

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 04-117741-00006-0000

Fecha: 2008-05-19 16:36:22 Dep: 2020 NUECRLACIONE
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act: 444 RESPUESTAREQUE Folios: 10

As. 95.162

Señora

JEFE DE DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E. S. D.

REF: Expediente No. 04-117741 - Solicitud de patente de invención a
favor de CARGILL, INCORPORATED.

Respuesta a oficio No. 2375 de 22 de febrero de 2008

JUAN PABLO CADENA SARMIENTO, portador de la tarjeta profesional No. 57.492 del C.S.J., obrando como apoderado de la sociedad CARGILL, INCORPORATED, según lo acredita el documento de poder presentado ante esa División, me permito dar respuesta a las observaciones de carácter técnico y jurídico, relacionadas con la patentabilidad, para la concesión de la patente de acuerdo con la Decisión 486 según el concepto técnico No. 346 notificado por fijación en lista de fecha 22 de febrero de 2008.

Con el fin de superar las objeciones que por claridad realizó el Señor Examinador, se adjunta un nuevo capítulo reivindicatorio con 1-36 reivindicaciones en el cuál se superan todas las objeciones de claridad formuladas.

Adicionalmente, dada la objeción del Señor Examinador sobre el posible caracter de *No invención* de las reivindicaciones 44-51, éstas han sido eliminadas.

Por otro lado, el Señor Examinador rebate la unidad de invención de la presente solicitud; objeción que, a juicio del solicitante, no es procedente ya que el objeto

2

de la presente solicitud se refiere a la síntesis bioquímica de monatina (i.e. enzimática) a través de intermediarios polipeptídicos, sin circunscribirse necesariamente a la producción celular del compuesto de interés, sin ser, entonces el espacio de producción (i.e. la célula recombinante o no) trascendental para la síntesis reclamada.

Adicionalmente, con las modificaciones realizadas al nuevo capítulo reivindicatorio se clarifica el objeto de la invención y su alcance, por lo que se consideran subsanados todos los requerimientos realizados por el Señor Examinador.

Por lo anterior, respetuosamente solicitamos el retiro de las objeciones a la presente solicitud, con base en las reivindicaciones corregidas anexas, las cuales no adicionan materia nueva, no afectan en ningún sentido el alcance de la invención y, en opinión del solicitante, cumplen con los requisitos de los Artículos 14, 18 y 30 de la Decisión 486.

De la Señora Jefe,

Atentamente,



JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

T.P. No. 57.492 del C.SJ.

C.C. 80.410.337 de Usaquén

Carrera 7 No. 71-21, Torre B, Of. 402

Bogotá, 19 de mayo de 2008

MEV

Anexos

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir monatina que comprende la conversión de glucosa a monatina, caracterizado dicho método porque comprende:
 - i. La conversión de glucosa a triptófano;
 - ii. Poner en contacto el triptófano con un primer polipéptido, donde dicho primer polipéptido es una aminotransferasa, donde dicho primer polipéptido convierte el triptófano a indol-3-piruvato;
 - iii. Poner en contacto el indol-3-piruvato con un segundo polipéptido y una fuente de carbono C3, donde dicho segundo polipéptido es una aldolasa, donde dicho segundo polipéptido convierte indol-3-piruvato y la fuente de carbono C3 a ácido 2-hidroxi-2-(indol-3-ilmetil)-4-cetoglutarico;
 - iv. Poner en contacto el ácido 2-hidroxi-2-(indol-3-ilmetil)-4-cetoglutarico con un tercer polipéptido, donde dicho tercer polipéptido es una aminotransferasa, donde dicho tercer polipéptido convierte el ácido 2-hidroxi-2-(indol-3-ilmetil)-4-cetoglutarico a monatina.
2. Un método para producir monatina que comprende la conversión de triptófano y/o ácido indol-3-láctico a monatina, caracterizado dicho método porque comprende:
 - i. Poner en contacto el triptófano o el ácido indol-3-láctico con un primer polipéptido, donde, al poner en contacto dicho primer polipéptido con el triptófano, dicho primer polipéptido se selecciona de: una aminotransferasa, una deshidrogenasa o una oxidasa, donde al poner en contacto el ácido indol-3-láctico con dicho primer polipéptido, dicho primer polipéptido se selecciona de una oxidasa, una deshidrogenasa o una reductasa, donde dicho primer polipéptido convierte el triptófano o el ácido indol-3-láctico a indol-3-piruvato;
 - ii. Poner en contacto el indol-3-piruvato con un segundo polipéptido y una fuente de carbono C3, donde dicho segundo polipéptido es una aldolasa, donde dicho segundo polipéptido convierte el indol-3-piruvato y la fuente de carbono C3 a ácido 2-hidroxi-2-(indol-3-ilmetil)-4-cetoglutarico;
 - iii. Poner en contacto el ácido 2-hidroxi-2-(indol-3-ilmetil)-4-cetoglutarico con un tercer polipéptido, donde dicho tercer polipéptido es una aminotransferasa o una deshidrogenasa, donde dicho tercer polipéptido convierte el ácido 2-hidroxi-2-(indol-3-ilmetil)-4-cetoglutarico a monatina.
3. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque, al poner en contacto el triptófano con el primer polipéptido, dicho primer polipéptido se selecciona del grupo que consiste de triptófano-aminotransferasa (EC 2.6.1.27), triptófano-deshidrogenasa (EC 1.4.1.19), tirosina(aromática)-aminotransferasa (EC 2.6.1.5), triptófano-fenilpiruvato-transaminasa (EC 2.6.1.28), aminotransferasa de sustratos múltiples (EC 2.6.1.-), aspartato-aminotransferasa (EC 2.6.1.1),

