art 13-a).
- SI ☒ NO ☐ Contiene la identificación correcta del solicitante (Art. 13-a)
- SI ☒ NO ☐ Contiene el resumen con el objeto y finalidad de la invención en forma correcta (Art. 13-e)
- SI ☒ NO ☐ Contiene el título o nombre de la invención en forma correcta (Art. 13-b)
- SI ☒ NO ☐ Contiene la descripción clara y completa de la invención (Art. 13-c)
- SI ☒ NO ☐ Contiene los dibujos correctos (Art. 14-c junto con el literal d) del Art. 4 del (Dto. 117 del 94).
- SI ☒ NO ☐ Contiene las unidades de medida en el sistema exigido (Art. 14-c junto con el Dto. 3464 del 26 de diciembre de 1980)
- SI ☒ NO ☐ Contiene una o más reivindicaciones, en forma correcta, que precisen la materia para la cual solicita protección mediante la patente (Art. 13-d).
- SI ☒ NO ☐ Contiene el extracto de acuerdo con el literal c) del artículo 4 de Dto 117 del 94.
- SI ☒ NO ☐ Contiene el arte final del dibujo característico de acuerdo con el literal c) del artículo 4 y el artículo 27 del Dto. 117 del 94.
- SI ☒ NO ☐ Contiene la tarjeta de archivo temático (forma P-104) en forma correcta (Artc 14-c junto con el literal b) del 1rt. 4 del Dto. 117 del 94).
- SI ☒ NO ☐ Contiene la tarjeta de archivo de propietarios (forma P-105) en forma correcta (Art. 14-c junto con el literal b) del Art. 4 del Dto. 117 del 94).
- SI ☒ NO ☐ **CUMPLE CON LOS REQUISITOS TÉCNICOS DE FORMA.**

OBSERVACIONES DEL PRIMER EXAMEN TÉCNICO DE FORMA:**EXAMINADOR TÉCNICO: 202016.**

Bogotá, D.C., 30 de octubre de 2000

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

EDIENTE 00-52026

O 2441

DISPONE

430
2000-11-10

ARTICULO PRIMERO: Conforme lo establece el artículo 22 de la Decisión 344 de la Comisión del Acuerdo de Cartagena, requiérese al solicitante, para que dentro del plazo treinta (30) días hábiles siguientes a la fecha de notificación del auto, presente respuesta a las observaciones o complementé los antecedentes señalados en el examen forma.

ARTICULO SEGUNDO: Notificar por estado el presente auto, advirtiéndole que contra el presente recurso alguno en la vía gubernativa.

NOTIFIQUESE Y CUMPLASE 07 NOV. 2000
en Santafé de Bogotá D.C., a los _____

JEFE DE LA DIVISION DE NUEVAS CREACIONES,

CARMENZA CESPEDES DE VERGEL

NOTADO POR ESTADO

Bogotá D.C., 2000 notificado por anotación en estado de esta misma

NOTIFICACION ESTADO 27-12-00

PRORROGA TERMINO SI___ NO___

TERMINO PRORROGA