



No. 14-082149- -00007-0000

Fecha: 2016-03-07 16:23:12 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 34

As. 127.542

Señor

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

E.

S.

D.

REF: Expediente No. 14 082.149- solicitud de patente de invención a favor de **GENOMATICA, INC.** Título: **MICROORGANISMOS Y MÉTODOS PARA PRODUCIR ALQUENOS.**

RESPUESTA A EXAMEN DE FONDO

JUAN PABLO CADENA SARMIENTO, portador de la tarjeta profesional No. 57.492 del C.S.J., obrando como apoderado de la sociedad solicitante me permito dar respuesta al Oficio No. 12771 relacionado con la patentabilidad de la presente invención y notificado por fijación en lista el 3 de Noviembre de 2015.

De manera atenta nos permitimos remitir a su Despacho un nuevo pliego reivindicatorio que consta de nueve (9) reivindicaciones, las cuales se mantienen plenamente soportadas por las enseñanzas del capítulo descriptivo y no exceden de ningún modo el alcance de la invención previamente reclamada.

En relación con dicho nuevo pliego reivindicatorio, solicitamos sean tenidas en cuenta las siguientes modificaciones llevadas a cabo con el fin de solucionar los problemas de claridad objetados por el señor Examinador y además, delimitar de mejor manera el alcance de esta divulgación:

- La nueva reivindicación 1 excluye la referencia a alcoholes de Fórmula (I) y alquenos de Fórmula (II) y en su lugar, incorpora la materia previamente indicada en las antiguas reivindicaciones 6 y 8. De este modo, el alcance de la

invención ha sido limitado a un organismo microbiano de origen no natural que comprende rutas metabólicas relacionadas con un **grupo concreto de alcoholes y alquenos**.

- Adicionalmente, dicha reivindicación 1 incluye ahora la expresión "*comprende al menos un ácido nucleico exógeno que es heterólogo y que se deriva de una especie diferente a dicho organismo microbiano*", haciendo énfasis en que dicho ácido nucleico exógeno **proviene de una especie distinta a la especie de referencia** y evidenciando de este modo la modificación que necesariamente da origen a la presente invención. Dicha expresión fue incluida también en la nueva reivindicación 6.
- Asimismo, las enzimas mencionadas a lo largo de la nueva reivindicación 1 se acompañan de sus respectivos números EC (*Enzyme Commission Numbers*) de acuerdo con dicho sistema de clasificación, lo cual brinda mayor claridad respecto a las enzimas involucradas con las rutas metabólicas que ejecuta la presente invención.
- La nueva reivindicación 7 incluye la frase "*un medio de cultivo anaeróbico que comprende menos de 10% de saturación de oxígeno disuelto*" indicando abiertamente el **contenido máximo de oxígeno** presente en dicho medio de cultivo. Cabe resaltar que acatando la sugerencia del señor Examinador, la expresión "*sustancialmente*" fue eliminada de esta reivindicación.
- En concordancia con el alcance de la nueva reivindicación 1, el método de la nueva reivindicación 8 fue modificado describiendo la producción de un **grupo puntual de alquenos**.
- De igual manera, dicha nueva reivindicación 8 incluye ahora la expresión "*y separar dicho alqueno de dicho microorganismo de origen no natural*" indicando una **etapa técnica adicional** del método reivindicado y aportando de este modo claridad al mismo.
- En conexión con lo anterior, se incluyó una nueva reivindicación 9 dirigida a una modalidad concreta del método reivindicado en donde la etapa de separación se lleva a cabo mediante destilación.

- Las reivindicaciones 8 y 10 fueron eliminadas en su totalidad.
- La expresión "*trayectoria*" fue debidamente reemplazada por el término "*ruta metabólica*", el cual soluciona el error de traducción objetado y en todo caso resulta más adecuado según el contexto técnico de la presente invención.

Teniendo en cuenta que cada una de las modificaciones aquí expuestas se encuentra debidamente soportada por los contenidos del capítulo descriptivo de la presente solicitud, solicitamos al señor Examinador reconocer la validez de esta nueva divulgación y proceder a estudiar su patentabilidad.

En complemento de lo dicho, es preciso resaltar que las objeciones que cuestionan la pertinencia y validez de la reivindicación 9 (nueva reivindicación 8) por hacer referencia a posibles usos y/o materia exceptuada de patentabilidad se encuentran ahora resueltas gracias a las modificaciones comentadas previamente.

Más en detalle, reiteramos que dicha nueva reivindicación 8 se encuentra dirigida a un método para la producción de alquenos que involucra microorganismos no-naturales y que por tanto, **no corresponde al proceso de expresión de rutas biosintéticas naturales** como asume el señor Examinador.

En otras palabras, afirmamos que las rutas biosintéticas llevadas a cabo por los microorganismos reivindicados son consecuencia de la **modificación genética** de los mismos y que contrario a la apreciación del señor Examinador, estas no hacen parte de los mecanismos sintéticos o de la expresión génica natural de tales microorganismos.

Debido a esto, es evidente que el método reivindicado no corresponde a un "proceso esencialmente biológico" sino a una **estrategia biotecnológica** fundamentada en (i) la modificación genética de un organismo microbiano y (ii) su aprovechamiento para la obtención de productos determinados que no podrían ser alcanzados mediante las rutas biosintéticas naturales del mismo.

Dicho esto, solicitamos sea reconocido que la expresión de las rutas reivindicadas depende única y exclusivamente de la **modificación genética** a la que son sometidos los organismos microbianos aquí descritos, y que por tanto, los métodos aquí reivindicados no se relacionan en absoluto con los mecanismos biosintéticos naturales de dichos microorganismos.

Ahora bien, llamamos la atención sobre el hecho de que dicha nueva reivindicación 8 incluye la etapa de **separar el alqueno obtenido de dicho microorganismo de origen no natural**, esto con la única intención de evitar que el método reivindicado siga siendo visto como un supuesto uso argumentando la mención de una única etapa.

Así pues, asumimos demostrado que los métodos relacionados con la presente invención no hacen referencia a materia tal cual se encuentra en la naturaleza y mucho menos a usos o posibles usos de la misma, razón por la que solicitamos sean retiradas las respectivas objeciones.

De la mano con esta argumentación, es importante aclarar también que la reivindicación 1 no enuncia en ningún momento "la capacidad de dicho microorganismo de producir una molécula, en este caso un alqueno por medio de la expresión de vías enzimáticas existentes en microorganismos de forma nativa", sino que como bien se comentó anteriormente, hace referencia a un **microorganismo genéticamente modificado que expresa rutas biosintéticas ajenas a su naturaleza**, las cuales provienen específicamente de la inclusión de genes exógenos, heterólogos y que se derivan de una especie diferente a dicho organismo microbiano.

En nuestro concepto, la materia reivindicada hace completamente evidente que la invención no corresponde a material existente en la naturaleza sino que es el resultado de la **inserción de material genético específico** con el fin de ocasionar o promover la ejecución de vías metabólicas que no serían llevadas a cabo bajo ninguna circunstancia por un organismo natural, razón por la que consideramos que no hay ningún motivo que permita cuestionar su claridad.

Más allá de lo anterior, y tomando en consideración el comentario del señor Examinador según el cual "la simple mención a de un ácido nucleico exógeno no es suficiente para garantizar la modificación genética de un microorganismo", es de notar que la nueva reivindicación 1 incluye los **números EC** correspondientes a cada una de las enzimas reivindicadas, permitiendo que cualquier versado en la materia pueda ejecutar la presente invención sin inconveniente alguno gracias a sus conocimientos en el campo técnico, la información ya consolidada en el mismo y las enseñanzas de la presente descripción.

Como muestra de esto, presentamos a continuación un fragmento del capítulo descriptivo en donde se evidencia la necesidad de llevar a cabo **modificaciones genéticas** a la materia reivindicada, y los microorganismos a partir de los cuales se pueden obtener los genes codificantes para las enzimas descritas a lo largo de la reivindicación 1:

"Las fuentes de ácidos nucleicos codificantes para una enzima o proteína de la trayectoria de alqueno pueden incluir, por ejemplo, cualquier especie donde el producto génico codificado es capaz de catalizar la reacción referenciada. Tales especies incluyen organismos tanto procariotas como eucariotas incluyendo, pero no limitado a, bacterias, incluyendo arqueas y eubacterias, y eucariotas, incluyendo levaduras, plantas, insectos, animales, y mamífero, incluyendo el ser humano. Las especies ejemplares para tales fuentes incluyen, por ejemplo, Escherichia coli, Abies grandis, Acetobacter pasteurians, Acinetobacter sp. cepa M-1, Arabidopsis thaliana, Arabidopsis thaliana col, Aspergillus terreus NIH2624, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus cereus, Bos Taurus, Bradyrhizobium japonicum USDA110, Burkholderia phymatum, Burkholderia xenovorans, Clostridium acetobutylicum, Clostridium beijerinckii, Clostridium beijerinckii NRRL B593, Clostridium botulinum, Clostridium kluyveri DSM 555, Clostridium saccharoperbutylacetonicum, Comamonas sp. CNB-1, Cucumis sativus, Cupriavidus taiwanensis, Enterococcus faecalis, Escherichia coli C, Escherichia coli K12, Escherichia coli W, Geobacillus thermoglucosidasius, Homo sapiens, Klebsiella pneumonia, Kluyveromyces lactis, Lactococcus lactis, Malus x domestica, Mesorhizobium loti, Metanocaldococcus jannaschii, Metanosarcina mazei, Mycobacterium tuberculosis, Mycoplasma pneumoniae M129, Neurospora crassa, Oryctolagus cuniculus, Picea abies, Populus alba, Populus tremula x Populus alba, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas putida, Pseudomonas sp. CF600, Pueraria Montana, Pyrococcus furiosus, Ralstonia eutropha, Ralstonia eutropha H16, Ralstonia metallidurans, Rattus norvegicus, Rhodococcus ruber, Saccharomyces cerevisiae, Salmonella enteric, Solanum lycopersicum, Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumonia, Streptomyces sp. ACT-1,

Thermoanaerobacter brockii HTD4, *Thermotoga maritime* MSB8, *Thermus thermophilus*, *Zea mays*, *Zoogloea ramigera*, *Zymomonas mobilis*, así como también otras especies ejemplares descritas en la presente o disponibles como organismos fuente para los genes correspondientes. Sin embargo, con la secuencia completa del genoma disponible para ahora más de 550 especies (con más de la mitad de estas disponibles en las bases de datos públicas, tal como el NCBI), incluyendo 395 genomas de microorganismos y una variedad de levaduras, hongos, plantas, y genomas de mamíferos, la identificación de genes que codifican la actividad biosintética de alqueno requerida para uno o más genes en especies relacionadas o distantes (...) es de rutina y bien conocido en la técnica. En consecuencia, las alteraciones metabólicas que permiten la biosíntesis de alqueno descrita en la presente con referencia a un organismo particular, tal como E. coli, se pueden aplicar fácilmente a otros microorganismos, incluyendo los organismos procariotas y eucariotas por igual. Dadas las enseñanzas y orientaciones proporcionadas en la presente, los expertos en la técnica sabrán que una alteración metabólica ejemplificada en un organismo se puede aplicar igualmente a otros organismos.

