



No. 11-165857- -00006-0000

Fecha: 2013-09-25 16:44:32 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 523 RESPUESTA Folios: 23

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

Dirección de Nuevas Creaciones

E. S. D.

**Ref: EXPEDIENTE No. 11-165857**

Solicitud de patente a nombre de  
DANISCO US INC.

Me refiero al Oficio No. 8896, notificado en este asunto que contiene el examen de fondo realizado a la solicitud de patente, de conformidad con el artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

Adjunto un nuevo pliego de reivindicaciones dirigido a variantes de celulasa que tienen una sustitución en la posición 98 seleccionada de P98L y P98Q (reivindicación 1).

Las reivindicaciones 2 a 4 (reivindicaciones anteriores 12, 19 y 20) dependen de la reivindicación 1 y especifican sustituciones adicionales en la variante.

La reivindicación 5 (reivindicación anterior 23), especifica que la variante de celulasa es aislada.

Las reivindicaciones 2 – 11, 13 – 18 y 21 – 22 se han cancelado.

Las reivindicaciones 6 a 18 (reivindicaciones previas 24 a 36) se han corregido para actualizar su dependencia debido a las correcciones y cancelaciones de las reivindicaciones anotadas anteriormente.

Las reivindicaciones 15 – 17 (reivindicaciones previas 33 – 35), se han corregido para reemplazar “la composición de las reivindicaciones 24 o 32” con “la variante de celulasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4”.

A cada punto del Oficio, los solicitantes exponen la siguiente respuesta:

**4. Reivindicaciones relacionadas con un uso o un segundo uso  
(Artículo 14 y 21 D 486)**

El uso de las reivindicaciones 33 – 35 se consideró como no patentable de acuerdo con el Artículo 14.

Las reivindicaciones 33 - 35 (ahora, reivindicaciones 15-17) hace estas reivindicaciones patentables.

## **5. Con respecto a la solicitud de patente**

### Listado de Secuencias

El examinador exige que el listado de secuencias debe presentarse separadamente de la descripción, bajo el título: "Listado de Secuencias".

El listado de secuencias adjunta a este escrito. Anotamos que la figura 1 es el listado y a continuación de la misma se ha indicado "LISTADO DE SECUENCIAS".

### Descripción (Artículo 28 D 486)

El examinador exige que presentemos las tablas y figuras mencionadas en la descripción de la solicitud se adjuntan.

Las reivindicaciones (los números se refieren a los señalados en la Acción Oficial para esta sección).

1. Reivindicaciones no concisas: Las correcciones a las reivindicaciones abordan este asunto (el número de las reivindicaciones independientes se ha reducido significativamente).

2. Modificación no indicada en las reivindicaciones 1-7: Las correcciones a las reivindicaciones abordan este asunto (es decir, se indican las modificaciones para todas las sustituciones de aminoácidos, v.g., P98Q y P98L en la reivindicación 1).

3. Reivindicaciones 1-7 no concisas debido al número de variantes: las correcciones a las reivindicaciones abordan este asunto (es decir, las reivindicaciones se dirigen a variantes de celulasa que tienen una sustitución en la posición 98).

4. Este asunto es irrelevante ya que la reivindicación 21 se cancela.

5. Este asunto es irrelevante ya que la reivindicación 22 se cancela.

6. Las reivindicaciones 24, 25, 30 – 32 tienen que caracterizarse con base en los elementos que las comprenden y sus relaciones: sírvase anotar que la invención se dirige a variantes específicas de celulasas inventivas que encuentran uso en numerosas aplicaciones. Ejemplos de las aplicaciones/usos potenciales de celulasas inventivas se proveen en el capítulo descriptivo y son bien conocidos por las personas versadas en el arte. Los parámetros específicos de una composición útil que contiene las celulasas inventivas (así como en cuanto a la forma en que pueden usarse para un propósito dado) pueden variar significativamente. En consecuencia, especificar limitaciones estrechas (v.g., componentes específicos y sus relaciones) restringiría innecesariamente el ámbito de cobertura. Debido a que la actividad inventiva no está ligada a la formulación precisa de la composición, sino que se basa más bien en la variante de celulasa inventiva presente en ella, tales detalles no deberían requerirse.

7. La reivindicación 26 debe caracterizarse por su secuencia nucleotídica: Como se describe claramente en la solicitud (v.g., página 34, párrafo 138), existen muchas secuencias nucleotídicas que pueden codificar una variante de celulasa, como se reivindica. Esto se debe en gran parte a la degeneración del código genético, por lo cual el mismo aminoácido puede codificarse en una secuencia de ácido nucleico por múltiples codones diferentes. Esta degeneración es bien conocida y entendida en el arte. En consecuencia, proporcionar una secuencia de aminoácidos es suficiente para informar a una persona versada en el arte de la constelación de ácidos

nucleicos que pueden codificarla (v.g., con la ayuda de un computador).

8. La reivindicación 27 debe definir elementos del vector: Existen numerosas configuraciones de vectores de expresión que pueden usarse, como se describe claramente en el capítulo descriptivo (v.g., párrafos 140 a 146) y son bien conocidas en el arte. Por consiguiente, señalar limitaciones estrechas (v.g., elementos y secuencias específicos) limitaría innecesariamente el ámbito de cobertura. Debido a que la actividad inventiva no está ligada a los elementos y secuencias precisos contenidos en el vector, sino que se basa más bien en la variante de celulasa inventiva presente en ella, tales detalles no deberían requerirse.

9. La reivindicación 28 se refiere a una célula hospedera, pero no se especifica el tipo: Como se detalla en el capítulo descriptivo y como es bien conocido en el arte, numerosas células hospederas pueden manipularse para incluir el vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica la variante de celulasa inventiva. En consecuencia, en forma similar a los argumentos indicados más arriba, hay que argumentar que señalar limitaciones estrechas (v.g., células hospederas específicas) limitaría innecesariamente el ámbito de cobertura. Por lo demás, sírvase anotar que constituiría una carga significativa para los solicitantes depositar todas la células hospederas posibles, cubiertas por estas reivindicaciones.

10. La reivindicación 29 debe definirse por los pasos del método, los reactivos y las condiciones del proceso. Nuevamente, como se discute en referencia a la reivindicación 28 (actualmente reivindicación 10), especificar las limitaciones requeridas limitaría innecesariamente la cobertura de la invención reivindicada. Es claro, a partir del capítulo descriptivo, que existe una amplia variedad de métodos para producir la variante de celulasa

inventiva usando la célula hospedera de la reivindicación 10, los cuales son bien conocidos por las personas versadas en el arte.