Y

- triptófano-oxidasa, L-aminoácido-oxidasa (EC 1.4.3.2), D-aminoácido deshidrogenasa (EC 1.4.99.1), D-aminoácido-oxidasa (EC 1.4.3.3), D-triptófano-aminotransferasa, D-alanina aminotransferasa (EC 2.6.1.21), glutamato-deshidrogenasa (EC 1.4.1.2-4), fenilalanina-deshidrogenasa (EC 1.4.1.20), y una combinación de los mismos, y donde dicho primer polipéptido convierte el triptófano a indol-3-piruvato.
4. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque al poner en contacto el ácido indol-3-láctico con el primer polipéptido, dicho primer polipéptido se selecciona del grupo que consiste de indol-lactato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.1110), R-4-hidroxifenil-lactato-deshidrogenasa (EC 15 1.1.1.222), 3-(4)-hidroxifenilpiruvato-reductasa (EC 1.1.1.237), lactato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.27, 1.1.1.28, 1.1.2.3), (3-imidazol-5-il) lactato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.111) y lactato oxidasa (EC 1.1.3.-), o una combinación de los mismos, y donde dicho primer polipéptido convierte el ácido indol-3-láctico a indol-3-piruvato.
 5. El método de conformidad con la reivindicación 2 o 3, caracterizado porque el primero y/o tercer polipéptido comprende:
 - i. Una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 32, No. Acceso Genbank: NP_388848.1, No. Acceso Genbank: ZP00005082.1 o No. Acceso Genbank: AAC74014.1;
 - ii. Una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 90% de identidad secuencial con la SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 32, No. Acceso Genbank: NP_388848.1, No. Acceso Genbank: ZP00005082.1, o No. Acceso Genbank: AAC74014.1;
 - iii. Una secuencia de aminoácidos que difiere de la SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 32, No. Acceso Genbank: NP_388848.1, No. Acceso Genbank: ZP00005082.1, o No. Acceso Genbank: AAC74014.1, en menos de 50 sustituciones conservadas de aminoácidos; en donde dicha secuencia de aminoácidos convierte el triptófano a indol-3-piruvato.
 6. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque el segundo polipéptido es una enzima EC 4.1.2.- o EC 4.1.3.-.
 7. El método de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado porque la enzima EC 4.1.3.- es la 4-hidroxi-2-oxoglutarato-glioxilato-liasa (EC 4.1.3.16), la 4-hidroxi-4-metil-2-oxoglutarato-piruvato-liasa (EC 4.1.3.17) o una combinación de las mismas.
 8. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque el tercer polipéptido se selecciona del grupo que consiste de tirosina(aromático)aminotransferasa (EC 2.6.1.5), triptófano-deshidrogenasa (EC 1.4.1.19), triptófano-fenilpiruvato-transaminasa (EC 2.6.1.28), triptófano-aminotransferasa (EC 2.6.1.27), aspartato-aminotransferasa (2.6.1.21), D-alanina-aminotransferasa (EC 2.6.1.21), D-triptófano-aminotransferasa, glutamato-