Adaptado del capítulo descriptivo de la presente solicitud

Adicionalmente, solicitamos al señor Examinador remitir su atención a la Tabla anexa al presente memorial (Anexo 1), la cual relaciona un amplio número de enzimas con sus respectivos **números EC** tal y como refiere ahora la reivindicación 1, razón por la que concluimos que la materia allí reivindicada describe de manera suficiente y clara el objeto y alcance de la presente invención.

En este sentido, afirmamos que como bien reconocerá cualquier persona normalmente versada en la materia, la denominación de enzimas a través de sus **números EC** corresponde a un sistema de clasificación basado en la función de las enzimas completamente establecido y manejado en el campo técnico, hecho soportado por las enseñanzas del Anexo 2 (Boyce S. y Tipton K.F., *Encycl. Life Sci.* 2001, pp. 1-10) adjunto a este memorial, y que como tal, hace innecesaria la mención específica de estructuras o secuencias concretas al tratarse de nomenclatura estándar y universal en este contexto.

De igual manera, vale la pena destacar que el material genético y las secuencias específicas que codifican para las enzimas involucradas en las rutas metabólicas reivindicadas hacen actualmente parte de bases de datos generales y de libre acceso que pueden ser fácilmente consultadas por cualquier persona normalmente versada

en la materia al momento de reproducir o ejecutar la presente invención, razón por la que resulta completamente innecesario especificar cualquier tipo de información genética o secuencias concretas a lo largo de las actuales reivindicaciones.

De acuerdo con ello, concluimos que no hay razón por la que la caracterización expuesta a lo largo de este nuevo pliego reivindicatorio deba caracterizar las enzimas reivindicadas en función de su estructura particular pues (i) esto representa información ya conocida en el campo técnico, y (ii) el concepto técnico inventivo de la presente invención no gira en torno al desarrollo de secuencias codificantes o enzimas novedosas, sino al diseño de un microorganismo modificado que ejecuta una ruta biosintética particular y gracias a esto, puede ser empleado para obtener productos de interés.

Así las cosas, solicitamos de manera respetuosa sea reconocido que tanto la nueva reivindicación 1, como sus respectivas dependientes, constituyen una divulgación clara, concisa y suficiente del objeto de la presente invención, y que consecuentemente sean retiradas todas las objeciones que cuestionan su pertinencia y validez.

En cuanto a la reivindicación 6, objetada por incluir la expresión "*ácido nucleico heterólogo*", consideramos oportuno mencionar que además de resultar completamente comprensible a ojos de cualquier persona normalmente versada en la materia, esta expresión como parte de la frase "ácidos nucleicos heterólogos derivados de una especie diferente a dicho organismo microbiano" evidencia la naturaleza **genéticamente modificada** de los microorganismos modificados, gracias a lo cual estos están provistos de las características técnicas necesarias para solucionar el problema técnico que enfrenta la presente invención.

Similar es el caso de las expresiones "*al menos*" y "*cantidad suficiente*", las cuales además de ser claras, cobran total sentido en el contexto en que se reivindican, tal y como demuestran los siguientes dos ejemplos:

- La frase *"el organismo microbiano tiene una ruta metabólica de alqueno y comprende al menos un ácido nucleico exógeno que es heterólogo y que se deriva de una especie diferente a dicho organismo microbiano"* indica que el organismo microbiano reivindicado cuenta con **mínimo un ácido nucleico exógeno** proveniente de un organismo diferente a ese, ratificando de esta manera toda la argumentación ya expuesta respecto al carácter no-natural de la presente invención.
- La expresión *"cantidad suficiente"* incluida en la frase *"en donde dicho ácido nucleico codifica una enzima de la ruta metabólica de alqueno expresada en una cantidad suficiente para convertir un alcohol a un alqueno"* no representa ningún tipo de falta de claridad pues indica que debe existir una **cantidad determinada de enzima** tal que la reacción de conversión de un alcohol a alqueno tenga lugar.

A este respecto, es de notar que resulta imposible definir una cantidad concreta de enzima requerida para catalizar dicha reacción ya que esto depende del grado de expresión enzimática logrado mediante las modificaciones genéticas reivindicadas, razón por la que la expresión *"cantidad suficiente"* es completamente válida y acorde al objeto y naturaleza de la presente invención.

Con base en estas aclaraciones, solicitamos de manera respetuosa sea reconocido que el lenguaje objetado por el señor Examinador no da lugar a ningún tipo de incoherencia o falta de claridad, razón por la que sus objeciones carecen de todo fundamento.

Complementando la defensa del actual pliego reivindicatorio –el cual reiteramos representa una divulgación apropiada del objeto y alcance de la invención sometida a estudio–, es preciso ahora mencionar que la materia reivindicada, o más específicamente los tres grupos inventivos identificados por el señor Examinador, comparten un **único concepto técnico inventivo** y por tanto, hacen referencia a una única invención.

En este sentido, destacamos que dichos tres grupos inventivos se encuentran dirigidos por igual a organismos microbianos de origen no natural que ejecutan rutas metabólicas para obtener un alqueno a partir de un alcohol, razón por la que no hay lugar a afirmar que las diferentes modalidades de la presente invención puedan corresponder a grupos inventivos independientes.

Justamente, solicitamos se reconozca en esta instancia que cada uno de los grupos inventivos I, II y III ilustran **modalidades específicas** de la presente invención que se diferencian a nivel de las enzimas particulares que intervienen en el proceso biosintético, pero que al fin de cuentas describen por igual microorganismos que ejecutan rutas metabólicas para obtener un alqueno a partir de un alcohol.

Debido a esto, concluimos que la materia consignada a lo largo de este nuevo pliego reivindicatorio se encuentra cobijada por un **único concepto inventivo** común a los tres grupos inventivos mencionados en el Oficio técnico, manifestando consecuentemente total unidad de invención.

Más allá de lo anteriormente comentado, es pertinente ahora mencionar que el capítulo descriptivo que acompaña la presente solicitud pone a disposición del versado en la materia toda la información necesaria para que este, con ayuda de sus habilidades y conocimientos propios del oficio, se encuentre en plena capacidad de ejecutar cada una de las modalidades comprendidas dentro del alcance de las nuevas reivindicaciones, y en virtud de esto, sustenta de manera suficiente y completa la presente invención.

Más específicamente, reiteramos que el capítulo descriptivo da a conocer un elevado número de enzimas relacionadas con la ruta metabólica reivindicada y por tanto capaces de dar lugar a la reacción y conversión química que interviene en la obtención de un alqueno a partir de un alcohol, haciendo siempre referencia a sus respectivos **números EC** e incluso a **números de GenBank Accession** y **números únicos GI** relativos a los genes que codifican para las mismas.

Dicho esto, y teniendo en cuenta la solicitud de un Certificado de Depósito por parte del señor Examinador, llamamos la atención sobre el hecho de que para el presente caso resulta completamente innecesario remitir tal documento puesto que a lo largo de todo el capítulo descriptivo se hace referencia específica a números de GenBank Accession y números únicos GI relativos a los genes, y números EC relativos a las enzimas reivindicadas que como tal, constituyen materia completamente familiar para el versado en la materia.

Tal y como fue mencionado anteriormente para el caso de los números EC, es de notar que dichos números de GenBank Accession y números únicos GI hacen parte de las divulgaciones del capítulo descriptivo para proporcionar ejemplos de candidatos que pueden ser empleados a fin de obtener la actividad reivindicada entendida como la conversión de un sustrato determinado en un producto puntual.

De esta manera, el versado en la materia puede dirigirse a bases de datos como GenBank, en donde a través de dichos números puede acceder a toda la información disponible al público con relación a las enzimas y las secuencias de nucleótidos que codifican para las mismas, para luego aplicar metodologías de rutina en el campo técnico y alcanzar posteriormente la presente invención.

En consecuencia, considerando que la descripción enseña y referencia información que se encuentra disponible al público a través de los **números de GenBank Accession, números únicos GI y números EC**, concluimos que la persona normalmente versada en la materia se encuentra en plena capacidad de alcanzar el organismo microbiano que se reivindica sin necesidad de requerir información adicional a la mencionada, hecho que demuestra que no hay lugar a presentar ningún tipo de certificado de depósito relativo a la presente invención.

Así pues, solicitamos de manera respetuosa se dé lugar al retiro de las objeciones que cuestionan la validez y suficiencia del capítulo descriptivo que acompaña la presente solicitud toda vez que, como hemos demostrado, el mismo contiene y pone a disposición del versado en la materia toda la información necesaria para que este pueda comprender el objeto y alcance de la presente invención, y pueda además llevarla a cabo sin inconveniente alguno.

Con base en las modificaciones llevadas a cabo y la argumentación aquí desarrollada, concluimos que la totalidad de las objeciones emitidas por el señor Examinador en contra de la claridad, concisión, unidad de invención y suficiencia de la descripción de la presente solicitud han sido pertinentemente resueltas, razón por la que solicitamos el consecuente retiro de las mismas.

Por último, y acatando la sugerencia manifestada en el Oficio técnico, solicitamos se modifique el título de la presente solicitud de la siguiente manera: *"MICROORGANISMOS DE ORIGEN NO NATURAL Y METODOS PARA EL USO DE LOS MISMOS EN LA BIOSÍNTESIS DE ALQUENOS A PARTIR DE ALCOHOLES"*.

Novedad y Nivel inventivo

Aclarado lo anterior, procedemos a demostrar que la invención aquí divulgada cumple satisfactoriamente con los requisitos de novedad y nivel inventivo a la luz de los documentos D1 (*"Compositions and methods for producing isoprene"*, US 20090203102) y D2 (*"Polymerization of isoprene from renewable resources"*, US 20110040058) citados como arte previo relevante para su patentabilidad.