11. La reivindicación 32 no es concisa por el uso de la expresión “por lo menos”: sírvase anotar que la expresión “por lo menos” se ha eliminado de la reivindicación 32 (ahora reivindicación 14).

12. Las reivindicaciones 33 – 35 reivindican un uso que podría darse al producto reclamado y no constituye una característica técnica que define la invención: sírvase anotar que estas reivindicaciones se han corregido para referirse a las variantes de celulasa de las reivindicaciones 1-4.

13. La reivindicación 36 debe definirse por los pasos del método, los reactivos y las condiciones del proceso. Como se discute con referencia a la reivindicación 29 (ahora reivindicación 11), proporcionar las limitaciones requeridas limitaría innecesariamente la cobertura de la invención reivindicada. Es claro, a partir del capítulo descriptivo, que existe una amplia variedad de métodos para usar la variante de celulasa inventiva para producir un combustible, los cuales son bien conocidos por las personas versadas en el arte.

#### **6. Unidad de la Invención (Artículo 25 D 486)**

El examinador declara que no existe unidad de invención en vista de las enseñanzas del documento D1.

Sírvase notar que, como se expone anteriormente, las reivindicaciones se han corregido para dirigirse a variantes de celulasa que tienen una sustitución en la posición 98 seleccionada de P98L y P98Q (siendo posibles sustituciones adicionales). Las reivindicaciones tienen ahora unidad.

## **8. Examen de la Patentabilidad (Artículo 14, D 486)**

Al evaluar la patentabilidad, El examinador sostiene lo siguiente:

El problema técnico que se pretende resolver por esta invención puede enunciarse en la siguiente forma: “cómo modificar las variantes de celulasa con mutaciones en diferentes posiciones para mejorar su actividad, expresión y/o estabilidad del procedimiento enseñado en D1 y D2 para obtener una celulasa con una mutación en la posición 5 de SEQ ID No. 3 (teniendo opcionalmente otras mutaciones) con propiedades mejoradas”.

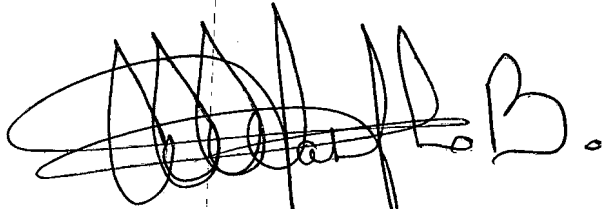
El examinador anota a continuación que las reivindicaciones son diferentes en que especifican una variante de celulasa en una posición definida (posición 5 se anotó en la acción oficial; la posición 98 es ahora el sitio reivindicado).

El examinador declara entonces que, en razón de que las variantes de celulasa de SEQ ID No. 3 y los métodos para obtener las variantes de celulasa con propiedades mejoradas y de interés para la industria, ya se encuentran divulgadas en los documentos D1 y D2, “una persona normalmente versada en el arte incluiría una mutación en la posición 5 de SEQ ID No. 3 (teniendo opcionalmente otras mutaciones) en las celulasas del documento D1 y D2 consiguiendo así el objeto de la reivindicación 1 de la solicitud”. La Oficina concluye entonces que la invención reivindicada se considera obvia.

En respuesta, El examinador ha caracterizado erróneamente el problema técnico de la invención reivindicada. Específicamente, la invención reivindicada se dirige a **proveer una variante de celulasa específica que tiene propiedades deseadas** (es decir, que tiene una sustitución en la

posición 98 de P98Q o P98L). El problema técnico no es, como se sostiene más arriba, **cómo modificar las variantes de celulasa**. Hay que hacer énfasis en que divulgar meramente un proceso para la forma en que se podría mutar y adicionar una variante de celulasa en la ausencia de una enseñanza con respecto al sitio específico reivindicado (es decir, la posición 98) no es suficiente para hacer obvia la invención reivindicada. Por consiguiente, el hecho de que ni D1 ni D2 enseñen las variantes de celulasas específicas reivindicadas (es decir, que tienen una sustitución en la posición 98 de P98Q o P98L), estas referencias no hacen obvia la invención reivindicada.

Atentamente,



**JERÓNIMO CASTILLO BONILLA**  
C.C. 79.462.057 Bogotá  
T.P 104167 C.S. Judicatura

## **Reivindicaciones:**

1. Una variante de celulasa, en donde la variante es una forma madura que tiene actividad celulasa y comprende una sustitución en la posición 98, en donde las posiciones se numeran por correspondencia con la secuencia de aminoácidos de una celobiohidrolasa II (CBH2) de referencia indicada como SEQ ID NO:3, en donde la variante se deriva de una celulasa progenitora cuya secuencia de aminoácidos es por lo menos 85% idéntica a SEQ ID NO:3, y en donde la sustitución en la posición 98 se selecciona de P98L y P98Q.
2. La variante de celulasa de la reivindicación 1, en donde la variante de celulasa comprende una glutamina en la posición 98, y comprende además una sustitución seleccionada del grupo conformado por una T138C, una S316P, una S343Q, una Q362I, una S386C, una C400S y una S406P.
3. La variante de celulasa de la reivindicación 1, en donde la variante de celulasa comprende además:  
leucina o serina en la posición 111;  
asparagina o triptófano en la posición 182;  
serina o ácido glutámico en la posición 291;  
serina o prolina en la posición 316;  
glutamina, isoleucina o leucina en la posición 362; y  
cisteína o serina en la posición 400;  
en donde, cuando la variante de celulasa consta de una sustitución única, la sustitución única no es una del grupo seleccionado de una sustitución P98L, y una sustitución S316P.
4. La variante de celulasa de la reivindicación 3, en donde la variante comprende además una sustitución L439P o una sustitución T74S.
5. La variante de celulasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la variante es aislada.
6. Una composición que contiene la variante de celulasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. La composición de la reivindicación 6, en donde la composición es enriquecida en la variante de celulasa.
8. Un ácido nucleico aislado que codifica la variante de celulasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

9. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico aislado de la reivindicación 8 conectado operativamente a una secuencia reguladora.
10. Una célula hospedera que comprende el vector de expresión de la reivindicación 9.
11. Un método para producir una variante de celulasa, que comprende cultivar la célula hospedera de la reivindicación 10 en un medio de cultivo, bajo condiciones apropiadas para producir la variante de celulasa.
12. Una composición que comprende la célula hospedera de la reivindicación 11 y medio de cultivo.
13. Una composición que comprende la variante de celulasa en el sobrenadante del medio de cultivo de la reivindicación 11.
14. La composición de la reivindicación 6, que contiene además una enzima adicional seleccionada del grupo conformado por una subtilisina, una metaloproteasa neutra, una lipasa, una cutinasa, una amilasa, una carbohidrasa, una pectinasa, una mananasa, una arabinasa, una galactanasa, una xilanasas, una oxidasa y una peroxidasa.
15. Un método de limpieza o cuidado de una tela que comprende contactar una superficie o un artículo, que incluye una tela, con la variante de celulasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
16. Un método para eliminar las pelusas y dar acabado superficial a una tela, que comprende contactar una superficie o un artículo, que incluye una tela, con la variante de celulasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
17. Un método para convertir biomasa en azúcares que comprende contactar la biomasa con la variante de celulasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
18. Un método para producir un combustible que comprende: contactar una composición de biomasa con una composición enzimática que contiene la variante de celulasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para generar una solución de azúcar; y cultivar la solución de azúcar con un microorganismo fermentador bajo condiciones suficientes para producir un combustible.