5

- deshidrogenasa (EC 1.4.1.2-4), fenilalanina-deshidrogenasa (EC 1.4.1.20), aminotransferasa de sustratos múltiples (EC 2.6.1.-), D-aminoácido-deshidrogenasa (EC 1.4.99.1), y una combinación de las mismas.
9. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque el primer polipéptido comprende un aminoácido-oxidasa (EC 1.4.3.-) y una catalasa (EC 1.11.1.6), y donde el primer polipéptido convierte el triptófano a indol-3-piruvato.
 10. El método de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado porque la aminoácido-oxidasa comprende una triptófano-oxidasa.
 11. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque la fuente de carbono C3 se selecciona del grupo que consiste de piruvato, fosfoenolpiruvato, alanina, serina, cisteína o una combinación de los mismos.
 12. El método de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado porque el piruvato es producido por medio de alanina y un polipéptido capaz de realizar la transaminación de la alanina; serina y un polipéptido capaz de realizar la beta-eliminación de la serina; cisteína y un polipéptido capaz de realizar beta-eliminación de la cisteína; aspartato y un polipéptido capaz de realizar reacciones de beta-liasa con un aminoácido dicarboxílico; lactato y lactato-oxidasa (EC 1.1.3.-) o lactato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.27, 1.1.1.28, 1.1.2.3); o una combinación de las mismas.
 13. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque comprende además la reducción de una cantidad de peróxido de hidrógeno producido cuando el triptófano es convertido a indol-3-piruvato, al poner en contacto el peróxido de hidrógeno con una catalasa.
 14. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque el segundo polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de:
 - i. SEQ ID NO: 66, No. Acceso Genbank CAC46344; No. Acceso Genbank CAB14127.1, No. Acceso Genbank AAC74920.1 o No. Acceso Genbank CAC47463.1;
 - ii. Una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 90% de identidad secuencial con la SEQ ID NO: 66, No. Acceso Genbank CAC46344, No. Acceso Genbank CAB14127.1, No. Acceso Genbank AAC74920.1, o No. Acceso Genbank CAC47463.1 ; o
 - iii. Una secuencia de aminoácidos que difiere de la SEQ ID NO: 66, Genbank Acceso No. CAC46344, No. Acceso Genbank CAB14127.1, No. Acceso Genbank AAC74920.1, o No. Acceso Genbank CAC47463.1 en menos de 50 sustituciones conservadas de aminoácidos, en donde la secuencia de aminoácidos convierte el indol-3-piruvato y el piruvato a MP.

6

15. El método de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado porque el tercer polipéptido es una aspartato-aminotransferasa, en donde el ácido 2-hidroxi-2-(indol-3-ilmetil)-4-cetoglutarico se pone en contacto con el aspartato para producir oxaloacetato y monatina.
16. El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque comprende además poner en contacto el oxaloacetato con una descarboxilasa.
17. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque el tercer polipéptido es una lisina-epsilon-aminotransferasa y donde el ácido 2-hidroxi-2-(indol-3-ilmetil)-4-cetoglutarico se pone en contacto con la lisina.
18. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque el tercer polipéptido es una enzima que tiene actividad de aminación reductora y un polipéptido que es capaz de reciclar NAD(P)H.
19. El método de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado porque la enzima que tiene actividad de aminación reductora se selecciona del grupo que consiste de glutamato-deshidrogenasa, fenilalanina-deshidrogenasa, triptófano-deshidrogenasa, o una combinación de las mismas.
20. El método de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado porque el polipéptido capaz de reciclar el NAD(P)H produce además un producto volátil.
21. El método de conformidad con la reivindicación 20, caracterizado porque el polipéptido que es capaz de reciclar NAD(P)H y producir un producto volátil comprende además formato-deshidrogenasa y en donde el producto volátil producido es dióxido de carbono.
22. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque el método comprende la conversión del ácido indol-3-láctico a monatina.
23. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque se producen al menos 10 g/litro de monatina.
24. Un método para producir monatina que comprende la conversión de indol-3-piruvato a monatina, caracterizado dicho método porque comprende:
 - i. Poner en contacto el indol-3-piruvato con un primer polipéptido y una fuente de carbono C3, donde dicho primer polipéptido es una aldolasa, donde dicho primer polipéptido convierte el indol-3-piruvato y la fuente de carbono C3 a ácido 2-hidroxi-2-(indol-3-ilmetil)-4-cetoglutarico; y
 - ii. Poner en contacto el 2-hidroxi-2-(indol-3-ilmetil)-4-cetoglutarico con un segundo polipéptido, donde dicho segundo polipéptido es una aminotransferasa, donde dicho segundo polipéptido convierte el ácido 2-hidroxi-2-(indol-3-ilmetil)-4-cetoglutarico a monatina;

25. Un método para producir monatina que comprende la conversión de triptófano a monatina, caracterizado dicho método porque comprende:

- i. Poner en contacto el triptófano con un primer polipéptido, donde dicho primer polipéptido es una aminotransferasa, donde dicho primer polipéptido convierte el triptófano a indol-3-piruvato;
- ii. Poner en contacto el indol-3-piruvato con un segundo polipéptido y una fuente de carbono C3, donde dicho segundo polipéptido es una aldolasa, donde dicho segundo polipéptido convierte el indol-3-piruvato y la fuente carbono C3 a ácido 2-hidroxi-2-(indol-3-ilmetil)-4-cetoglutarico; y
- iii. Poner en contacto el 2-hidroxi-2-(indol-3-ilmetil)-4-cetoglutarico con un tercer polipéptido, donde dicho tercer polipéptido es una aminotransferasa, donde dicho tercer polipéptido convierte el ácido 2-hidroxi-2-(indol-3-ilmetil)-4-cetoglutarico a monatina.