Para contextualizar el análisis que prosigue, nos permitimos presentar aquí la nueva reivindicación 1 modificada de la manera señalada anteriormente:

"Un organismo microbiano de origen no natural, el organismo microbiano tiene una ruta metabólica de alqueno y comprende al menos un ácido nucleico exógeno que es heterólogo y que se deriva de una especie diferente a dicho organismo microbiano, en donde dicho ácido nucleico codifica una enzima de la ruta metabólica de alqueno expresada en una cantidad suficiente para convertir un alcohol a un alqueno, caracterizado porque la ruta metabólica de alqueno comprende una ruta metabólica seleccionada de: (1) una alcohol cinasa que comprende un miembro de la comisión de enzimas (EC) número 2.7.1, y una fosfato liasa que comprende un miembro de EC 4.2.3; (2) una difosfocinasa que comprende un miembro de EC 2.7.6 y una difosfato liasa que comprende un miembro de EC 4.2.3; y (3) una alcohol cinasa que comprende un miembro de la comisión de enzimas (EC) número 2.7.1, una alquil fosfato cinasa que comprende un miembro de EC 2.7.4, y una difosfato liasa que comprende un miembro de EC 4.2.3,

en donde dicho alcohol se selecciona del grupo que consiste de etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, isobutanol, tert-butanol, butan-2-ol, pentan-1-ol, 3-metilbutan-1-ol, pentan-2-ol, pentan-3-ol, 2-metilbutan-1-ol, 3-metilbutan-2-ol, 2-metilbutan-2-ol, 2-metilbut-3-en-2-ol, but-3-en-1-ol, but-3-en-2-ol, 1-feniletanol, 2-feniletanol, but-2-en-1-ol, y octanol; y

en donde dicho alqueno se selecciona del grupo que consiste de etileno, n propileno, but-1-en, isobutileno, but-2-eno, pent-1-eno, 3-metilbut-1-eno, pent-2-eno, 2-metilbut-1-eno, 2-metilbut-2-eno, 3-metilbuta-1,2-dieno, 1,3-butadieno, estireno, y octeno."

Adaptado del nuevo pliego reivindicatorio, reivindicación 1

Tal y como es posible apreciar, esta reivindicación hace referencia ahora a un microorganismo modificado genéticamente para llevar a cabo cualquiera de las rutas metabólicas (1), (2) o (3) diseñadas específicamente para transformar un alcohol en un alqueno, definiendo así una invención cuyo alcance se define en función de los siguientes dos factores:

- La mención específica de los **sustratos (alcoholes) y productos (alquenos)** relacionados con dichas rutas metabólicas; y
- La caracterización de las **enzimas** que intervienen en cada una de dichas rutas metabólicas mediante sus respectivos **números EC**.

Partiendo de este punto, afirmamos que las enseñanzas de los documentos D1 y D2 no se relacionan en absoluto con el objeto y alcance de la presente solicitud, pues se encuentran dirigidas a materia considerablemente diferente y por tanto, no constituyen soporte documental suficiente para perjudicar la patentabilidad de esta invención.

Como primera medida, llamamos la atención sobre el hecho de que las enseñanzas de dichas referencias se limitan a describir microorganismos modificados capaces únicamente de producir **isopreno**, el cual se encuentra completamente excluido del alcance de la presente solicitud a pesar de ser un alqueno.

Más en detalle, la presente invención describe organismos microbianos que ejecutan vías biosintéticas enfocadas en la obtención de etileno, n propileno, but-1-eno, isobutileno, but-2-eno, pent-1-eno, 3-metilbut-1-eno, pent-2-eno, 2-metilbut-1-eno, 2-metilbut-2-eno, 3-metilbuta-1,2-dieno, 1,3-butadieno, estireno, y octeno, ninguno de los cuales se encuentra anticipado por lo divulgado en los documentos D1 o D2.

Adicionalmente, encontramos que los sustratos para la obtención de **isopreno** según los documentos D1 y D2 no corresponden a ninguno de los alcoholes aquí reivindicados sino a **mevalonato (documento D1) y 2-metil-3-buten-2-ol (documento D2)**, alejándose aún más del objeto de la presente invención.

Teniendo en cuenta entonces que ninguno de los documentos D1 o D2 anticipa de manera exacta la conversión de un **alcohol** seleccionado entre etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, isobutanol, tert-butanol, butan-2-ol, pentan-1-ol, 3-metilbutan-1-ol, pentan-2-ol, pentan-3-ol, 2-metilbutan-1-ol, 3-metilbutan-2-ol, 2-metilbutan-2-ol, 2-metilbut-3-en-2-ol, but-3-en-1-ol, but-3-en-2-ol, 1-feniletanol, 2-feniletanol, but-2-en-1-ol, y octanol en un **alqueno** respectivamente etileno, n propileno, but-1-eno, isobutileno, but-2-eno, pent-1-eno, 3-metilbut-1-eno, pent-2-eno, 2-metilbut-1-eno, 2-metilbut-2-eno, 3-metilbuta-1,2-dieno, 1,3-butadieno, estireno, y octeno, a través de cualquiera de las rutas metabólicas reivindicadas, concluimos que tales enseñanzas no desvirtúan la novedad de la presente invención.

Asimismo, destacamos que las **rutas biosintéticas** descritas por los documentos D1 y D2 no son análogas o de algún modo equivalentes a las aquí reivindicadas, razón por la que resulta imposible afirmar que existe algún tipo de similitud entre tales enseñanzas y el objeto de la presente invención, aún ambas se encuentren dirigidas al desarrollo de microorganismos genéticamente modificados.

Ya que dicho arte previo mantiene total silencio respecto al diseño de **rutas biosintéticas** para la obtención de los alquenos reivindicados en donde intervienen las siguientes enzimas:

- 14
- (1) una alcohol cinasa que comprende un miembro de la comisión de enzimas (EC) número 2.7.1, y una fosfato liasa que comprende un miembro de EC 4.2.3;
 - (2) una difosfocinasa que comprende un miembro de EC 2.7.6 y una difosfato liasa que comprende un miembro de EC 4.2.3; y
 - (3) una alcohol cinasa que comprende un miembro de la comisión de enzimas (EC) número 2.7.1, una alquil fosfato cinasa que comprende un miembro de EC 2.7.4, y una difosfato liasa que comprende un miembro de EC 4.2.3;

concluimos que ninguna de las características técnicas de la presente invención se ven anticipadas o sugeridas por las divulgaciones de los documentos D1 y D2.

Dicho esto, es pertinente enfatizar en que el concepto técnico inventivo de esta invención se fundamenta en el desarrollo de un microorganismo no-natural modificado mediante la inserción de material genético codificante para una serie de enzimas en particular que, en conjunto, establecen una ruta metabólica dirigida a la obtención de un grupo de alquenos a partir de alcoholes particulares.

Considerando entonces este fundamento, concluimos que los documentos D1 y D2 citados por el señor Examinador no guardan relación alguna con el objeto de la presente invención puesto que describen **rutas biosintéticas distintas** que (i) parten de sustratos o materias primas diferentes a las reivindicadas, e igualmente (ii) concluyen en la obtención de isopreno, alqueno que ha sido completamente excluido del alcance de la presente invención.

Así las cosas, solicitamos sea reconocida la total novedad de la invención aquí reivindicada, la cual se diferencia de manera suficiente y clara de las divulgaciones de los documentos D1 y D2, las cuales resultan **alejadas** de la caracterización expuesta a lo largo del actual pliego reivindicatorio.

Ahora bien, en lo referente al nivel inventivo de la invención aquí descrita, afirmamos que las evidentes deficiencias del citado arte previo demuestran que el desarrollo de los microorganismos reivindicados no representa ningún desenlace obvio inspirado por los conocimientos ya descritos en el campo técnico, razón por la que no hay lugar a cuestionar el cumplimiento de dicho requisito de patentabilidad.

En otras palabras, consideramos que las enseñanzas de los citados documentos D1 y D2 orientarían a la persona normalmente versada en la materia a desarrollar microorganismos capaces de llevar a cabo **rutas metabólicas distintas** enfocadas en la obtención de **productos igualmente distintos** , alejándolo evidentemente de la caracterización propia de la presente invención.

Concretamente, afirmamos que dicho arte previo incita al versado en la materia a desarrollar microorganismos enfocados en la síntesis de **isopreno** mediante la ejecución de **rutas biosintéticas distintas a las reivindicadas** , fallando abiertamente en anticipar, sugerir o motivar remotamente la caracterización esencial de la invención aquí reivindicada.

Partiendo de dichas diferencias –las cuales resultan de suma importancia pues en ellas radica el concepto técnico inventivo de la presente invención–, concluimos que el desarrollo de los microorganismos y métodos aquí reivindicados no representa una derivación obvia de los adelantos ya conocidos en el campo técnico, sino que es fruto de una actividad de auténtica innovación que como tal, es meritoria del privilegio de patente aquí solicitado.

De la mano con esto, reiteramos que el arte previo ignora completamente la posibilidad de obtener los alquenos etileno, n propileno, but-1-eno, isobutileno, but-2-eno, pent-1-eno, 3-metilbut-1-eno, pent-2-eno, 2-metilbut-1-eno, 2-metilbut-2-eno, 3-metilbuta-1,2-dieno, 1,3-butadieno, estireno, y octeno como producto de las **rutas metabólicas (1), (2) y (3)** contempladas por la presente invención, y que por tanto el mismo no podría haber brindado al versado en la materia motivación o expectativas suficientes respecto a su desarrollo.

En consecuencia, solicitamos de manera insistente sea reconocido el cabal cumplimiento del requisito de nivel inventivo por parte de la presente invención, teniendo en cuenta que ninguno de los documentos citados anticipa el desarrollo de **rutas biosintéticas** en donde intervengan:

- Los **sustratos alcohólicos** etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, isobutanol, tert-butanol, butan-2-ol, pentan-1-ol, 3-metilbutan-1-ol, pentan-2-ol, pentan-3-ol, 2-metilbutan-1-ol, 3-metilbutan-2-ol, 2-metilbutan-2-ol, 2-metilbut-3-en-2-ol, but-3-en-1-ol, but-3-en-2-ol, 1-feniletanol, 2-feniletanol, but-2-en-1-ol, y octanol;
- Las **enzimas**:
 - (1) alcohol cinasa (EC 2.7.1) y fosfato liasa (EC 4.2.3);
 - (2) difosfocinasa (EC 2.7.6) y difosfato liasa (EC 4.2.3); y
 - (3) alcohol cinasa (EC 2.7.1), alquil fosfato cinasa (EC 2.7.4) y difosfato liasa (EC 4.2.3); y
- Los **productos de alqueno** etileno, n propileno, but-1-eno, isobutileno, but-2-eno, pent-1-eno, 3-metilbut-1-eno, pent-2-eno, 2-metilbut-1-eno, 2-metilbut-2-eno, 3-metilbuta-1,2-dieno, 1,3-butadieno, estireno, y octeno.

Considerando entonces el conjunto de modificaciones y argumentos presentados a lo largo de este memorial, concluimos que la novedad y nivel inventivo de la presente invención se mantienen vigentes a pesar de las objeciones y comentarios expresados en el Oficio técnico, las cuales hemos solucionado y aclarado de manera pertinente.

En vista de lo anteriormente expuesto, respetuosamente solicito el retiro de las objeciones de la presente solicitud ya que en opinión del solicitante cumple con todos los requisitos establecidos en la Decisión 486.

Atentamente,



JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

T.P. No. 57.492 del C.S.J.