# LISTADO DE SECUENCIAS

FIG. 1

|                          |                                                    |
|--------------------------|----------------------------------------------------|
| T. reesei CBH #3         | -----QACSSVWGQCGGQN----W                           |
| H. koningii CBH #4       | -----QACSSVWGQCGGQN----W                           |
| H. insolens CBH #5       | -----APVVEERQNCAPTGWQCGGIG--F                      |
| A. cellulolyticus CBH #6 | -----MLRYLSIVAATAILTGVEAQSVWGQCGGQG----W           |
| A. bisporus CBH #7       | -----QSPV-----WGQCGGNG----W                        |
| F. oxysporum EG #8       | -----APVEERQSCSNGVWAQCGGQN----W                    |
| P. chrysosporium CBH #9  | -----MKSTAFFAALVTLLPAYVAGQASE--WGQCGGIG----W       |
| T. emersonii CBH #10     | -----MRNLLALAPAALLVGAAEAQQLWGQCGGSS----W           |
| T. fusc CBH #11          | -AGCSVDYTVN-SWGTGFTANVTITNLGSAINGWTLEWDFPGNQVTLNW  |
| T. fusc EG #12           | -----NDSPFYVNPNMSSAEWVRNPNND-----                  |
| C. fimi EG #13           | APGCRVDYAVTNQWPGGFGANVTITNLGDPVSSWKLDWTYTAGQRIQQLW |

\*

|                          |                                                     |
|--------------------------|-----------------------------------------------------|
| T. reesei CBH #3         | SGPTCCASGSTCVYSNDYYSQCLP--GA---ASSSSSTRAAST----TSR  |
| H. koningii CBH #4       | SGPTCCASGSTCVYSNDYYSQCLP--GA-----ASSSSSTRASSTTA     |
| H. insolens CBH #5       | NGPTCCQSGSTCVKQNDWYSQCLP--GSQVTTTSTTSTSSST----TSR   |
| A. cellulolyticus CBH #6 | SGATSCAAGSTCSTLNPYYAQCLP--GT-----ATSTTLV----KTT     |
| A. bisporus CBH #7       | TGPTTCASGSTCVKQNDYYSQCLP--NN-----Q                  |
| F. oxysporum EG #8       | SGTPCCTSGNKCVKLNDFYSQCQP--GS-----AEPs----STA        |
| P. chrysosporium CBH #9  | TGPTTCVSGTTCTVLNPYYSQCLP--GS-AVTTTTSVITSHSSS----VSS |
| T. emersonii CBH #10     | TGATSCAAGATCSTINPYAQCLP--AT-----ATPTTLT----TTT      |
| T. fusc CBH #11          | NGTYTQSGQHVSNSAPYNASI-PANGTVEFGFNGSYSGSNDIPSSFKLN   |
| T. fusc EG #12           | PRTPVIRDRIASVPQGTWFAHNP--GQ-----ITGQVDA----LMS      |
| C. fimi EG #13           | NGTASTNGGQSVTSLPWNGSI-PTGGTASFGFNGSWAGSNPTPASFSLN   |

\*

|                          |                                                     |
|--------------------------|-----------------------------------------------------|
| T. reesei CBH #3         | VSPTTSR---SSSATPPPGSTTTRVPP-VGSGTATYSGNPFVGVTPWANA  |
| H. koningii CBH #4       | RASSTTS---RSSATPPPGSSTTRVPP-VGSGTATYSGNPFVGVTPWANA  |
| H. insolens CBH #5       | ATSTTRT---GGVTSITTAPTRTVTIPGATTTASYNPNPFEGVQLWANN   |
| A. cellulolyticus CBH #6 | SSTSVGT-----TSPPTTTTAKAST-TATTTAAASGNPFSGYQLYANP    |
| A. bisporus CBH #7       | APPSTTT---QPGTTPPATTTSGGTGP-TSGA-----GNPYTGKTVWLSP  |
| F. oxysporum EG #8       | AGPSSTT---ATKTTATGGSSTTAGGS-VTSAPPAASDNPNYAGVDLWANN |
| P. chrysosporium CBH #9  | VSSHSGS---STSTSSPTGPTGTNPPP-PPSA-----NNPWTGFQIFLSP  |
| T. emersonii CBH #10     | KPTSTGG---AAPTTPPPTTTGTTTSP-VVTRPASASGNPFEGYQLYANP  |
| T. fusc CBH #11          | GVTCDGSDDPDPEPSPSPSPSPTDPDEPGGPTNPPPTNPGEKVD---NP   |
| T. fusc EG #12           | AAQAAGK---IPILVVYNAPGRDCGNH-SSGGAPSHS-----AYRSWIDE  |
| C. fimi EG #13           | GTTCTGT---VPTTSPTPTPTPTTP-TPTPTPTPT--PTVTPQPTS GF   |

|                          |                                                     |
|--------------------------|-----------------------------------------------------|
| T. reesei CBH #3         | YYASEVSSLAIPSLTG-AMATAAAVAKVPSFMWLDL-----DKTP-LM    |
| H. koningii CBH #4       | YYASEVSSLAIPSLTG-AMATAAAVAKVPSMMLDFT-----DKTP-LM    |
| H. insolens CBH #5       | YYRSEVHTLAIPQITDPALRAAASAVAEVPSFQWLDRN-----VTVDLTL  |
| A. cellulolyticus CBH #6 | YYSSEVHTLAIPSLTG-SLAAAATKAAEIPSFVWLDTA-----AKVP-TM  |
| A. bisporus CBH #7       | FYADEVAQ-AAADISNPSLATKAASVAKIPTFVWFDTV-----AKVP-DL  |
| F. oxysporum EG #8       | YYRSEVMNLAVPKLSG-AKATAAAKVADVPSFQWMDTY-----DHIS-LM  |
| P. chrysosporium CBH #9  | YYANEVAA-AAKQITDPTLSSKAASVANIPTFTWLDSV-----AKIP-DL  |
| T. emersonii CBH #10     | YYASEVISLAIPSLSS-ELVPKASEVAKVPSFVWLDAQ-----AKVP-SM  |
| T. fusc CBH #11          | FEGAKLYVNPVWSAKA-AAEPGGSANESTAVWLDRIAGIEGNDSPPTTG   |
| T. fusc EG #12           | F-AAGLKNRPAYIIIVEPDLISLMSSCMQHVQQEVLETM-----AYAGKAL |
| C. fimi EG #13           | YVDPTTQGYRAWQAASGTDKALLEKIALTPQAYWVGNNW-----ADAS--- |