26. Una célula capaz de producir monatina, caracterizada porque la célula comprende al menos una secuencia exógena de ácido nucleico que codifica para al menos un polipéptido, donde al menos un polipéptido convierte:

- i. triptófano a indol-3-piruvato y se selecciona del grupo que consiste de triptófano aminotransferasa de la clase de enzimas EC 2.6.1.27, triptófano-deshidrogenasa de la clase de enzimas EC 1.4.1.19, tirosina(aromático)-aminotransferasa de la clase de enzimas EC 2.6.1.5, triptófano-fenilpiruvato-transaminasa de la clase de enzimas EC 2.6.1.28, aspartato- aminotransferasa de la clase de enzimas EC 2.6.1.1, triptófano-oxidasa, L-aminoácido-oxidasa de la clase de enzimas EC 1.4.3.2, D-aminoácido-deshidrogenasa de la clase de enzimas EC 1.4.99.1, D-aminoácido-oxidasa de la clase de enzimas EC 1.4.3.3, D-triptófano aminotransferasa, D-alanina-aminotransferasa de la clase de enzimas EC 2.6.1.21, glutamato-deshidrogenasa de la clase de enzimas EC 1.4.1.2, EC 1.4.1.3 y EC 1.4.1.4, fenilalanina-deshidrogenasa de la clase de enzimas EC 1.4.1.20;
- ii. indol-3-piruvato a ácido 2-hidroxi-2-(indol-3-ilmetil)-4-cetoglutarico y se selecciona del grupo que consiste de una enzima aldolasa del grupo de enzimas EC 4.1.3.16 o EC 4.1.3.17; o
- iii. ácido 2-hidroxi-2-(indol-3-ilmetil)-4-cetoglutarico a monatina y se selecciona del grupo que consiste de tirosina(aromático)-aminotransferasa de la clase de enzimas EC 2.6.1.5, triptófano deshidrogenasa de la clase de enzimas EC 1.4.1.19, triptófano-fenilpiruvato-transaminasa de la clase de enzimas EC 2.6.1.28, triptófano- aminotransferasa de la clase de enzimas EC 2.6.1.27, aspartato- aminotransferasa de la clase de enzimas EC 2.6.1.1, D-alanina-aminotransferasa de la clase de enzimas EC 2.6.1.21, D-triptófano- aminotransferasa, glutamato-deshidrogenasa de la clase de enzimas EC 1.4.1.2, EC 1.4.1.3 o EC 1.4.1.4, fenil-alanina deshidrogenasa de la clase de enzimas EC 1.4.1.20 y D-aminoácido deshidrogenasa de la clase de enzimas EC 1.4.99.1.

27. La célula de conformidad con la reivindicación 26, caracterizada porque al menos un polipéptido se selecciona del grupo que consiste de triptófano-aminotransferasa (EC 2.6.1.27), triptófano-deshidrogenasa (EC 1.4.1.19), tirosina (aromático)-aminotransferasa (EC 2.6.1.5), triptófano-fenilpiruvato-transaminasa (EC 2.6.1.28), aminotransferasa de sustratos múltiples (EC 2.6.1.-), triptófano-oxidasa, L-aminoácido-oxidasa (EC 1.4.3.2), aspartato-aminotransferasa (EC 2.6.1.1), D-aminoácido-deshidrogenasa (EC 1.4.99.1), D-aminoácido-oxidasa (EC 1.4.3.3), D-alanina-aminotransferasa (EC 2.6.1.21), D-triptófano-aminotransferasa, indol-lactato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.110), R-4-hidroxifenil-lactato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.222), 3-(4)-hidroxifenilpiruvato-reductasa (EC 1.1.1.237), lactato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.27, 1.1.1.28, 1.1.2.3), (3-imidazol-5-il)-lactato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.111), lactato-oxidasa (EC 1.1.3.-), sintasa/liasa (4.1.2. -), sintasa/liasa (4.1.3. -), fenilalanina-deshidrogenasa (EC 1.4.1.20), glutamato-deshidrogenasa (EC 1.4.1.2, 1.4.1.3, 1.4.1.4), y una combinación de las mismas.
28. La célula de conformidad con la reivindicación 27, caracterizada porque al menos un polipéptido se selecciona del grupo que consiste de triptófano-aminotransferasa (EC 2.6.1.27), triptófano-deshidrogenasa (EC 1.4.1.19), tirosina (aromática) -aminotransferasa (EC 2.6.1.5), triptófano-fenilpiruvato-transaminasa (EC 2.6.1.28), aminotransferasa de sustratos múltiples (EC 2.6.1.-), aspartato-aminotransferasa (EC 2.6.1.1), triptófano-oxidasa, L-aminoácido-oxidasa (EC 1.4.3.2) D-aminoácido-deshidrogenasa (EC 1.4.99.1), D-aminoácido-oxidasa (EC 1.4.3.3), D-alanina-aminotransferasa (EC 2.6.1.21), D-triptófano-aminotransferasa, sintasa/liasa (EC 4.1.3.-), sintasa/liasa (4.1.2.-), fenilalanina-deshidrogenasa (EC 1.4.1.20), glutamato-deshidrogenasa (EC 1.4.1.2, 1.4.1.3, 1.4.1.4) y una combinación de las mismas.
29. La célula de conformidad con la reivindicación 27, caracterizada porque al menos un polipéptido comprende una actividad seleccionada del grupo que consiste de indol-lactato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.110), R-4-hidroxifenil-lactato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.222), 3 - (4) -hidroxi fenilpiruvato-reductasa (EC 1.1.1.237), lactato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.27, 1.1.1.28, 1.1.2.3), (3-imidazol-5-il) -lactato-deshidrogenasa (EC 1.1.1.111), lactato-oxidasa (EC 1.1.3.-), sintasa/liasa (4.1.2.-), sintasa/liasa (4.1.3.-), triptófano-deshidrogenasa (EC 1.4.1.19), triptófano-fenilpiruvato-transaminasa (EC 2.6.1.28), triptófano-aminotransferasa (EC 2.6.1.27), tirosina (aromática) -aminotransferasa (EC 2.6.1.5), aminotransferasa de sustrato múltiples (EC 2.6.1.-), aspartato-aminotransferasa (EC 2.6.1.1), glutamato-deshidrogenasa (EC 1.4.1.2, 1.4.1.3, 1.4.1.4), fenilalanina-deshidrogenasa (EC 1.4.1.20), D-triptófano-aminotransferasa, D-aminoácido-deshidrogenasa (EC 1.4.99.1), D-alanina-aminotransferasa (EC 2.6.1.21) y una combinación de las mismas.
30. La célula de conformidad con la reivindicación 27, caracterizada porque la sintasa/liasa (EC 4.1.3. -) comprende 4-hidroxi-2-oxoglutarato-aldolasa (EC 4.1.3.16) o 4-hidroxi-4-metil-2-oxoglutarato-aldolasa (EC 4.1.3.17).