C.C. 80.410.337 de Usaquén

Calle 70 A No. 4 - 41

REIVINDICACIONES

1. Un organismo microbiano de origen no natural, el organismo microbiano tiene una ruta metabólica de alqueno y comprende al menos un ácido nucleico exógeno que es heterólogo y que se deriva de una especie diferente a dicho organismo microbiano, en donde dicho ácido nucleico codifica una enzima de la ruta metabólica de alqueno expresada en una cantidad suficiente para convertir un alcohol a un alqueno, caracterizado porque la ruta metabólica de alqueno comprende una ruta metabólica seleccionada de: (1) una alcohol cinasa que comprende un miembro de la comisión de enzimas (EC) número 2.7.1, y una fosfato liasa que comprende un miembro de EC 4.2.3; (2) una difosfocinasa que comprende un miembro de EC 2.7.6 y una difosfato liasa que comprende un miembro de EC 4.2.3; y (3) una alcohol cinasa que comprende un miembro de la comisión de enzimas (EC) número 2.7.1, una alquil fosfato cinasa que comprende un miembro de EC 2.7.4, y una difosfato liasa que comprende un miembro de EC 4.2.3,

en donde dicho alcohol se selecciona del grupo que consiste de etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, isobutanol, tert-butanol, butan-2-ol, pentan-1-ol, 3-metilbutan-1-ol, pentan-2-ol, pentan-3-ol, 2-metilbutan-1-ol, 3-metilbutan-2-ol, 2-metilbutan-2-ol, 2-metilbut-3-en-2-ol, but-3-en-1-ol, but-3-en-2-ol, 1-feniletanol, 2-feniletanol, but-2-en-1-ol, y octanol; y

en donde dicho alqueno se selecciona del grupo que consiste de etileno, n propileno, but-1-eno, isobutileno, but-2-eno, pent-1-eno, 3-metilbut-1-eno, pent-2-eno, 2-metilbut-1-eno, 2-metilbut-2-eno, 3-metilbuta-1,2-dieno, 1,3-butadieno, estireno, y octeno.

2. El organismo microbiano de origen no natural de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el organismo microbiano comprende dos o tres ácidos nucleicos exógenos que codifican cada uno una enzima de la ruta metabólica de alqueno.

3. El organismo microbiano de origen no natural de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque los dos ácidos nucleicos exógenos codifican una alcohol cinasa y un fosfato liasa.

4. El organismo microbiano de origen no natural de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque los dos ácidos nucleicos exógenos codifican una difosfocinasa y una difosfato liasa.

5. El organismo microbiano de origen no natural de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque los tres ácidos nucleicos exógenos codifican una alcohol cinasa, una alquil fosfato cinasa y una difosfato liasa.

6. El organismo microbiano de origen no natural de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque dicho ácido nucleico exógeno comprende ácidos nucleicos heterólogos derivados de una especie diferente a dicho organismo microbiano.

7. El organismo microbiano de origen no natural de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el organismo microbiano de origen no natural está en un medio de cultivo anaeróbico que comprende menos de 10% de saturación de oxígeno disuelto.

8. Un método para producir etileno, n propileno, but-1-eno, isobutileno, but-2-eno, pent-1-eno, 3-metilbut-1-eno, pent-2-eno, 2-metilbut-1-eno, 2-metilbut-2-eno, 3-metilbuta-1,2-dieno, 1,3-butadieno, estireno, u octeno, caracterizado porque dicho método comprende cultivar el organismo microbiano de origen no natural de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-7 en un medio de cultivo bajo condiciones y durante un período de tiempo para producir dicho alqueno, y separar dicho alqueno de dicho microorganismo de origen no natural.

9. El método de conformidad con la reivindicación 8, en donde dicha separación comprende aislar dicho alqueno de dicho microorganismo de origen no natural mediante destilación.

ANEXO 1

Adaptado del capítulo descriptivo de la presente solicitud, Ejemplo I

Número de Comisión de la Enzima	Nombre de la Enzima	Número de Comisión de la Enzima	Nombre de la Enzima	Número de Comisión de la Enzima	Nombre de la Enzima
2.7.1.1	hexocinasa	2.7.1.48	uridina cinasa	2.7.1.94	acilglicerol cinasa
2.7.1.2	glucocinasa	2.7.1.49	hidroximetilpirimidina cinasa	2.7.1.95	canamicina cinasa
2.7.1.3	cetohexocinasa	2.7.1.50	hidroxietiltiazol cinasa	2.7.1.100	S-metil-5-tiorribosa cinasa
2.7.1.4	fructocinasa	2.7.1.51	L-fuculocinasa	2.7.1.101	tagatosa cinasa
2.7.1.5	ramnulocinasa	2.7.1.52	fucocinasa	2.7.1.102	hamamelosa cinasa
2.7.1.6	galactocinasa	2.7.1.53	L-xilulocinasa	2.7.1.103	viomicina cinasa
2.7.1.7	manocinasa	2.7.1.54	D-arabinocinasa	2.7.1.105	6-fosfofructo-2-cinasa
2.7.1.8	glucosamina cinasa	2.7.1.55	alosa cinasa	2.7.1.106	glucosa-1,6-bisfosfato sintasa
2.7.1.10	fosfoglucoquinasa	2.7.1.56	1-fosfofructocinasa	2.7.1.107	diacilglicerol cinasa
2.7.1.11	6-fosfofructocinasa	2.7.1.58	2-deshidro-3-desoxigalactonocinasa	2.7.1.108	dolicol cinasa
2.7.1.12	gluconocinasa	2.7.1.59	N-acetilglucosamina cinasa	2.7.1.113	desoxiguanosina cinasa
2.7.1.13	deshidrogluconocinasa	2.7.1.60	N-acilmanosamina cinasa	2.7.1.114	AMP-timidina cinasa
2.7.1.14	sedoheptulocinasa	2.7.1.61	acil-fosfato-hexosa fosfotransferasa	2.7.1.118	ADP-timidina cinasa
2.7.1.15	ribocinasa	2.7.1.62	fosforamidato-hexosa fosfotransferasa	2.7.1.119	higromicina-B 7"-O-cinasa

Número de Comisión de la Enzima	Nombre de la Enzima	Número de Comisión de la Enzima	Nombre de la Enzima	Número de Comisión de la Enzima	Nombre de la Enzima
2.7.1.16	ribulocinasa	2.7.1.63	polifosfato-glucosa fosfotransferasa	2.7.1.121	fosfoenolpiruvato- glicerona fosfotransferasa
2.7.1.17	xilulocinasa	2.7.1.64	inositol 3-cinasa	2.7.1.122	xilitol cinasa
2.7.1.18	fosforibocinasa	2.7.1.65	escilo-inosamina 4- cinasa	2.7.1.127	inositol-trisfosfato 3- cinasa
2.7.1.19	fosforribulocinasa	2.7.1.66	undecaprenol cinasa	2.7.1.130	tetraacildisacárido 4'- cinasa
2.7.1.20	adenosina cinasa	2.7.1.67	1-fosfatidilinositol 4- cinasa	2.7.1.134	inositol-tetrakisfosfato 1-cinasa
2.7.1.21	timidina cinasa	2.7.1.68	1-fosfatidilinositol-4- fosfato 5-cinasa	2.7.1.136	macrólido 2'-cinasa
2.7.1.22	ribosilnicotinamida cinasa	2.7.1.69	proteína-Np- fosfohistidina-azúcar fosfotransferasa	2.7.1.137	fosfatidilinositol 3- cinasa
2.7.1.23	NAD ⁺ cinasa	2.7.1.70	idéntico a EC 2.7.1.37.	2.7.1.138	ceramida cinasa
2.7.1.24	defosfo-CoA cinasa	2.7.1.71	siquimato cinasa	2.7.1.140	inositol-tetrakisfosfato 5-cinasa
2.7.1.25	adenilil-sulfato cinasa	2.7.1.72	estreptomicina 6-cinasa	2.7.1.142	glicerol-3-fosfato-glucosa fosfotransferasa
2.7.1.26	riboflavina cinasa	2.7.1.73	inosina cinasa	2.7.1.143	difosfato-purina nucleósido cinasa
2.7.1.27	eritritol cinasa	2.7.1.74	desoxicitidina cinasa	2.7.1.144	tagatosa-6-fosfato cinasa
2.7.1.28	triocinasa	2.7.1.76	desoxiadenosina cinasa	2.7.1.145	desoxinucleósido cinasa
2.7.1.29	glicerona cinasa	2.7.1.77	nucleósido fosfotransferasa	2.7.1.146	fosfofructocinasa dependiente de ADP

Número de Comisión de la Enzima	Nombre de la Enzima	Número de Comisión de la Enzima	Nombre de la Enzima	Número de Comisión de la Enzima	Nombre de la Enzima
2.7.1.30	glicerol cinasa	2.7.1.78	polinucleótido 5'- hidroxil-cinasa	2.7.1.147	glucocinasa dependiente de ADP
2.7.1.31	glicerato cinasa	2.7.1.79	difosfato-glicerol fosfotransferasa	2.7.1.148	4-(citidina 5'-difosfo)-2- C-metil-D-eritritol cinasa
2.7.1.32	colina cinasa	2.7.1.80	difosfato-serina fosfotransferasa	2.7.1.149	1-fosfatidilinositol-5- fosfato 4-cinasa
2.7.1.33	pantotenato cinasa	2.7.1.81	hidroxilisina cinasa	2.7.1.150	1-fosfatidilinositol-3- fosfato 5-cinasa
2.7.1.34	pantoteína cinasa	2.7.1.82	etanolamina cinasa	2.7.1.151	inositol-polifosfato multicinasa
2.7.1.35	piridoxal cinasa	2.7.1.83	pseudouridina cinasa	2.7.1.153	fosfatidilinositol-4,5- bisfosfato 3-cinasa
2.7.1.36	mevalonato cinasa	2.7.1.84	alquilglicerona cinasa	2.7.1.154	fosfatidilinositol-4- fosfato 3-cinasa
2.7.1.39	homoserina cinasa	2.7.1.85	β -glucósido cinasa	2.7.1.156	adenosilcobinamida cinasa
2.7.1.40	piruvato cinasa	2.7.1.86	NADH cinasa	2.7.1.157	N-acetilgalactosamina cinasa
2.7.1.41	glucosa-1-fosfato fosfodismutasa	2.7.1.87	estreptomicina 3"- cinasa	2.7.1.158	inositol-pentakisfosfato 2-cinasa
2.7.1.42	riboflavina fosfotransferasa	2.7.1.88	dihidroestreptomicina- 6-fosfato 3'a-cinasa	2.7.1.159	inositol-1,3,4-trisfosfato 5/6-cinasa
2.7.1.43	glucuronocinasa	2.7.1.89	tiamina cinasa	2.7.1.160	2'-fosfotransferasa

Número de Comisión de la Enzima	Nombre de la Enzima	Número de Comisión de la Enzima	Nombre de la Enzima	Número de Comisión de la Enzima	Nombre de la Enzima
2.7.1.44	galacturonocinasa	2.7.1.90	difosfato-fructosa-6- fosfato 1- fosfotransferasa	2.7.1.161	riboflavina cinasa dependiente de CTP
2.7.1.45	2-deshidro-3- desoxigluconocinasa	2.7.1.91	esfinganina cinasa	2.7.1.162	N-acetilhexosamina 1- cinasa
2.7.1.46	L-arabinocinasa	2.7.1.92	5-deshidro-2- desoxigluconocinasa	2.7.1.163	higromicina B 4-O-cinasa
2.7.1.47	D-ribulocinasa	2.7.1.93	alquilglicerol cinasa	2.7.1.164	O-fosfoseril-tRNA ^{Sec} cinasa

Enzyme Classification and Nomenclature

Sinead Boyce, *Trinity College, Dublin, Ireland*

Keith F Tipton, *Trinity College, Dublin, Ireland*

Enzyme classification and nomenclature is a system that allows the unambiguous identification of enzymes in terms of the reactions they catalyse. This relies on a numerical system to class enzymes in groups according to the types of reaction catalysed and systematic naming that describes the chemical reaction involved.