:

## LISTADO DE SECUENCIAS

Figure 1 continued

|                          |                                                      |
|--------------------------|------------------------------------------------------|
| T. reesei CBH #3         | EQTLAD-IRTANKNGGN--YAGQFVVYDLPDRDCAALASNGEYSIADGGV   |
| H. koningii CBH #4       | EQTLAD-IRTANKNGGN--YAGQFVVYDLPDRDCAALASNGEYSIADGGV   |
| H. insolens CBH #5       | VETLSE-IRAANQAGANPPYAAQIVVYDLPDRDCAAAASNGEWAIANNGA   |
| A. cellulolyticus CBH #6 | GYTLAN-IEAANKAGASPPIAGIFVVYDLPDRDCAAAASNGEYTVANNGV   |
| A. bisporus CBH #7       | GGYLAD-ARSKNQ-----LVQIVVYDLPDRDCAALASNGEFSLANDGL     |
| F. oxysporum EG #8       | EDTLAD-IRKANKAGGK--YAGQFVVYDLPNRDCAAAASNGEYSLDKDGA   |
| P. chrysosporium CBH #9  | GTYLAS--ASALGKSTGKQLVQIVVIYDLPDRDCAAKASNGEFSIANNGQ   |
| T. emersonii CBH #10     | GDYLDK-IQSQNAAGADPPPIAGIFVVYDLPDRDCAAAASNGEFSIANNGV  |
| T. fusc CBH #11          | SMGLRDHLEEAVRQSGGDPLTIQVVIYNLPGRDCAALASNGELGP--DEL   |
| T. fusc EG #12           | KAGSSQ-ARIYFDAGHSAWHSAPQMASWL---QQADISNSAHGIA-TNT    |
| C. fimi EG #13           | -HAQAE-VADYTGRAVAAGKTPMLVVYAIPGRDCGSHSGGG-----VSE    |
|                          | : : : . . .                                          |
| T. reesei CBH #3         | AKYKN-YIDTIRQIVVEYSD---IRTLVIEPDSLNLVTLNLTGTPK----   |
| H. koningii CBH #4       | DKYKN-YIDTIRQIVVEYSD---IRTLVIEPDSLNLVTLNLTGTPK----   |
| H. insolens CBH #5       | NNYKG-YINRIREILISFSD---VRTILVIEPDSLNLVTLNLTGTPK----  |
| A. cellulolyticus CBH #6 | ANYKA-YIDSIVAQLKAYPD---VHTILVIEPDSLNLVTLNLTGTPK----  |
| A. bisporus CBH #7       | NKYKN-YVDQIAAQIKQFPD---VSVVAVIEPDSLNLVTLNLTGTPK----  |
| F. oxysporum EG #8       | NKYKA-YIAKIKGILQNYSD---TKVILVIEPDSLNLVTLNLTGTPK----  |
| P. chrysosporium CBH #9  | ANYEN-YIDQIVAQIQQFPD---VRVAVIEPDSLNLVTLNLTGTPK----   |
| T. emersonii CBH #10     | ALYKQ-YIDSIREQLTTSYSD---VHTILVIEPDSLNLVTLNLTGTPK---- |
| T. fusc CBH #11          | DRYKSEYIDPIADIMWDFADYENLRIVAIIEIDSLPNLVTNLTGTPK----  |
| T. fusc EG #12           | SNYRW-TADEVA-----YAK---AVLSAIGNPSLRAVIDTSRNGNG----   |
| C. fimi EG #13           | SEYAR-WVDTVAQGIK-----GNPIVILEPDALAQGLD-----          |
|                          | * : : : . . .                                        |
| T. reesei CBH #3         | CA--NAQSAYLECINYAVTQL-NLPNVAMYLDAGHAGWLGWPANQDPAAQ   |
| H. koningii CBH #4       | CA--NAQSAYLECINYAVTQL-NLPNVAMYLDAGHAGWLGWPANQDPAAQ   |
| H. insolens CBH #5       | CS--GAASTYRELTIALKQL-DLPHVAMYMDAGHAGWLGWPANIQPAAE    |
| A. cellulolyticus CBH #6 | CA--EAQSAYYECVNYALINL-NLANVAMYIDAGHAGWLGWSANLSPAAQ   |
| A. bisporus CBH #7       | CA--NAQSAYKEGVYIYAVQKL-NAVGVMTYIDAGHAGWLGWPANLSPAAQ  |
| F. oxysporum EG #8       | CA--KAESAYKELTVYAIKEL-NLPNVSMYLDAGHGGWLGWPANIGPAAK   |
| P. chrysosporium CBH #9  | CA--NAKTTYLACVNYALTNL-AKVGVMYMDAGHAGWLGWPANLSPAAQ    |
| T. emersonii CBH #10     | CA--NAQDAYLECIYAITQL-DLPNVAMYLDAGHAGWLGWQANLAPAAQ    |
| T. fusc CBH #11          | CAYMKQNGGYVNGVGYALRKLGEIPNVYNYIDAHHGWIGWDSNFGPSVD    |
| T. fusc EG #12           | ----PAGNEWCDPSGRAIGTPSTTNTGDPMDAFL--WIKLPGEADGCIA    |
| C. fimi EG #13           | CS--GQGDRVGFLKYAAKSL-TLKGARVYIDAGHAKWLSVDTFVNRLNQ    |
|                          | * : ** *                                             |
| T. reesei CBH #3         | LFANVYKNAS-SPRALRGLATNVANYNGWNIT-----SPPSY           |
| H. koningii CBH #4       | LFANVYKNAS-SPRALRGLATNVANYNGWNIT-----SPPSY           |
| H. insolens CBH #5       | LFAKIYEDAG-KPRAVRGLATNVANYNAWSIS-----SPPPY           |
| A. cellulolyticus CBH #6 | LFATVYKNAS-APASLRGLATNVANYNAWSIS-----SPPSY           |
| A. bisporus CBH #7       | LFAQIYRDAG-SPRNLRLGATNVANFNALRAS-----SPDPI           |
| F. oxysporum EG #8       | LYAQIYKDAG-KPSRVRLVTVNSNYNGWKLS-----TKPDY            |
| P. chrysosporium CBH #9  | LFTQVWQVAG-KSPFIKGLATNVANYNALQAA-----SPDPI           |
| T. emersonii CBH #10     | LFASVYKNAS-SPASVRGLATNVANYNAWSIS-----RCPSY           |
| T. fusc CBH #11          | IFYEAAANASGSTVDYVHGFISSNTANYSATVEPYLDVNGTVNGQLIRQSKW |
| T. fusc EG #12           | GAGQFVPQAAAYEMAIAGGTNPNNPNP--TP-----TPTPT            |
| C. fimi EG #13           | V-----GFEYAVGFALNTSNYQT-----                         |
|                          | * . *                                                |