9

31. La célula de conformidad con la reivindicación 26, caracterizada porque la célula es una célula bacteriana.
32. La célula de conformidad con la reivindicación 26, caracterizada porque la célula es una célula de levadura.
33. La célula de conformidad con la reivindicación 27, caracterizada porque la célula comprende además uno o más polipéptidos adicionales que son codificados por al menos una secuencia exógena de ácido nucleico adicional, en donde los polipéptidos adicionales comprenden actividades seleccionadas del grupo que consiste de: catalasa, oxaloacetato-descarboxilasa, lisina-epsilon-aminotransferasa, y formato-deshidrogenasa.
34. Un método para elaborar monatina que comprende la conversión de triptófano o ácido indol-3-láctico a indol-3-piruvato, con un primer polipéptido, caracterizado porque:
- Cuando el triptófano se pone en contacto con el primer polipéptido, dicho primer polipéptido se selecciona del grupo que consiste de: triptófano-aminotransferasa de la clase de enzimas EC 2.6.1.27, triptófano-deshidrogenasa de la clase de enzimas EC 1.4.1.19, tirosina (aromática) - aminotransferasa de la clase de enzimas EC 2.6.1.5, triptófano-fenilpiruvato-transaminasa de la clase de enzimas EC 2.6.1.28, aspartato-aminotransferasa de la clase de enzimas EC 2.6.1.1, triptófano-oxidasa, L-aminoácido-oxidasa de la clase de enzimas EC 1.4.3.2, D-aminoácido deshidrogenasa de la clase de enzimas EC 1.4.99.1, D-aminoácido oxidasa de la clase de enzimas EC 1.4.3.3, D-triptófano aminotransferasa, D-alanina aminotransferasa de la clase de enzimas EC 2.6.1.21, glutamato deshidrogenasa de la clase de enzimas EC 1.4.1.2, EC 1.4.1.3 o EC 1.4.1.4, fenilalanina deshidrogenasa de la clase de enzimas EC 1.4.1.20 o una combinación de las mismas; y
 - Cuando el ácido indol-3-láctico se pone en contacto con el primer polipéptido, dicho primer polipéptido se selecciona del grupo que consiste de indol-lactato-deshidrogenasa de la clase de enzimas EC 1.1.1.110, R-4-hidroxifenil-lactato-deshidrogenasa de la clase de enzimas EC 1.1.1.222, 3-(4)-hidroxifenilpiruvato-reductasa de la clase de enzimas EC 1.1.1.237, lactato-deshidrogenasa de la clase de enzimas EC 1.1.1.27, EC 1.1.1.28 o EC 1.1.2.3, y (3-imidazol-5-il)-lactato-deshidrogenasa de la clase de enzimas EC 1.1.1.111 o una combinación de las mismas;
 - Convertir el indol-3-piruvato a ácido 2-hidroxi-2-(indol-3ilmetil)-4-cetoglutarico por medio de una reacción química; y,
 - Convertir el ácido 2-hidroxi-2-(indol-3ilmetil)-4-cetoglutarico a monatina con un segundo polipéptido seleccionado del grupo que consiste de tirosina (aromática) - aminotransferasa de la clase de enzimas EC 2.6.1.5, triptófano-deshidrogenasa de la clase de enzimas EC 1.4.1.19, triptófano-fenilpiruvato-transaminasa de la