Introduction

The need for a rational nomenclature for enzymes can be seen from the plethora of unhelpful names for enzymes in the earlier literature. Only those who were directly involved might have known the difference between the old yellow enzyme and the new yellow enzyme and what diaphorase, or for that matter DT-diaphorase, catalysed (try EC 1.6.99.1 and EC 1.8.1.4). Similarly, the reaction catalysed by rhodanese (thiosulfate sulfurtransferase: EC 2.8.1.1) was not apparent from its name and use of the name urokinase to describe a peptidase (EC 3.4.21.73) is confusing since the term kinase is usually used for enzymes that transfer phosphate from ATP to another substrate.

In trying to bring some order to the chaotic situation of enzyme nomenclature, Malcolm Dixon and Edwin Webb, in 1958, took a step that was radically different from that used in other branches of nomenclature by classifying enzymes in terms of the reactions they catalysed, rather than by their structures. This system has been adopted and developed by the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB), through its Joint Nomenclature Committee with the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) into the *Enzyme Nomenclature* list of enzymes. This has been through several editions, the most recent being published in 1992. This material is also made available in a modified form through the SWISSPROT ENZYME on-line database. More recent additions and modifications to the list have been published as supplements in the *European Journal of Biochemistry* and the most recent additions are available on-line (see Enzyme Supplement, 1999 in Further Reading section).

Detailed rules for naming and classifying enzymes have been formulated and it is a relatively easy matter to assign an enzyme to an overall class and to give it a name that describes what it does. For example, if it oxidizes something by reducing NAD(P), it is a dehydrogenase classified as EC 1. x. 1. -, where the number x refers to the group oxidized: 1 for -CHOH-, 2 for aldehyde or ketone, etc.; however, if it transfers a phosphate, diphosphate or

another phosphate-containing group through its phosphate to another substrate, it is a phosphotransferase classified as EC 2.7. z. -, where z refers to the nature of the acceptor group, and so on. The detailed descriptions of the procedures for assigning enzymes to specific classes and subclasses and the rules for systematic enzyme names that have been approved by the IUBMB Nomenclature Committee have been published in *Enzyme Nomenclature* (1992). The account below has been adapted from the fuller material in that source, which should be consulted if further detail is required.

General Classification Structure

The basic layout of the classification for each enzyme is described below with some indication of the guidelines followed. Further details of the principles governing the nomenclature of individual enzyme classes are given in the following sections.

EC number: The classification number, which is made up of four digits, identifies the enzyme by the reaction catalysed. This is also valuable for relating the information to other databases.

Recommended name: The most commonly used name for the enzyme is usually used, provided that it is unambiguous. A number of generic words indicating reaction types may be used in recommended names, but not in the systematic names, e.g. *dehydrogenase*, *reductase*, *oxidase*, *peroxidase*, *kinase*, *tautomerase*, *deaminase*, *dehydratase*, etc. Where additional information is needed to make the reaction clear, a phrase indicating the reaction or a product may be added in parentheses after the second part of the name, e.g. (*ADP-forming*), (*dimerizing*), (*CoA-acylating*).

Reaction: The actual reaction catalysed, written, where possible, in the form of a 'biochemical' equation [1]:



Introductory article

Article Contents

- Introduction
- General Classification Structure
- Notes on Chemical Nomenclature
- Enzyme Classes and Definitions
- Limitations and Problems
- Information and Updates

This formulation gives no indication of the preferred equilibrium of the reaction or, indeed, whether it is readily reversible. In the case of reversible reactions, the direction chosen for the reaction and systematic name is the same for all the enzymes in a given class, even if this direction has not been demonstrated for all. Thus, systematic names are based on this written reaction, even though only the reverse of this may actually have been demonstrated experimentally. Frequently, such biochemical equations are neither charge- nor mass-balanced.

Other name(s): Any other names that have been used for the enzyme. This is to be as comprehensive a list as possible to aid searching for any specific enzyme. The inclusion of a name in this list does not mean that its use is encouraged. In some cases where the same name has been given to more than one enzyme, this ambiguity will be indicated.

Systematic name: This attempts to describe in unambiguous terms what the enzyme actually catalyses. Systematic names consist of two parts. The first contains the name of the substrate or, in the case of a bimolecular reaction, of the two substrates separated by a colon. The second part, ending in *-ase*, indicates the nature of the reaction. A number of generic words indicating a type of reaction may be used in either recommended or systematic names: *oxidoreductase*, *oxygenase*, *transferase* (with a prefix indicating the nature of the group transferred), *hydrolase*, *lyase*, *racemase*, *epimerase*, *isomerase*, *mutase*, *ligase*. Where additional information is needed to make the reaction clear, a phrase indicating the reaction or a product should be added in parentheses after the second part of the name, e.g. (*ADP-forming*), (*dimerizing*), (*CoA-acylating*).

Comments: Brief comments on the nature of the reaction catalysed, possible relationships to other enzymes, species differences, metal-ion requirement, etc.

References: Key references on the identification, nature, properties and function of the enzyme. These have been omitted from the examples below to save space.

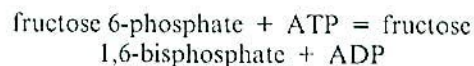
Notes on Chemical Nomenclature

Although a detailed description of chemical nomenclature is beyond the scope of this article, some comments are necessary because the fearsome names used are often difficult for a biochemist to understand. The aim of the chemist is to be able to name a compound in such a way that anyone who knows the rules of chemical nomenclature can write down its chemical structure and formula from it. Therefore, it must be unambiguous both in terms of all the chemical groups that make up the compound, how and where they are linked together and the compound's stereochemistry. This does lead to names that are not much help for general use, for example, the neurotrans-

mitter norepinephrine (noradrenaline) has a systematic name of (*R*)-4-(2-amino-1-hydroxyethyl)-1,2-benzenediol, the antibiotic benzylpenicillin is [2*S*-(2 α ,5 α , 6 β)]-3,3-dimethyl-7-oxo-6-[(phenylacetyl)amino]-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylic acid and aspirin is 2-(acetyloxy)benzoic acid.

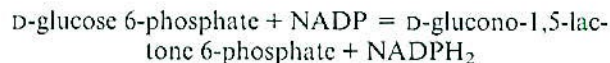
The basic rules for writing down the systematic name of a compound are to take a basic, or root, structure or its derivative, for example benzoic acid is the derivative of the root benzene in the case of aspirin. The substituents are then written before it with the position of each substituent and any stereochemistry being identified. There are several possible modifications of this procedure and it is possible to write more than one systematic name that is more-or-less unambiguous (see for example, the alternative names that have been used for norepinephrine in the Merck Index). Variations arise, for example, from the choice of root compound and the order in which the substituents are written. Where systematic names are used, the enzyme classification system uses the IUPAC system, which uses rather few root compounds and writes the substituents in alphabetical order (e.g. amino before hydroxy, before methyl etc.). Chemists use fewer root structures than biochemists. For example, biochemists all know the amino acid tryptophan and that it can be decarboxylated to tryptamine. Therefore, they have no trouble with naming the hormone melatonin *N*-acetyl-5-methoxytryptamine. However, if a chemist does not accept tryptamine as a root structure it would become *N*-[2-(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)ethyl]acetamide. Because the enzyme classification system is primarily designed for biochemists, the biochemical names are frequently used, where these are widely known. However, collaboration with IUPAC ensures that the systematic names can be readily found from these in their literature.

It should be noted that the systematic names of norepinephrine and melatonin are single 'words', which can contain lots of hyphens in them and generally systematic names are written as single 'words'. Among the few exceptions to this general rule are acids, including phosphates, as shown by the examples of penicillin and aspirin, where 'acid' is written as a separate word. Similarly creatine phosphate is written as two words, although it is possible to write the compound as a single word by rearranging the name to phosphocreatine. An example of such rearrangement is the name 6-phosphofructokinase for the enzyme (EC 2.7.1.11) that catalyses the reaction:



Note that the term bisphosphate is used here rather than diphosphate. In order to avoid confusion, diphosphate is used only for cases where the two phosphates are linked together (as in adenosine diphosphate; ADP) whereas bisphosphates have the two phosphates attached to separate groups in the molecule.

When a substrate name has two words there is a potential problem using them in enzyme names. Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (EC 1.1.1.49) catalyses the reaction:



but in order to indicate that the substrate oxidized is glucose 6-phosphate, not just phosphate, an extra hyphen is added to the enzyme name.

In denoting stereochemistry, the IUPAC rules prefer the *R*- and *S*- system and this is generally used for enzyme nomenclature. However, in the case of sugars and amino acids, the *D*- and *L*- designations are so well known that they are followed in the enzyme list. The use of italics in chemical names can at first seem rather odd, but the simplest way of thinking about it is to think how one would look up the name of a compound in an index, for example *N*-acetyl-5-methoxytryptamine would be found by searching through A for acetyl not N for *N*-acetyl. Clearly the same applies to *R*- and *S*-isomers. Therefore, the italic can be taken to mean 'do not bother to look under this letter in any index'. Having adopted this way of doing things, it is logical also to use italics for these when they occur in the middle of a name. The exceptions to this general rule are the *D*- and *L*- designations, which are not italicized, however, these are written, by convention, in a smaller size than normal.

The above summary glosses over many of the complexities of systematic chemical nomenclature and fuller details of the rules and their application can be found in *A Guide to IUPAC Nomenclature of Organic Compounds* (1994).

Enzyme Classes and Definitions

Class 1. —.—.— Oxidoreductases

This class contains the enzymes catalysing oxidation reactions. Since the oxidation of one group must be accompanied by the reduction of another, they are grouped together as oxidoreductases. The systematic enzyme name is in the form *donor:acceptor oxidoreductase*. The substrate that is being oxidized is regarded as being the hydrogen donor. The recommended name is commonly *donor dehydrogenase*. Although the term *reductase* is sometimes used as an alternative, it is important to remember that the recommended name does not define the equilibrium position of the reaction or the net direction of flux through the enzyme *in vivo*. Indeed, in some cases, an enzyme within a metabolic pathway can proceed in a thermodynamically unfavoured direction because of the effective removal of one of the reactants. The term *donor oxidase* is used only when O₂ is the acceptor.