## LISTADO DE SECUENCIAS

Figure 1 continued

|                          |                                                     |
|--------------------------|-----------------------------------------------------|
| T. reesei CBH #3         | TQGNNAVYNEKLYIHAIGPLLANHGWSN-AFFITDQGRSGK----QPTGQQ |
| H. koningii CBH #4       | TQGNNAVYNEQLYIHAIGPLLANHGWSN-AFFITDQGRSGK----QPTGQQ |
| H. insolens CBH #5       | TSPNPYDEKHYIEAFRPLLEARGFP--AQFIVDQGRSGK----QPTGQK   |
| A. cellulolyticus CBH #6 | TSGDSNYDEKLYINALSPLLTSGWPN-AHFIMDTSRNGV----QPTGQQ   |
| A. bisporus CBH #7       | TQNSNYDEIHYIEALAPMLSNAGFP--AHFIVDQGRSGV----QNIRD    |
| F. oxysporum EG #8       | TESNPYDEQRYINAFAPLLAQEGWSN-VKFIVDQGRSGK----QPTGQK   |
| P. chrysosporium CBH #9  | TQGNPNYDEIHYINALAPLLQQAGWD--ATFIVDQGRSGV----QNIRQ   |
| T. emersonii CBH #10     | TQGDANCDEEDYVNALGPLFQEQGFP--AYFIIDTSRNGV----RPTKQS  |
| T. fusc CBH #11          | VDWNQYVDELSEFVQDLRQALIAKGFRSDIGMLIDTSRNGWGGPNRPTGPS |
| T. fusc EG #12           | PTPPPGSSGACTATYTTIANEWNDFQATVTVTANQNITGW-----TV     |
| C. fimi EG #13           | -----TADSKAYGQQISQRLGG-----KKFVIDTSRNGN-----G       |

. . . \*

|                          |                                                    |
|--------------------------|----------------------------------------------------|
| T. reesei CBH #3         | QWGD-----WCNVIGTGFGIRPSANTGDSLLDSFVWV              |
| H. koningii CBH #4       | QWGD-----WCNVIGTGFGIRPSANTGDSLLDSFVWI              |
| H. insolens CBH #5       | EWGH-----WCNAIGTGFGMRPTANTGHQYVDAFVWV              |
| A. cellulolyticus CBH #6 | AWGD-----WCNVIGTGFGVQPTTNTGDPLEDAFVWV              |
| A. bisporus CBH #7       | QWGD-----WCNVKGAGFGQRPTTNTGSSSLIDAIVWV             |
| F. oxysporum EG #8       | AQGD-----WCNAKGTGFLRPSTNTGDALADAFVWV               |
| P. chrysosporium CBH #9  | QWGD-----WCNIKAGAGFTRPTTNTGSQFIDSIVWV              |
| T. emersonii CBH #10     | QWGD-----WCNVIGTGFGVRPTTNTGPNLEDAFVWV              |
| T. fusc CBH #11          | SSTDNLNTYVDESRIIDRRHPGNWCNQAGAGLGERPTVNPAPGVDAFVWV |
| T. fusc EG #12           | TWT-----FTDGTITNAWNADVSTSGSSVTARNVG                |
| C. fimi EG #13           | SNGE-----WCNPRGRALGERPVAVNDGSGLDALLWV              |

: : . . . . :

|                          |                                                    |
|--------------------------|----------------------------------------------------|
| T. reesei CBH #3         | KPGGECDDGTSDDSS---APRFDHCA-----LPDALQPAPQAG        |
| H. koningii CBH #4       | KPGGECDDGTSDDSS---APRFDHCA-----LPDALQPAPQAG        |
| H. insolens CBH #5       | KPGGECDDGTSDDTT---AARYDYHCG-----LEDALKPAPEAG       |
| A. cellulolyticus CBH #6 | KPGGESDGTSSNSS---ATRYDFHCG-----YSDALQPAPQAG        |
| A. bisporus CBH #7       | KPGGECDDGTSDDNS---SPRFDHCS-----LSDAHQPAPQAG        |
| F. oxysporum EG #8       | KPGGESDGTSDTS---AARYDYHCG-----LDDALKPAPEAG         |
| P. chrysosporium CBH #9  | KPGGECDDGTSNSS---SPRYDSTCS-----LPDAAQPAPQAG        |
| T. emersonii CBH #10     | KPGGESDGTSTNTT---SPRYDYHCG-----LSDALQPAPQAG        |
| T. fusc CBH #11          | KPPGESDGASEEIPNDEGKGFDRMCDPTYQGNARNGNNPSGALPNAPISG |
| T. fusc EG #12           | HNGLTSQGADEF-----GFVG                              |
| C. fimi EG #13           | KLPGESDGACNGG-----PAAG                             |

: . : \* :

|                          |                     |
|--------------------------|---------------------|
| T. reesei CBH #3         | AWFQAYFVQLLTNANPSFL |
| H. koningii CBH #4       | AWFQAYFVQLLTNANPSFL |
| H. insolens CBH #5       | QWFQAYFEQLLRNANPPF- |
| A. cellulolyticus CBH #6 | TWFQAYFVQLLTNANPALV |
| A. bisporus CBH #7       | TWFQAYFETLVANANPAL- |
| F. oxysporum EG #8       | TWFQAYFEQLLDNANPSFL |
| P. chrysosporium CBH #9  | TWFQAYFQTLVSAANPPL- |
| T. emersonii CBH #10     | TWFQAYFEQLLTNANPLF- |
| T. fusc CBH #11          | HWFSAQFRELLANAYPPL- |
| T. fusc EG #12           | SKGNSNSVPTLTCAAS--- |
| C. fimi EG #13           | QWWQEIALEMARNARW--- |