Indole RY2+3

clase de enzimas EC 2.6.1.28, triptófano-aminotransferasa de la clase de enzimas EC 2.6.1.27, aspartato-aminotransferasa de la clase de enzimas EC 2.6.1.1, D-alanina aminotransferasa de la clase de enzimas EC 2.6.1.21, D-triptófano aminotransferasa, glutamato-deshidrogenasa de la clase de enzimas EC 1.4.1.2, EC 1.4.1.3, o EC 1.4.1.4, fenil-alanina deshidrogenasa de la clase de enzimas EC 1.4.1.20, D-aminoacido deshidrogenasa de la clase de enzimas EC 1.4.99.1, o una combinación de las mismas.

35. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque el método comprende además la detección del ácido 2-hidroxi-2-(indol-3-ilmetil)-4-cetoglutarico por espectrometría de masa.
36. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque el triptófano es producido a partir de indol utilizando un polipéptido de EC 4.1.99.1.

Cloning, Nucleotide Sequence, Overexpression, and Inactivation of the *Escherichia coli* 2-Keto-4-Hydroxyglutarate Aldolase Gene

RAJKUMAR V. PATIL AND EUGENE E. DEKKER*

Department of Biological Chemistry, The University of Michigan, Ann Arbor, Michigan 48109-0606

Received 29 July 1991/Accepted 1 November 1991

Having previously determined the complete amino acid sequence of 2-keto-4-hydroxyglutarate aldolase from *Escherichia coli* (C. J. Vlahos and E. E. Dekker, J. Biol. Chem. 263:11683-11691, 1988), we amplified the gene that codes for this enzyme by the polymerase chain reaction using synthetic degenerate deoxyoligonucleotide primers. The amplified DNA was sequenced by subcloning the polymerase chain reaction products into bacteriophage M13; the nucleotide sequence of the gene was found to be in exact agreement with the amino acid sequence of the gene product. Overexpression of the gene was accomplished by cloning it into the pKK223.3 expression vector so that it was under control of the *lac* promoter and then using the resultant plasmid, pDP6, to transform *E. coli* DH5 α F'IQ. When this strain was grown in the presence of isopropyl β -D-thiogalactopyranoside, aldolase specific activity in crude extracts was 80-fold higher than that in wild-type cells and the enzyme constituted approximately 30% of the total cellular protein. All properties of the purified, cloned gene product, including cross-reactivity with antibodies elicited against the wild-type enzyme, were identical with the aldolase previously isolated and characterized. A strain of *E. coli* in which this gene is inactivated was prepared for the first time by insertion of the kanamycin resistance gene cartridge into the aldolase chromosomal gene.

2-Keto-4-hydroxyglutarate (KHG) aldolase (4-hydroxy-2-oxoglutarate glyoxylate-lyase [EC 4.1.3.16; 4-hydroxy-2-oxoglutarate $\rightleftharpoons$ pyruvate + glyoxylate]) of *Escherichia coli* is a novel trimeric enzyme (30). Past enzymological and radiotracer studies (7) led to the suggestion that KHG aldolase participates in regulation of the intracellular level of glyoxylate in *E. coli* (and possibly other prokaryotic) cells; in mammals, it is well established that it catalyzes a central reaction in hydroxyproline catabolism (19). This enzyme has been obtained in homogeneous form from extracts of *E. coli* (5), as well as bovine liver (3) and kidney (12). KHG aldolases from *E. coli* and bovine liver and kidney differ in size (M_r s, 66,000, 120,000, and 140,000, respectively), and whereas the liver and kidney enzymes are homotetramers, that from *E. coli* has a trimeric subunit structure. Another difference is that the liver and kidney enzymes are virtually nonstereospecific in cleaving or forming both optical isomers of KHG (13); the *E. coli* enzyme, in contrast, is stereoselective for L-KHG. Mechanistically, KHG aldolase from all sources so far examined is a class I or "lysine-type" aldolase, catalyzing the reaction via a mechanism involving Schiff base formation between KHG or pyruvate and the ϵ -amino group of an active-site lysine residue (14, 20). Most interestingly, and regardless of the source, KHG aldolase is bifunctional, efficiently catalyzing β -decarboxylation of oxalacetate as well as aldol cleavage or formation of KHG. The β -decarboxylase/aldolase activity ratios, however, are 0.2, 0.5, and 1.0, respectively, for the kidney, liver, and *E. coli* enzymes. The availability, therefore, of pure KHG aldolase preparations from a prokaryotic source and eukaryotic sources that are similar in some molecular and/or catalytic properties but significantly different in others provides an attractive system for studying enzyme structure-function interrelationships.