The second figure in the code number of the oxidoreductases denotes the type of group in the hydrogen-donor substrate that is oxidized or reduced. The third number denotes the hydrogen acceptor: 1 denotes NAD(P), 2 a cytochrome, 3 molecular oxygen, 4 a disulfide, 5 a quinone or similar compound, 6 a nitrogenous group, 7 an iron-sulfur protein and 8 a flavin. The number 99 is used for all other acceptors. This group contains a number of enzymes that have been shown to work with synthetic acceptors, such as 2,6-dichloroindophenol or phenazine methosulfate, but where the physiological acceptor is unknown. It is intended that they should be transferred to more descriptive sub-subclasses when the natural acceptor is identified.

For subclasses 1.13 and 1.14, a different classification scheme is used since these enzymes catalyse the incorporation of oxygen into the substrate. The recommended names are generally monooxygenase or dioxygenase, depending on whether one or two atoms of oxygen are incorporated into the substance oxidized. The sub-subclasses are numbered from 11 onwards.

Table 1 summarizes the structure of Class 1.

Examples

EC 1.1.1.14

Recommended name: L-idoitol 2-dehydrogenase

Reaction: L-idoitol + NAD = L-sorbose + NADH₂

Other name(s): polyol dehydrogenase; sorbitol dehydrogenase

Systematic name: L-idoitol:NAD 2-oxidoreductase

Comments: Also acts on D-glucitol (giving D-fructose) and other closely related sugar alcohols.

EC 1.14.13.59

Recommended name: L-lysine 6-monooxygenase (NADPH₂)

Reaction: L-lysine + NADPH₂ + O₂ = *N*⁶-hydroxy-L-lysine + NADP + H₂O

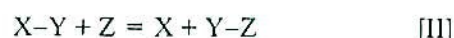
Other name(s): lysine *N*⁶-hydroxylase

Systematic name: L-lysine, NADPH₂:oxygen oxidoreductase (6-hydroxylating)

Comments: A flavoprotein (FAD). The enzyme from strain EN 222 of *E. coli* is highly specific for L-lysine; L-ornithine and L-homolysine are, for example, not substrates. A lysine monooxygenase (EC 1.13.12.10) from this organism has been reported to catalyse the same hydroxylation without the involvement of NAD(P)H₂.

Class 2. —.—.— Transferases

These enzymes transfer a group from one substrate (the donor) to another (the acceptor) according to the general reaction [II]:



Enzyme Classification and Nomenclature

Table 1 Class 1.—.— Oxidoreductases

-
- 1. 1.— Acting on the CH—OH group of donors
 - 1. 1. 1.— With NAD or NADP as acceptor
 - 1. 1. 2.— With a cytochrome as acceptor
 - 1. 1. 3.— With oxygen as acceptor
 - 1. 1. 4.— With a disulfide as acceptor
 - 1. 1. 5.— With a quinone or similar compound as acceptor
 - 1. 1. 99.— With other acceptors
 - 1. 2.— Acting on the aldehyde or oxo group of donors
 - 1. 2. 1.— With NAD or NADP as acceptor
 - 1. 2. 2.— With a cytochrome as acceptor
 - 1. 2. 3.— With oxygen as acceptor
 - 1. 2. 4.— With a disulfide as acceptor
 - 1. 2. 7.— With an iron-sulfur protein as acceptor
 - 1. 2. 99.— With other acceptors
 - 1. 3.— Acting on the CH—CH group of donors
 - 1. 3. 1.— With NAD or NADP as acceptor
 - 1. 3. 2.— With a cytochrome as acceptor
 - 1. 3. 3.— With oxygen as acceptor
 - 1. 3. 5.— With a quinone or related compound as acceptor
 - 1. 3. 7.— With an iron-sulfur protein as acceptor
 - 1. 3. 99.— With other acceptors
 - 1. 4.— Acting on the CH—NH₂ group of donors
 - 1. 4. 1.— With NAD or NADP as acceptor
 - 1. 4. 2.— With a cytochrome as acceptor
 - 1. 4. 3.— With oxygen as acceptor
 - 1. 4. 4.— With a disulfide as acceptor
 - 1. 4. 7.— With an iron-sulfur protein as acceptor
 - 1. 4. 99.— With other acceptors
 - 1. 5.— Acting on the CH—NH group of donors
 - 1. 5. 1.— With NAD or NADP as acceptor
 - 1. 5. 3.— With oxygen as acceptor
 - 1. 5. 4.— With a disulfide as acceptor
 - 1. 5. 5.— With a quinone or similar compound as acceptor
 - 1. 5. 99.— With other acceptors
 - 1. 6.— Acting on NADH₂ or NADPH₂
 - 1. 6. 1.— With NAD or NADP as acceptor
 - 1. 6. 2.— With a cytochrome as acceptor
 - 1. 6. 4.— With a disulfide as acceptor
 - 1. 6. 5.— With a quinone or similar compound as acceptor
 - 1. 6. 6.— With a nitrogenous group as acceptor
 - 1. 6. 8.— With a flavin as acceptor
 - 1. 6. 99.— With other acceptors
 - 1. 7.— Acting on other nitrogenous compounds as donors
 - 1. 7. 2.— With a cytochrome as acceptor
 - 1. 7. 3.— With oxygen as acceptor
 - 1. 7. 7.— With an iron-sulfur protein as acceptor
 - 1. 7. 99.— With other acceptors

continued

Table 1 – *continued*

-
- 1.8.– Acting on a sulfur group of donors
 - 1.8.1.– With NAD or NADP as acceptor
 - 1.8.2.– With a cytochrome as acceptor
 - 1.8.3.– With oxygen as acceptor
 - 1.8.4.– With a disulfide as acceptor
 - 1.8.5.– With a quinone or similar compound as acceptor
 - 1.8.7.– With an iron–sulfur protein as acceptor
 - 1.8.99.– With other acceptors
 - 1.9.– Acting on a haem group of donors
 - 1.9.3.– With oxygen as acceptor
 - 1.9.6.– With a nitrogenous group as acceptor
 - 1.9.99.– With other acceptors
 - 1.10.– Acting on diphenols and related substances as donors
 - 1.10.1.– With NAD or NADP as acceptor
 - 1.10.2.– With a cytochrome as acceptor
 - 1.10.3.– With oxygen as acceptor
 - 1.10.99.– With other acceptors
 - 1.11.– Acting on a peroxide as acceptor (peroxidases)
 - 1.11.1.– A single subclass containing the peroxidases
 - 1.12.– Acting on hydrogen as donor
 - 1.12.1.– With NAD or NADP as acceptor
 - 1.12.2.– With a cytochrome as acceptor
 - 1.12.99.– With other acceptors
 - 1.13.– Acting on single donors with incorporation of molecular oxygen
 - 1.13.11.– With incorporation of two atoms of oxygen
 - 1.13.12.– With incorporation of one atom of oxygen
 - 1.13.99.– Miscellaneous (requires further characterization)
 - 1.14.– Acting on paired donors with incorporation of molecular oxygen
 - 1.14.11.– With 2-oxoglutarate as one donor, and incorporation of one atom each of oxygen into both donors
 - 1.14.12.– With NADH₂ or NADPH₂ as one donor, and incorporation of two atoms of oxygen into one donor
 - 1.14.13.– With NADH₂ or NADPH₂ as one donor, and incorporation of one atom of oxygen
 - 1.14.14.– With reduced flavin or flavoprotein as one donor, and incorporation of one atom of oxygen
 - 1.14.15.– With a reduced iron–sulfur protein as one donor, and incorporation of one atom of oxygen
 - 1.14.16.– With reduced pteridine as one donor, and incorporation of one atom of oxygen
 - 1.14.17.– With ascorbate as one donor, and incorporation of one atom of oxygen
 - 1.14.18.– With another compound as one donor, and incorporation of one atom of oxygen
 - 1.14.99.– Miscellaneous (requires further characterization)
 - 1.15.– Acting on superoxide radicals as acceptor
 - 1.16.– Oxidizing metal ions
 - 1.16.1.– With NAD or NADP as acceptor
 - 1.16.3.– With oxygen as acceptor
 - 1.17.– Acting on –CH₂– groups
 - 1.17.1.– With NAD or NADP as acceptor
 - 1.17.3.– With oxygen as acceptor
 - 1.17.4.– With a disulfide as acceptor
 - 1.17.99.– With other acceptors
 - 1.18.– Acting on reduced ferredoxin as donor
 - 1.18.1.– With NAD or NADP as acceptor

continued

Table 1 – continued

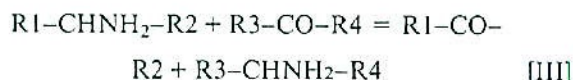
1.18. 6.– With dinitrogen as acceptor
1.18.99.– With H ⁺ as acceptor
1.19.– Acting on reduced flavodoxin as donor
1.19. 6.– With dinitrogen as acceptor
1.97.– Other oxidoreductases

Note: The Nomenclature Committee has accepted a recommendation that nicotinamide-adenine dinucleotide and nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate should be abbreviated to NAD and NADP, respectively, rather than NAD⁺ and NADP⁺, as used previously. In addition to avoiding the erroneous implication that these two compounds will be positively charged at physiological pH values, the reasons for this are given in the Newsletter (1996). The reduced forms of these coenzymes are written as NADH₂ and NADPH₂, rather than NADH and NADPH.

The systematic name is in the form *donor:acceptor group-transferase*. The recommended names are normally formed according to *acceptor grouptransferase* or *donor grouptransferase*.

Sometimes transferase reactions can be considered in different ways; for example, the general reaction shown above may be regarded as a transfer of the group Y from X to Z, and would therefore be termed a Y-transferase. However, it could also be considered as a breaking of the X–Y bond by the introduction of Z. For example, where Z represents phosphate, the process is often referred to as phosphorylation and the enzyme catalysing the reaction as a *phosphorylase*. For systematic purposes, these enzymes are classified as *phosphotransferases*.

The aminotransferase (transaminase) reactions involve the transfer of a –NH₂ group and H to a compound containing a carbonyl group, in exchange for the = O of that group (reaction [III]).



Thus, the reaction could be regarded as being an oxidative deamination of the donor (e.g. an amino acid) linked to the reductive amination of the acceptor (e.g. oxo acid). Therefore these enzymes might be classified as oxidoreductases. However, since the unique distinctive feature of the reaction is the transfer of the amino group, these enzymes are classified as amino transferases (subclass 2.6.1.)

The second figure in the code number of the transferases denotes the general nature of the group transferred (a one-carbon group, 2.1; aldehydic or ketonic group, 2.2; acyl group, 2.3, etc.) and the third number further specifies that group (methyltransferase, 2.1.1; formyltransferase, 2.1.2, etc.). The exception is the case of the enzymes transferring phosphorus-containing groups (subclass 2.7), where the third number specifies the nature of the acceptor group.