\*

FIG. 2A

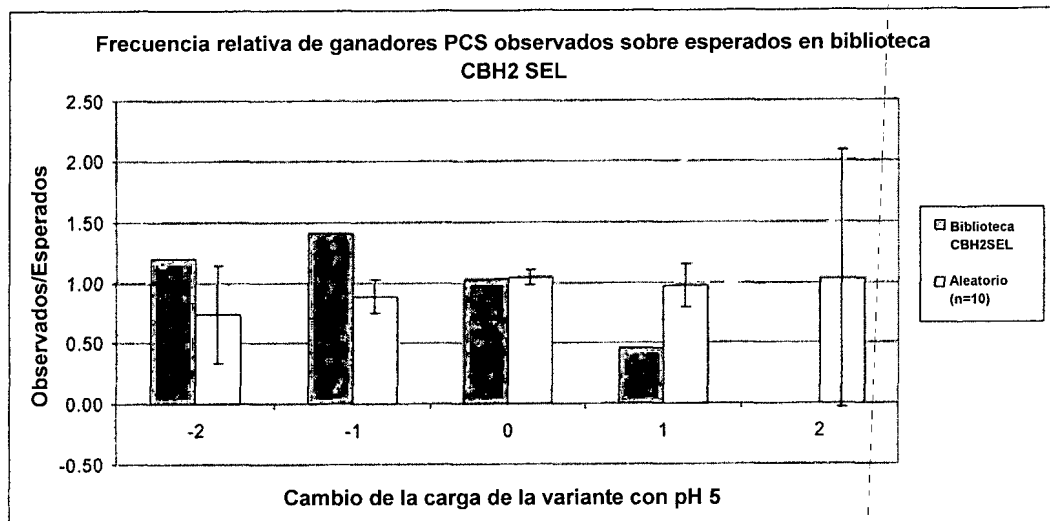


FIG. 2B

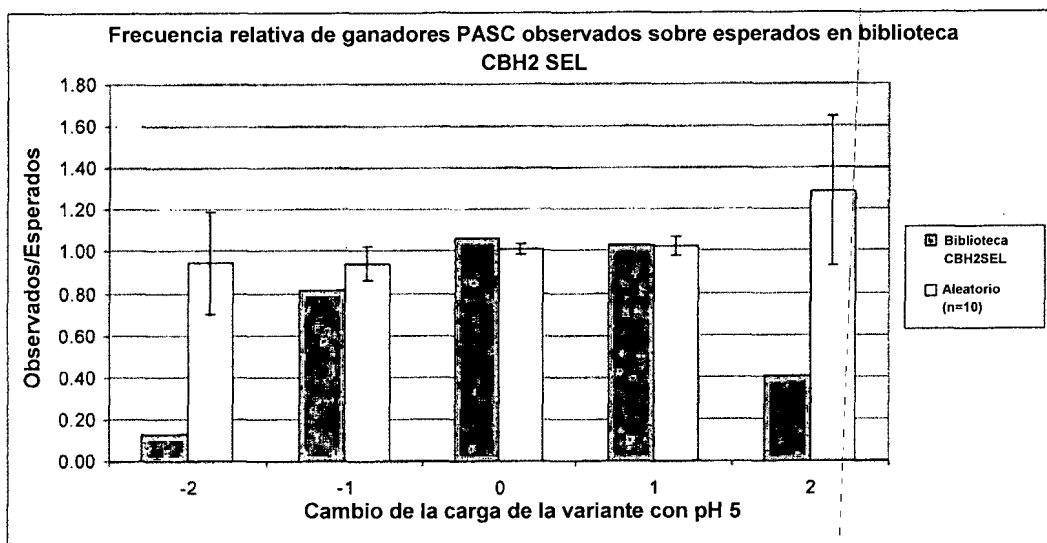


FIG. 3

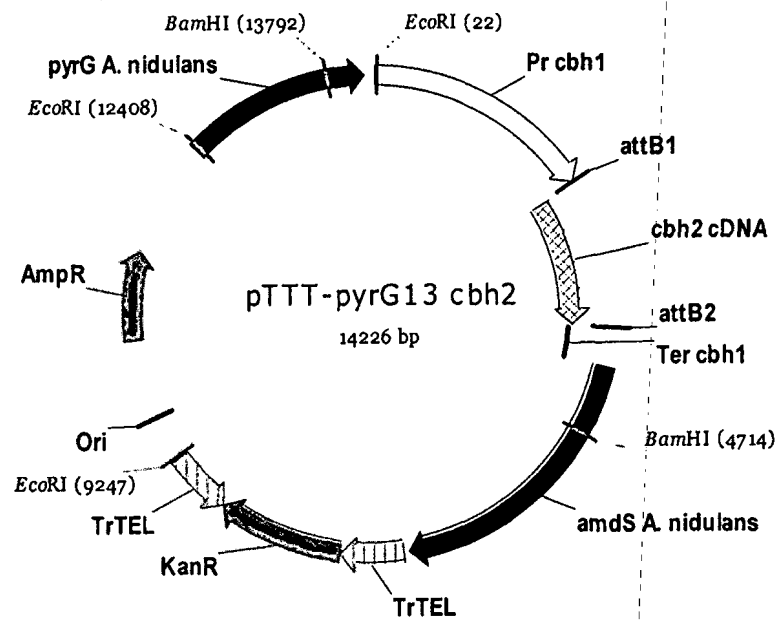


Figura 4. Vectores de delección usados para crear cepas de detección selectiva (*screening*)