First in-depth studies are being carried out with KHG

aldolase from *E. coli*. In previous work, we succeeded in determining the complete amino acid sequence of the protein (27); it consists of 213 amino acids with subunit and trimer molecular masses of 22 and 66 kDa, respectively. Selective chemical modification-inactivation studies, followed by peptide isolation and sequencing endeavors, enabled us to determine that glutamate residue 45 (28), arginine residue 49 (27, 29), and lysine residue 133 (27) are each required for catalytic activity. Such efforts await confirmation and, possibly, new insights by application of molecular biological techniques. This report describes our success in cloning the *hga* (KHG aldolase) gene that codes for the primary structure of the enzyme and is the first to describe the nucleotide sequence of this gene from any source. In addition, the gene was overexpressed in *E. coli*, allowing for large quantities of the enzyme to be formed, and the cloned fragment, which included a selectable marker, was used to inactivate the gene on the *E. coli* chromosome by double recombination.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, phages, plasmids, and other materials. *E. coli* DH5 α F' [F' ϕ 80d *lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17* ($r_K^- m_K^+$) *supE44* λ^- *thi-1* *gyrA relA1*], used for transfection with bacteriophage M13, and *E. coli* DH5 α F'IQ [ϕ 80d *lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17* ($r_K^- m_K^+$) *supE44* λ^- *thi-1* *gyrA relA1*/F' *proAB*⁺ *lacI*⁺ Δ M15 *zcf::Tn5* (Km^r)], used for transformation, were obtained from Bethesda Research Laboratories. *E. coli* JC7623 [F' *thr-1* *ara-14* *leuB6* Δ (*gpt-proA*)62 *lacY1 sbcC201 tsx-33 supE44 galK2* λ^- *rac sbcB15 hisG4 rfbD1 recB21 recC22 rpsL31 kdgK51 xyl-5 mtl-1 argE3 thi-1*], obtained from the *E. coli* Genetic Stock Center, Yale University, New Haven, Conn., was used for transformation of linear DNA fragments. Phages M13mp18 and M13mp19 were used for sequencing, plasmid pKK223.3 was the expression vector for the cloned aldolase gene, and plasmid pUC4K was the source for the kanamycin resistance gene

* Corresponding author.

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

Abogado
Juan Pablo Cadena Sarmiento

ASUNTO	Radicación	04-117741
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	430
	Oficio	05
	Folios	2677

Patente de Invención	☒	Patente de Modelo de Utilidad	☐
Vía Nacional	☐		
Vía PCT (fase nacional)	☒	Cap. I	☐
		Cap. II	☒
No. Sol. Internacional		PCT/US03/12588	
Fecha de Presentación Internal.		23/04/2003	

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

1. Documentos estudiados

<u>Descripción:</u>	Folios: 120 a 279 como se radicó inicialmente.
<u>Reivindicaciones:</u>	Folios: 280 a 294 como se radicó inicialmente. Folios: 476 a 486 modificadas
<u>Figuras:</u>	Folios: 74 a 118 como se radicó inicialmente.
<u>Prioridad:</u>	23/04/2002, Estados Unidos, US60/374,831.

2. Objeto de la invención

Título de la solicitud: "Polipéptidos y rutas biosintéticas"

El objeto de la presente solicitud de patente de invención consiste en métodos y composiciones utilizadas para producir monatina a partir de glucosa, triptófano, ácido indol-3-láctico, indol-3-piruvato y ácido 2-hidroxi-2-(indol-3-metil)-4-cetoglutarico.

El problema planteado en esta solicitud es la potencialidad de utilidades de la monatina y sus intermediarios en aplicaciones alimenticias, agrícolas y farmacéuticas, entre otras y la consecuente necesidad de métodos de producción de los mismos.

Para solucionar este problema técnico la solicitud en estudio proporciona varias rutas de síntesis para la producción de monatina a partir de glucosa, triptófano, ácido indol-3-láctico y/o a partir de precursores de monatina como indol-3-piruvato y ácido 2-hidroxi-2-(indol-3-metil)-4-cetoglutarico.

IPC: C07D 209/18; C12P 17/10.