Table 2 summarizes the structure of Class 2.

Example

EC 2.1.1.114

Recommended name: hexaprenyldihydroxybenzoate methyltransferase

Reaction: S-adenosyl-L-methionine + 3-hexaprenyl-4,5-dihydroxybenzoate = S-adenosyl-L-homocysteine + 3-hexaprenyl-4-hydroxy-5-methoxybenzoate

Other name(s): 3,4-dihydroxy-5-hexaprenylbenzoate methyltransferase; dihydroxyhexaprenylbenzoate methyltransferase

Systematic name: S-adenosyl-L-methionine:3-hexaprenyl-4,5-dihydroxylate O-methyltransferase

Comments: Involved in the pathway of ubiquinone synthesis. This enzyme has been listed as EC 2.1.1.64 in some sequence databases; but that enzyme catalyses a different reaction

Class 3. –. –. – Hydrolases

These enzymes catalyse the hydrolytic cleavage of bonds such as C–O, C–N, C–C and some other bonds, including phosphoric anhydride bonds. The overlapping specificities of many of these enzymes make it difficult to formulate general rules that are applicable to all members of this class. The systematic name usually takes the form *substrate X-hydrolase*, where X is the group removed by hydrolysis. The recommended name is, in many cases, formed by the name of the substrate with the suffix *-ase*. It is understood that the name of the substrate with this suffix means a hydrolytic enzyme.

Hydrolytic enzymes might be classified as transferases, since hydrolysis itself can be regarded as transfer of a specific group to water as the acceptor. Yet, in most cases, the reaction with water as the acceptor was discovered earlier and is considered as the main physiological function of the enzyme. This is why such enzymes are classified as hydrolases rather than as transferases.

The second number indicates the nature of the bond hydrolysed, and the third normally specifies the nature of the substrate, e.g. in the esterases the *carboxylic ester*

hydrolases (3.1.1), *thiolester hydrolases* (3.1.2), *phosphoric monoester hydrolases* (3.1.3); in the glycosidases, the *O-glycosidases* (3.2.1), *N-glycosidases* (3.2.2), and so on.

The peptidases (formerly called peptide hydrolases; Class 3.4.-) cannot be accommodated within this general scheme. It is not even possible to give unambiguous systematic names because of variable specificities and great similarities between the actions of different peptidases. The enzymes are grouped into two sets of sub-subclasses, the endopeptidases (3.4.21–24 and 3.4.99) and exopeptidases

(3.4.11–19), with the third figure also depending on the catalytic mechanism. A complete list of the peptidases is now available on-line (see *Peptidases*, 1998 in Further Reading section).

Subclasses 3.9–3.11, which each contain only one or two known enzymes, only contain one sub-subclass each, denoted by the figure 1 (e.g. 3.9.1.1, 3.10.1, 3.10.1.2 etc).

Table 3 summarizes the structure of Class 3.

Table 2 Class 2.-.-.- Transferases

2. 1. -.- Transferring one-carbon groups
 2. 1. 1. - Methyltransferases
 2. 1. 2. - Hydroxymethyl-, formyl- and related transferases
 2. 1. 3. - Carboxyl- and carbamoyltransferases
 2. 1. 4. - Amidinotransferases
2. 2. -.- Transferring aldehyde or ketone residues
 2. 2. 1. - a single subclass containing the transaldolases and transketolases
2. 3. -.- Acyltransferases
 2. 3. 1. - Acyltransferases
 2. 3. 2. - Aminoacyltransferases
2. 4. -.- Glycosyltransferases
 2. 4. 1. - Hexosyltransferases
 2. 4. 2. - Pentosyltransferases
 2. 4.99. - Transferring other glycosyl groups
2. 5. -.- Transferring alkyl or aryl groups, other than methyl groups
 2. 5. 1. - A single subclass that includes a rather mixed group of such enzymes
2. 6. -.- Transferring nitrogenous groups
 2. 6. 1. - Transaminases (aminotransferases)
 2. 6. 3. - Oximinotransferases
 2. 6.99. - Transferring other nitrogenous groups
2. 7. -.- Transferring phosphorus-containing groups
 2. 7. 1. - Phosphotransferases with an alcohol group as acceptor
 2. 7. 2. - Phosphotransferases with a carboxyl group as acceptor
 2. 7. 3. - Phosphotransferases with a nitrogenous group as acceptor
 2. 7. 4. - Phosphotransferases with a phosphate group as acceptor
 2. 7. 6. - Diphosphotransferases
 2. 7. 7. - Nucleotidyltransferases
 2. 7. 8. - Transferases for other substituted phosphate groups
 2. 7. 9. - Phosphotransferases with paired acceptors
2. 8. -.- Transferring sulfur-containing groups
 2. 8. 1. - Sulfurtransferases
 2. 8. 2. - Sulfotransferases
 2. 8. 3. - CoA-transferases
2. 9. -.- Transferring selenium-containing groups

Examples

EC 3.1.2.23

Recommended name: 4-hydroxybenzoyl-CoA thioesterase

Reaction: 4-hydroxybenzoyl-CoA + H₂O = 4-hydroxybenzoate + CoA

Systematic name: 4-hydroxybenzoyl-CoA hydrolase

Comments: This enzyme is part of the bacterial 2,4-dichlorobenzoate degradation pathway

EC 3.4.22.38

Recommended name: cathepsin K

Reaction: Broad proteolytic activity. With small-molecule substrates and inhibitors, the major determinant of specificity is P2, which is preferably Leu, Met > Phe, and not Arg

Other names: cathepsin O and cathepsin X (both misleading, having been used for other enzymes); Cathepsin O₂

Comments: Prominently expressed in mammalian osteoclasts, and believed to play a role in bone resorption. In peptidase family C1

NOTE: The specificity of peptidases may be described in terms of a sequence of amino acid residues on either side of the peptide bond that is cleaved (scissile bond), which is indicated by

N-terminus

- - - - P3 - P2 - P1P1' - P2' - P3' - C-terminus

Class 4. -.-.- Lyases

These enzymes cleave C-C, C-O, C-N and other bonds by means other than hydrolysis or oxidation. They differ from other enzymes in that two substrates are involved in one reaction direction but only one in the other. When acting on the single substrate, a molecule is eliminated leaving double bonds or rings. The systematic name is formed according to the pattern *substrate group-lyase*. The hyphen is an important part of the name and, to avoid confusion, should not be omitted, e.g. *hydro-lyase* not 'hydrolyase'. In the recommended names, expressions like *decarboxylase* or *aldolase* (in case of elimination of CO₂ or aldehyde, respectively) are used. *Dehydratase* is used for those enzymes catalysing the elimination of water. In cases where the reverse reaction is much more important, or the only one demonstrated, *synthase* (not synthetase) may be used in the name. Although the term SYNTHETASE has

Enzyme Classification and Nomenclature

Table 3 Class 3.—.—, Hydrolases

-
- 3. 1. —.— Acting on ester bonds
 - 3.1. 1. — Carboxylic ester hydrolases
 - 3.1. 2. — Thiolester hydrolases
 - 3.1. 3. — Phosphoric monoester hydrolases
 - 3.1. 4. — Phosphoric diester hydrolases
 - 3.1. 5. — Triphosphoric monoester hydrolases
 - 3.1. 6. — Sulfuric ester hydrolases
 - 3.1. 7. — Diphosphoric monoester hydrolases
 - 3.1. 8. — Phosphoric triester hydrolases
 - 3.1.11. — Exodeoxyribonucleases producing 5'-phosphomonoesters
 - 3.1.13. — Exoribonucleases producing 5'-phosphomonoesters
 - 3.1.14. — Exoribonucleases producing other than 5'-phosphomonoesters
 - 3.1.15. — Exonucleases active with either ribo- or deoxyribonucleic acids and producing 5'-phosphomonoesters
 - 3.1.16. — Exonucleases active with either ribo- or deoxyribonucleic acids and producing other than 5'-phosphomonoesters
 - 3.1.21. — Endodeoxyribonucleases producing 5'-phosphomonoesters
 - 3.1.22. — Endodeoxyribonucleases producing other than 5'-phosphomonoesters
 - 3.1.25. — Site-specific endodeoxyribonucleases specific for altered bases
 - 3.1.26. — Endoribonucleases producing 5'-phosphomonoesters
 - 3.1.27. — Endoribonucleases producing other than 5'-phosphomonoesters
 - 3.1.30. — Endonucleases active with either ribo- or deoxyribonucleic acid and producing 5'-phosphomonoesters
 - 3.1.31. — Endonucleases active with either ribo- or deoxyribonucleic acid and producing other than 5'-phosphomonoesters
 - 3. 2. —.— Glycosidases
 - 3.2. 1. — Hydrolysing *O*-glycosyl compounds
 - 3.2. 2. — Hydrolysing *N*-glycosyl compounds
 - 3.2. 3. — Hydrolysing *S*-glycosyl compounds
 - 3. 3. —.— Acting on ether bonds
 - 3.3. 1. — Thioether hydrolases
 - 3.3. 2. — Ether hydrolases
 - 3. 4. —.— Acting on peptide bonds (peptidase)
 - 3.4.11. — Aminopeptidases
 - 3.4.13. — Dipeptidases
 - 3.4.14. — Dipeptidyl-peptidases and tripeptidyl-peptidases
 - 3.4.15. — Peptidyl-dipeptidases
 - 3.4.16. — Serine-type carboxypeptidases
 - 3.4.17. — Metallo-carboxypeptidases
 - 3.4.18. — Cysteine-type carboxypeptidases
 - 3.4.19. — Omega peptidases
 - 3.4.21. — Serine endopeptidases
 - 3.4.22. — Cysteine endopeptidases
 - 3.4.23. — Aspartic endopeptidases
 - 3.4.24. — Metalloendopeptidases
 - 3.4.99. — Endopeptidases of unknown catalytic mechanism
 - 3. 5. —.— Acting on carbon–nitrogen bonds, other than peptide bonds
 - 3.5. 1. — In linear amides
 - 3.5. 2. — In cyclic amides
 - 3.5. 3. — In linear amidines
 - 3.5. 4. — In cyclic amidines
 - 3.5. 5. — In nitriles
 - 3.5.99. — In other compounds

continued

Table 3 – continued

3. 6. –	Acting on acid anhydrides
3.6. 1. –	In phosphorus-containing anhydrides
3.6. 2. –	In sulfonyl-containing anhydrides
3. 7. –	Acting on carbon–carbon bonds
3.7. 1. –	In ketonic substances
3. 8. –	Acting on halide bonds
3.8. 1. –	In C-halide compounds
3. 9. –	Acting on phosphorus–nitrogen bonds
3.10. –	Acting on sulfur–nitrogen bonds
3.11. –	Acting on carbon–phosphorus bonds
3.12. –	Acting on sulfur–sulfur bonds

sometimes been used in the names of enzymes from this class, that use is discouraged in order to prevent confusion with enzymes from Class 6 (see below).