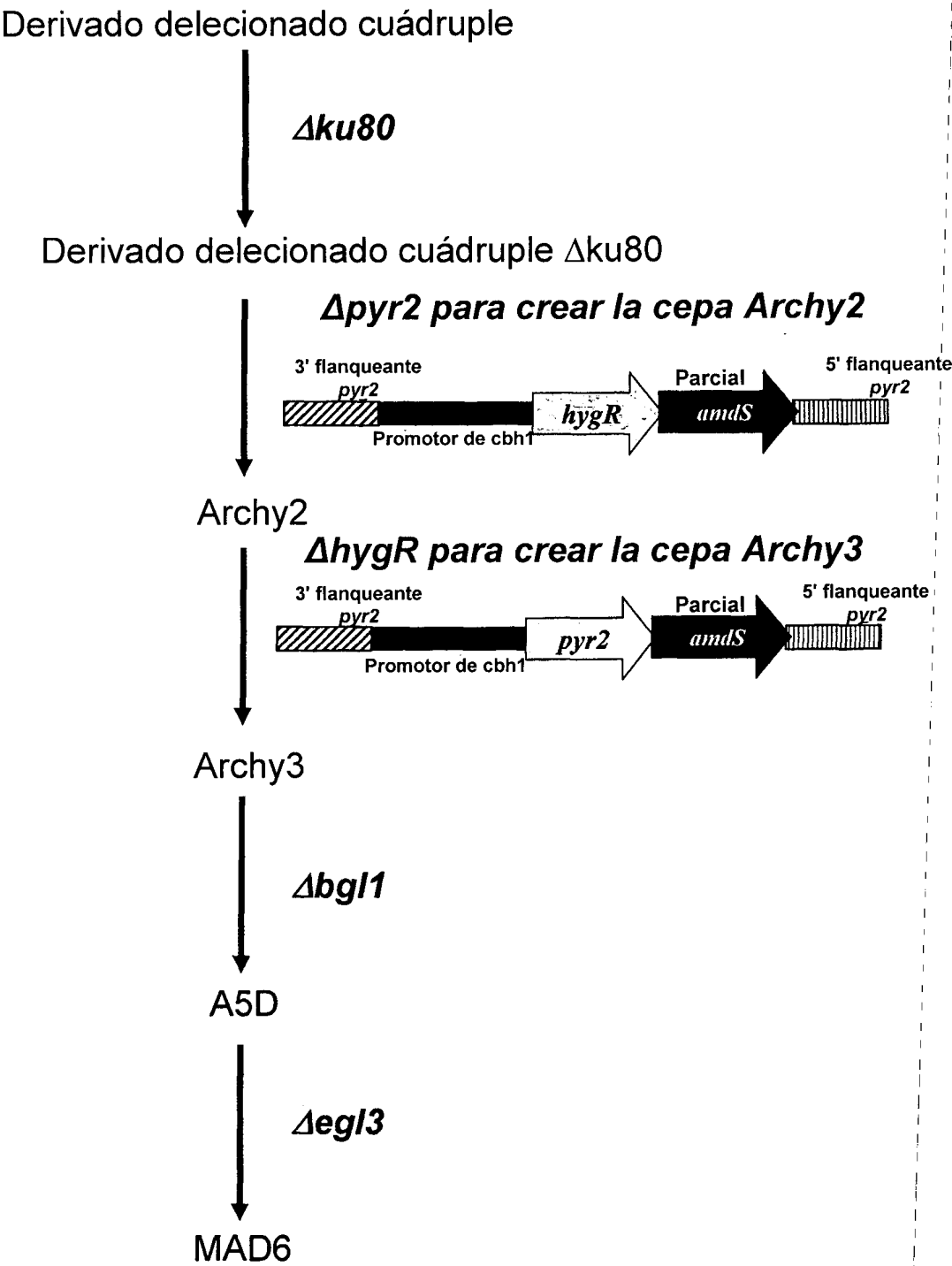
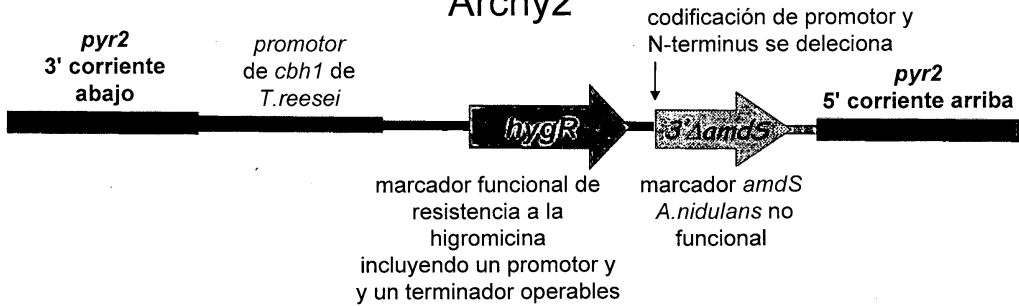


Figura 5. Casete de delección  $\Delta ku80$



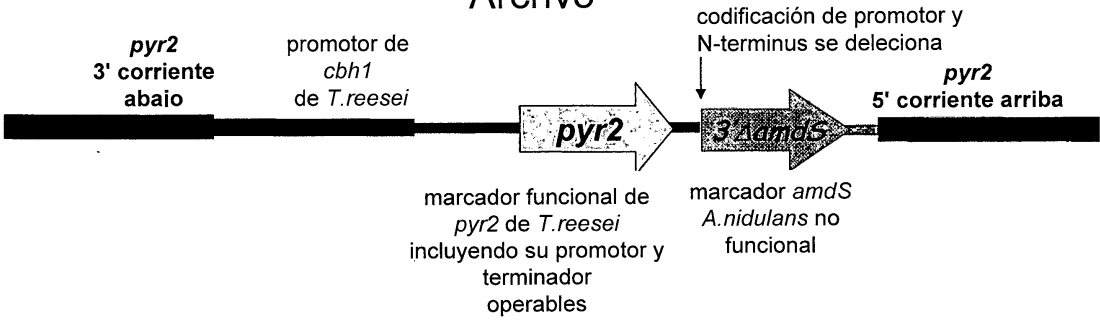
este vector delecionó la *ku80* nativa de *T.reesei*

Figura 6. Casete de delección  $\Delta pyr2$  para crear la cepa Archy2



este vector delecionó la *pyr2* nativa de *T.reesei*

Figura 7. Casete de delección  $\Delta hygR$  para crear la cepa Archv3



este vector delecionó el marcador de resistencia a la higromicina que se había insertado anteriormente en el locus *pyr2*

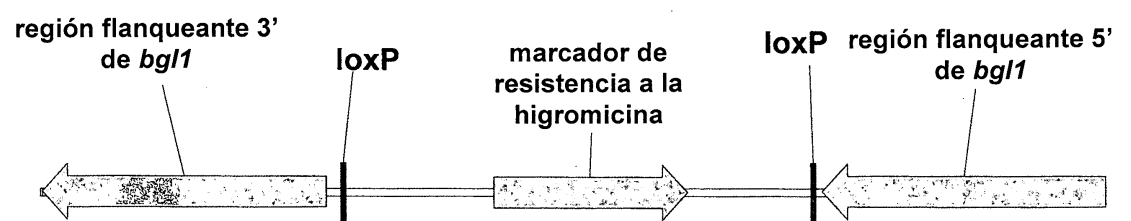


Figura 8. Casete de delección de  $\Delta bgl1$  (5610 bp)



Figura 9. Casete de deleción de  $\Delta eg/3$  (6511 bp)