3. De la solicitud de Patente (según el caso)

3.1. Reivindicaciones (artículo 30 D 486)

El capítulo reivindicatorio en general carece de concisión y claridad por cuánto:

- 1) La definición del método de obtención de monatina se hace a partir de múltiples posibilidades de enzimas o polipéptidos, lo cual no permite definir la ruta sintética que se esta divulgando (cláusulas 1-36);
- 2) A pesar de que la reivindicación 1, se refiere también a un método de síntesis orgánica para la producción de monatina, no es claro como este método se relaciona con las reivindicaciones del resto de la solicitud, especialmente con la reivindicación 2, la cual se refiere a un método para síntesis de monatina a partir de triptófano y/o ácido indol-3-láctico, mientras que la reivindicación 1 se refiere a una ruta de síntesis a partir de glucosa que se convierte en triptófano, pero no se relaciona con el ácido indol-3-láctico.
- 3) La reivindicación 35 que se refiere a un método que permite la detección del ácido 2-hidroxi-2-(indol-3-ilmetil)-4-cetoglutarico por espectrometría de masa, carece de relación con la reivindicación 2, de la cual es dependiente y que se refiere a un método de síntesis orgánica para producir monatina.

De esta manera, el capítulo reivindicatorio presentado no cumple con los requisitos establecidos en el art. 30 de la Decisión 486.

4. Unidad de invención (artículo 25 D 486)

Del análisis del capítulo reivindicatorio se concluye que existe más de un grupo de invención dentro de la solicitud en estudio:

- i) método de síntesis orgánica para la obtención de monatina a partir de glucosa (clausula 1)
- ii) método de síntesis orgánica para la obtención de monatina a partir de triptófano y/o ácido indol-3-láctico (cláusulas 2-25, 34,36);
- iii) método de síntesis bioquímica para la obtención de monatina a partir de una célula recombinante, procedimientos y productos relacionados (cláusula 26-33);

Por lo anterior, debe seleccionarse un único grupo de invención que cuente con sustento descriptivo suficiente y que pueda reclamarse como una secuencia lógica de pasos según sus condiciones de realización.

De acuerdo con lo anterior, el capítulo reivindicatorio en general no cumple con el requisito de unidad de invención establecido en el art. 25 de la Decisión 486.

5. Análisis de patentabilidad (artículo 14 D486)

Para realizar el análisis de patentabilidad se tomó en cuenta únicamente el grupo inventivo que carece de novedad, es decir el tercer grupo (reivindicaciones 26-33), que trata sobre células recombinantes que producen monatina.

La fecha que se ha tenido en cuenta para determinar el Estado de la Técnica es:

Fecha de presentación de la solicitud prioritaria: 23/04/2002.

Teniendo en cuenta la fecha indicada se realizó la búsqueda en el estado de la técnica de documentos relacionados con la solicitud encontrándose los siguientes documentos más relevantes:

Nº	Documento	Título	Fecha de publicación
D1	Patil, <i>et.al.</i> , Journal of Bacteriology, vol 174 (Nº1):102-107.	"Cloning, nucleotide sequence, overexpression, and inactivation of the <i>Escherichia coli</i> 2-keto-4-hydroxyglutarate aldolase gene"	Ene, 1992

5.1. Novedad (artículo 16 D486)

Las reivindicaciones 26 a 33 se refieren a una célula capaz de producir monatina, donde la célula comprende al menos una secuencia exógena de ácido nucleico que codifica para al menos un polipéptido.

El documento de Patil y Dekker, 1992 (D1) divulga el gen de la aldolasa (2-ceto-hidroxioglutarato-aldolasa) que posee la bacteria *Escherichia coli*, esta bacteria es capaz de producir monatina. En este documento se detalla la secuencia, clonación y actividad del gen aldolasa en la producción del compuesto monatina.

Por otra parte, otros documentos como Galkin, *et.al.*, 1997 y Deluna, *et.al.*, 2001, divulgan el gen formato deshidrogenasa de *Escherichia coli* y glutamato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*, que son microorganismos que también pueden producir monatina.

En consecuencia se deduce, que en el estado del arte ya eran conocidas células, específicamente bacterias o levaduras, capaces de producir monatina. Al ser el objeto de la solicitud igual al de la anterioridad, no se pueden considerar estas reivindicaciones novedosas. De esta manera y de acuerdo con lo anterior la célula reclamada no puede considerarse como nueva y por lo tanto no cumple con el requisito de novedad establecido en el artículo 16 de la Decisión 486.

6. Conclusión:

Los requisitos de patentabilidad de la presente solicitud se encuentran afectados así:

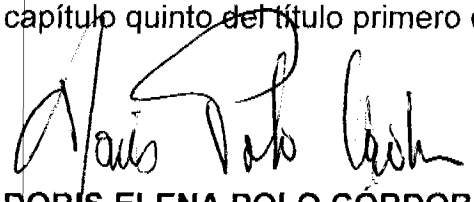
Nº	Documento Nº	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D1	Patil, <i>et.al.</i> , 1992	26-33	Novedad

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de 60 días contados a partir de la fecha de notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento, o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

488

488

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



DORIS ELENA POLO CORDOBA
Jefe de División de Nuevas Creaciones (E)

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

6 MAR 2009

CONCEPTO TÉCNICO No. 456	EXAMINADOR TÉCNICO Código No.202052
------------------------------------	---

7452