Various subclasses of the lyases include pyridoxal-phosphate enzymes that catalyse the elimination of a β - or γ -substituent from an α -amino acid, followed by a replacement of this substituent by some other group. In the overall replacement reaction, no unsaturated end product is formed; therefore, these enzymes might formally be classified as *alkyltransferases* (EC 2.5.1.-). However, there is ample evidence that the replacement is a two-step reaction involving the transient formation of enzyme-bound α,β - (or β,γ -)unsaturated amino acids. According to the rule that the first reaction is indicative for classification, these enzymes are correctly classified as *lyases*. Examples are *tryptophan synthase* (EC 4.2.1.20) and *cystathionine β -lyase* (EC 4.2.1.22). The second figure in the code number

indicates the bond broken: 4.1 are carbon–carbon lyases, 4.2 are carbon–oxygen lyases, and so on. The third figure gives further information on the group eliminated (e.g. CO_2 in 4.1.1 and H_2O in 4.2.1).

Table 4 summarizes the structure of Class 4.

Example

EC 4.1.2.39

Recommended name: hydroxynitrilase

Reaction: 2-hydroxyisobutyronitrile = cyanide + acetone

Other name(s): hydroxynitrile lyase; oxynitrilase

Systematic name: 2-hydroxyisobutyronitrile acetone-lyase

Comments: The enzyme from *Hevea* (rubber tree) and *Manihot* spp. (cassava) accepts aliphatic and aromatic hydroxynitriles, unlike EC 4.1.2.11, which does not act on aliphatic hydroxynitriles. 2-Hydroxyisobutyronitrile (acetone cyanohydrin) is liberated by glycosidase action on linamarin

Table 4 Class 4. –. –. – Lyases

4. 1. –	Carbon–carbon lyases
4. 1. 1 –	Carboxy-lyases
4. 1. 2 –	Aldehyde-lyases
4. 1. 3 –	Oxo-acid-lyases
4. 1.99 –	Other carbon–carbon lyases
4. 2. –	Carbon–oxygen lyases
4. 2. 1 –	Hydro-lyases
4. 2. 2 –	Acting on polysaccharides
4. 2.99 –	Other carbon–oxygen lyases
4. 3. –	Carbon–nitrogen lyases
4. 3. 1 –	Ammonia-lyases
4. 3. 2 –	Amidine-lyases
4. 3. 3 –	Amine-lyases
4. 3.99 –	Other carbon–nitrogen-lyases
4. 4. –	Carbon–sulfur lyases
4. 5. –	Carbon–halide lyases
4. 6. –	Phosphorus-oxygen lyases
4.99. –	Other lyases

Class 5. –. –. – Isomerases

These enzymes catalyse geometric or structural changes within one molecule. According to the type of isomerism involved they may be called *racemases*, *epimerases*, *cis–trans-isomerases*, *isomerases*, *tautomerases*, *mutases* or *cycloisomerases*. The second number denotes the type of isomerism involved, and the third number the type of substrate. In some cases, the reaction involves an intermolecular oxidoreduction, but since the donor and acceptor groups are in the same molecule they are classified as isomerases rather than oxidoreductases, even though they may contain firmly bound NAD or NADP.

Table 5 summarizes the structure of Class 5.

Example:

EC 5.1.99.4

Recommended name: α -methylacyl-CoA racemase

Enzyme Classification and Nomenclature

Table 5 Class 5. —.— Isomerases

- 5. 1. —.— Racemases and epimerases
 - 5. 1. 1. — Acting on amino acids and derivatives
 - 5. 1. 2. — Acting on hydroxy acids and derivatives
 - 5. 1. 3. — Acting on carbohydrates and derivatives
 - 5. 1.99. — Acting on other compounds
- 5. 2. —.— *cis-trans*-Isomerases
- 5. 3. —.— Intramolecular oxidoreductases
 - 5. 3. 1. — Interconverting aldoses and ketoses
 - 5. 3. 2. — Interconverting keto- and enol-groups
 - 5. 3. 3. — Transposing C=C bonds
 - 5. 3. 4. — Transposing S-S bonds
 - 5. 3.99. — Other intramolecular oxidoreductases
- 5. 4. —.— Intramolecular transferases (mutases)
 - 5. 4. 1. — Transferring acyl groups
 - 5. 4. 2. — Phosphotransferases (phosphomutases)
 - 5. 4. 3. — Transferring amino groups
 - 5. 4.99. — Transferring other groups
- 5. 5. —.— Intramolecular lyases
- 5.99. —.— Other isomerases

Reaction: (2*S*)-2-methylacyl-CoA = (2*R*)-2-methylacyl-CoA

Systematic name: 2-methylacyl-CoA 2-epimerase

Comments: α -methyl-branched acyl-CoA derivatives with chain lengths of more than C₁₀ are substrates. Also active towards some aromatic compounds (e.g. ibuprofen) and bile acid intermediates, such as trihydroxycoprostanoyl-CoA. Not active towards free acids

Class 6. —.— Ligases

These enzymes catalyse the joining together (ligating) of two molecules with the concomitant hydrolysis of a diphosphate bond in ATP or a similar triphosphate. The systematic enzyme name takes the form *A:B ligase (XDP- or XMP-forming)*. The recommended name often takes the form *A-B ligase*. Sometimes the name *synthase* is used for the recommended name to emphasize the synthetic nature of the reaction, which can also be helpful if the reaction is complex. The name *synthetase* is also sometimes used instead of *synthase* in the names of enzymes in this class.

The second figure in the code number indicates the bond formed: 6.1 for C—O bonds (enzymes acylating tRNA), 6.2 for C—S bonds (acyl-CoA derivatives), etc. Sub-subclasses are only in use in the C—N ligases (6.3), which include the amide synthases (6.3.1), the peptide synthases (6.3.2), enzymes forming heterocyclic rings (6.3.3), etc.

Table 6 summarizes the structure of Class 6.

Example

EC 6.2.1.33

Recommended name: 4-chlorobenzoate-CoA ligase

Reaction: 4-chlorobenzoate + CoA + ATP = 4-chlorobenzoyl-CoA + AMP + diphosphate

Systematic name: 4-chlorobenzoate : CoA ligase

Comments: Requires Mg²⁺. This enzyme is part of the bacterial 2,4-dichlorobenzoate degradation pathway.

Limitations and Problems

Isoenzymes may not be easily accommodated in any system of classification simply in terms of reaction catalysed. For example, there are about 20 different isoenzymes of alcohol dehydrogenase in human liver. These have been organized into broad classes in terms of their electrophoretic mobilities and, more precisely, in terms of their sequences and genetic origin. These classes show very different chain-length specificities for primary aliphatic alcohols and also different inhibitor specificities. However, since they all oxidize primary alcohols and have a strong preference towards NAD as the coenzyme, they are all grouped together under the general heading of EC 1.1.1.1. Furthermore, problems also arise from species differences; for example, class EC 1.1.1.1 includes NAD-dependent alcohol dehydrogenases from all species, although the mammalian liver and yeast enzymes, for example, are profoundly different in structure and behaviour. Only when isoenzymes have very different substrate specificities might classification by function provide the whole solution. For example, liver glucokinase is now recognized to be a member of the hexokinase family of isoenzymes (hexokinase type IV) and is classified as a hexokinase (EC 2.7.1.1), whereas the name glucokinase

Table 6 Class 6. —.— Ligases

- 6. 1. —.— Forming carbon—oxygen bonds
 - 6. 1. 1. — Ligases forming aminoacyl-tRNA and related compounds
- 6. 2. —.— Forming carbon—sulfur bonds
 - 6. 2. 1. — Acid—thiol ligases
- 6. 3. —.— Forming carbon—nitrogen bonds
 - 6. 3. 1. — Acid—ammonia (or amine) ligases (amide synthases)
 - 6. 3. 2. — Acid—amino-acid ligases (peptide synthases)
 - 6. 3. 3. — Cyclo-ligases
 - 6. 3. 4. — Other carbon—nitrogen ligases
 - 6. 3. 5. — Carbon—nitrogen ligases with glutamine as amido-*N*-donor
- 6. 4. —.— Forming carbon—carbon bonds
- 6. 5. —.— Forming phosphoric ester bonds

(EC 2.7.1.2) is specifically recommended for the enzyme from invertebrates and microorganisms that has a high specificity for glucose. In other cases, this problem is being addressed by linking the electronic form of the enzyme list to other appropriate databases, based on structural considerations.

Information and Updates

New enzymes and new functions of existing enzymes are being discovered at a rapid pace and work on revising and expanding the list of enzymes is a continuing operation. Suggestions for enzymes that should be included, or for revisions and corrections to existing entries can be submitted electronically using forms available through the IUBMB Nomenclature Committee Enzyme Nomenclature or SWISSPROT ENZYME home pages. Alternatively, material for all enzyme classes except the peptidases (Class 3.4. —) can be sent by e-mail or regular mail to Dr Sinead Boyce (Department of Biochemistry, Trinity College, Dublin 2, Ireland; E-mail: sboyce@tcd.ie). Material relating to the peptidases should be sent to Dr Alan J. Barrett (Peptidase Laboratory, Department of Immunology, Babraham Institute, Babraham CB2 4AT, UK; E-mail: alan.barrett@bbsrc.ac.uk). After these have been checked and considered by the Nomenclature Committee as a whole, they are incorporated into the *Enzyme Nomenclature* database, which is being prepared for on-line circulation.

Further Reading

- Alberty RA, Cornish-Bowden A, Gibson QH *et al.* (1996) Recommendations for nomenclature and tables in biochemical thermodynamics. *European Journal of Biochemistry* **240**: 1–14.
- Dixon M and Webb EC (1958) *Enzymes*, pp. 183–227. London: Longmans Green.
- Enzyme Nomenclature* (1992) Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes. New York: Academic Press.
- Enzyme Supplements (1999) Prepared for the NC-IUBMB by Tipton KF and Boyce S. [<http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme/>]
- IUBMB Nomenclature Committee Enzyme Nomenclature. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. [<http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme/>]
- Newsletter (1996) of the IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) and Nomenclature Committee of IUBMB (NC-IUBMB). *Archives of Biochemistry and Biophysics* (1997) **344**: 242–252; *Biochemical Journal* (1997) **327**: 311–319; *Chemistry International* (1997) **19**: 116–119; *European Journal of Biochemistry* (1997) **247**: 733–739; *Glycoconjugate Journal* (1998) **15**: 637–647. Also available on-line at [<http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/newsletter/>]
- Panico R, Richer J-C Powell WH (1994) *A Guide to IUPAC Nomenclature of Organic Compounds*. Oxford: Blackwell Science.
- Peptidases (1998) Prepared for the NC-IUBMB by Barrett AJ, Bond JS, Fiedler F *et al.* [<http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme/EC34/>]
- SWISSPROT ENZYME. Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) Enzyme nomenclature database primarily based on the recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) [<http://www.expasy.ch/enzyme/>]