Figura 10. Plásmido telomérico para expresión de cre recombinasa

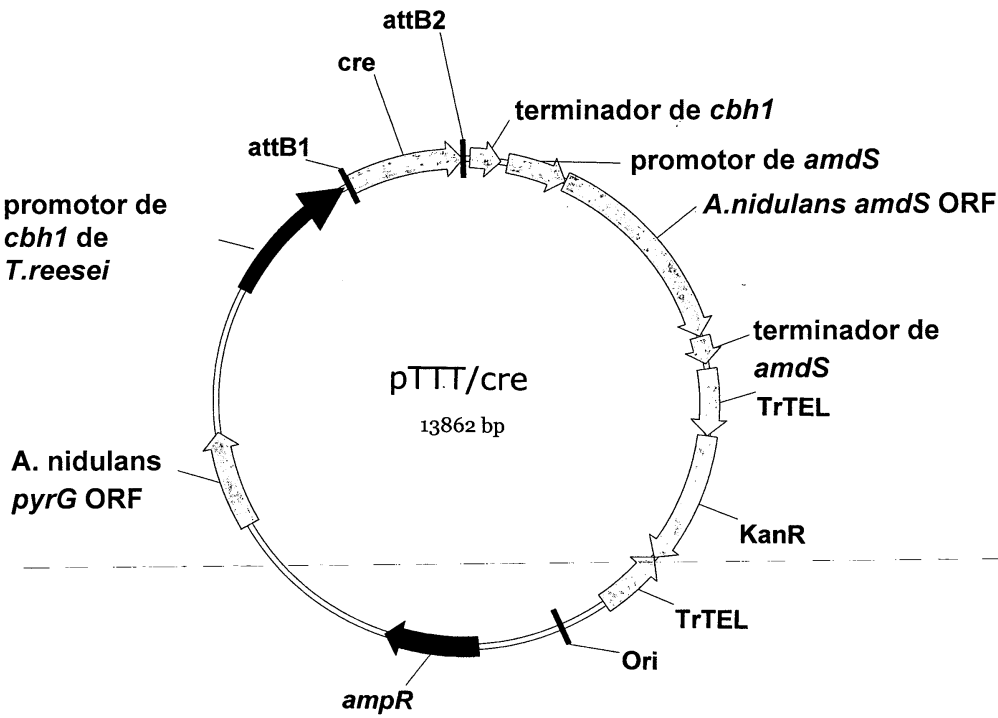
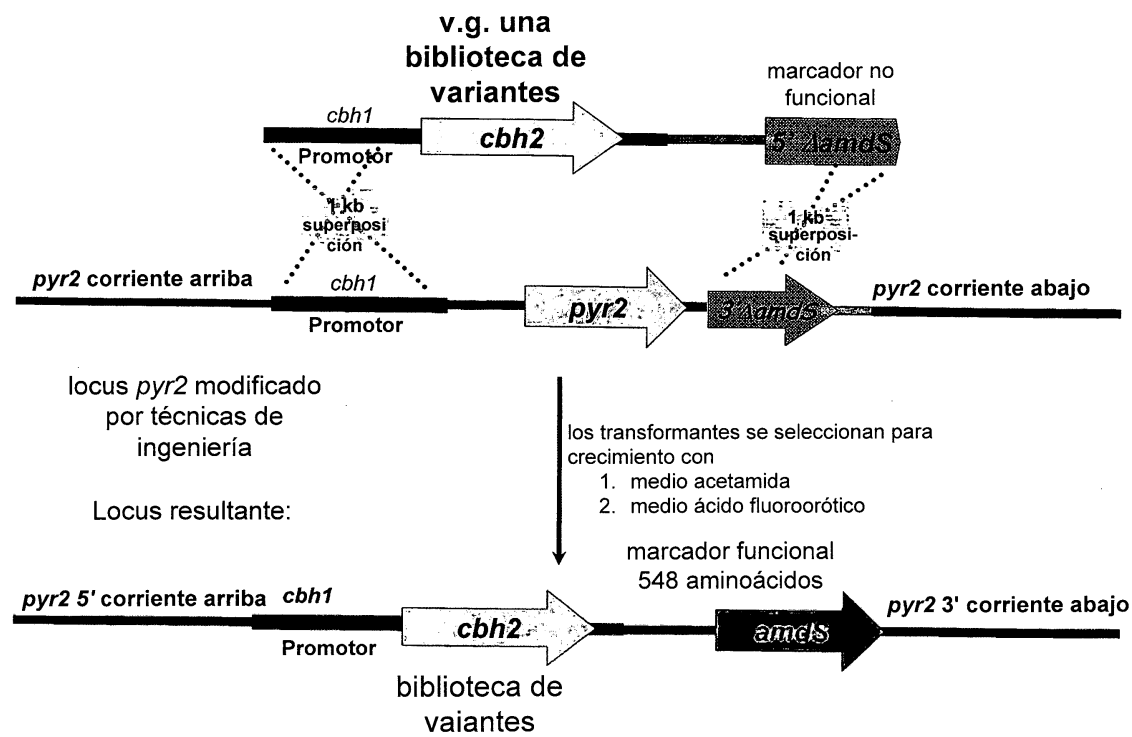


Figura 11. Recombinación homóloga del casete de expresión en el locus objetivo:



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
NIT : 800.176.089-2  
- / -

|                                                                                                                                      |                       |                                               |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------------------------------|
| <br><b>Industria y Comercio</b><br>SUPERINTENDENCIA | <b>RECIBO DE CAJA</b> | <b>No. 13 - 0096671</b>                       |
|                                                                                                                                      |                       | Bogotá D.C., Septiembre 25 de 2013 - 16:23:07 |

|                                   |                 |           |           |                |              |
|-----------------------------------|-----------------|-----------|-----------|----------------|--------------|
| RECIBIDO DE : CASTILLO PINEDA SAS |                 |           |           | NI 860.046.502 |              |
| *** Soporte del Pago ***          |                 |           |           |                |              |
| TIPO PAGO                         | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PAGO     | VR PAGO      |
| CONSIGNACION                      | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 175318824 | 25/09/2013     | 2.372.000.00 |

|                           |             |                                                              |              |              |
|---------------------------|-------------|--------------------------------------------------------------|--------------|--------------|
| *** Conceptos Pagados *** |             |                                                              |              |              |
| CANT.                     | RENTISTICO  | CONCEPTO                                                     | Vr.UNDITARIO | Vr.CONCEPTO  |
| 8 50005-01-01             | SOLICITUDES | 1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC | 30.000.00    | 240.000.00   |
|                           |             |                                                              |              | \$240.000.00 |
|                           |             |                                                              | =====        |              |

SON: \*\*DOSCIENTOS CUARENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\*\*

Responsable: \_\_\_\_\_  
\*\*\*\*\*  
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
  
**No. 11-165857- -00006-0000**  
Fecha: 2013-09-25 16:44:32 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 523 RESPUESTA Folios: 23