

Respuesta a Requerimientos

1 Datos del Solicitante

Nombre:	CREATIVE TRIO BIOTECH (BEIJING) CO., LTD.	Dirección Electrónica:	administracion@contextointelectual.com
Dirección:	EAST 1000 METERS, QIANSHAJIAN HAIDIAN DISTRICT	Domicilio/País de constitución:	REPUBLICA POPULAR DE CHINA - ANHUI - ANQING
Identificación: ☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☒ EMPRESA EXTRANJERA ☐ PASAPORTE ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ NIT			
Número: 951724-			

2 Dato de la Creación

Identificación de la Creación	No. de Certificado	Vigencia	No. de Expediente	Tipo Trámite
MÉTODO DE PREPARACIÓN DE NUEVA MEDICINA ANTIBACTERIALDE POLIPÉPTIDO RECOMBINANTE	000000		13208481	PCT-PATENTE DE INVENCION CAPITULOS I Y II

3	Texto de la Comunicación	Respuesta a requerimiento oficio 13944
4	Anexos	
☒ Anexos		

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

RE: Solicitud Patente de Invención No. **13-208481**

Solicitante **CREATIVE TRIO BIOTECM (BEIJING) CO., LTD**

Oficio **13944**

Yo, **ANDRES MARQUEZ ACOSTA**, identificado como aparece al pie de mi firma, con domicilio en la Calle 11B No. 41-53, Medellín, Antioquia, obrando como apoderado de la sociedad **CREATIVE TRIO BIOTECM (BEIJING) CO., LTD**, domiciliada en Beijín, China, solicitante de la patente en cuestión, en respuesta al oficio No. 13944 notificado por fijación en lista el 01 de diciembre de 2015, me permito manifestar:

1. Modificaciones a la solicitud

En primer lugar y considerando las disposiciones del artículo 34 de la Decisión 486, que faculta al solicitante a modificar la solicitud de patente en cualquier momento del trámite, me permito adjuntar a este memorial un nuevo capítulo reivindicatorio en el cual se realizaron las siguientes modificaciones:

- Se modificó el paso (a) del método de la reivindicación 1, para precisar que la cepa de *Escherichia coli* es una cepa de *Escherichia coli* BL-21 que contiene un plásmido recombinante of pBHC-SA1, pBHC-SA2, pBHC-SA3, pBHC-SA4, pBHC-SE o pBHC-PA.
- Se incluyó en la reivindicación 1, un paso (b) que consiste en “*Pretratar dicha cepa de Escherichia coli*” del paso (a) antes de cultivarla a gran escala.
- Se modificó el preámbulo de la reivindicación 2 para indicar que la etapa de pretratamiento de dicha cepa de *Escherichia coli* se refiere a:
 - Descongelar la cepa a 4°C y recuperarla durante toda la noche en un medio líquido LB que contiene 50 µg/ml de AMP a 220 rpm, 37°C, y luego, esparcirlo sobre el medio sólido LB para cultivar colonias individuales;
 - Recoger la colonia individual y cultivarla en 1.5 ml de medio líquido LB a 220 rpm, 37°C por 5-8 horas, y luego, transferirla a 100 ml de medio líquido LB y cultivarla a 220 rpm, 37°C por 5-8 horas;

en donde la composición y la proporción masa-volumen de dicho medio LB son cloruro de sodio 1%, peptona 1%, extracto de levadura 0.5%, agar 0.8-1%, y el resto de agua.

Con relación a las modificaciones anteriormente mencionadas, el solicitante manifiesta que las mismas no amplían de ninguna manera la materia objeto de la solicitud en estudio y que ellas se realizaron con el fin de superar las objeciones de claridad y unidad de invención planteadas por el examinador en el oficio para el cual se está presentando respuesta.

2. Cumplimiento de los requisitos de patentabilidad

a. Claridad de las reivindicaciones

Con relación a los requisitos de claridad de las reivindicaciones de la solicitud definidos en el artículo 30 de la Decisión 486, me permito indicar que mediante las modificaciones realizadas en el capítulo reivindicatorio quedan subsanadas la totalidad de las objeciones planteadas por el examinador en el oficio 13944.

Específicamente, la reivindicación 1 ahora es clara puesto que se ha precisado en la etapa (a) que *Escherichia coli* es una cepa de *Escherichia coli* BL-21 que contiene un plásmido recombinante de pBHC-SA1, pBHC-SA2, pBHC-SA3, pBHC-SA4, pBHC-SE o pBHC-PA.

Esta modificación tiene soporte en el primer párrafo de la página 16, relativo a la preparación de los plásmidos mutantes recombinantes, donde la presente solicitud es clara en establecer que los plásmidos incluidos en la nueva reivindicación 1 son los plásmidos que tienen la secuencia de nucleótidos que codifica los polipéptidos que se desean producir y se establece que dichos plásmidos son preparados de acuerdo al método del ejemplo 1 de la descripción de la solicitud de patente CN200910157564.5, titulada *“Un nuevo antibiótico y secuencia de nucleótidos, método de preparación y su aplicación”*.

Habiendo realizado esta aclaración es evidente que el objeto de la solicitud **no es ni las secuencias de los polipéptidos, ni las secuencias de nucleótidos que codifican dichos polipéptidos, ni los plásmidos en cuestión, sino el método para preparar de un nuevo medicamento de polipéptido recombinante antibacterial**. Por lo tanto, el especificar las secuencias de nucleótidos de los plásmidos ya mencionados no es

pertinente, pues dichas secuencias no son una característica esencial de la invención, no es lo que reclama el solicitante y su mención explícita no es relevante para la comprensión de la presente solicitud.

En relación con la falta de claridad del antiguo paso (b), respetuosamente discrepamos con la posición del examinador, pues en la reivindicación 1 se define de forma explícita que el medio de producción líquido comprende, en % de peso/volumen, fosfato disodio hidrogenado 0.68%, fosfato de potasio dihidrógeno 0.3%, cloruro de amonio 0.1%, cloruro de calcio 0.001%, sulfato de magnesio 0.02%, peptona 2.5%, polvo de extracto de levadura 0.75%, glucosa 0.2%, cloruro de sodio 0.6% y el resto de agua, y se indica que dicho cultivo a gran escala consiste de tres etapas, con parámetros de trabajo de 220 rpm, 37°C, y de 3-8 horas en todas las diferentes etapas. Como el examinador podrá verificar, el objeto de la invención es un método y la información anterior, que es copia del contenido de la actual reivindicación 1, permite establecer los parámetros en que debe efectuarse el paso de cultivo a gran escala.

De igual manera, la reivindicación 1 es clara en indicar que la inducción de la expresión del péptido recombinante, es decir el antiguo paso (c), se refiere a tratar el líquido de cultivo del antiguo paso (c) así: tasa de agitación de 220 rpm, oxígeno máximo, 30°C, 2-4 horas; 42°C, 0.5 horas; y 37°C, 1-2 horas, con la adición de IPTQ a una concentración final de 0.5 mM a 42°C. Con todo respeto, esta información es clara y reproducible para una persona versada en la materia. Siendo así, el solicitante no comprende qué parte de esta etapa no es compresible.

Adicionalmente se objeta la claridad de la reivindicación 1 porque *“el método se refiere a un péptido antibacterial específico, este debe referenciarse por su estructura en las reivindicaciones que lo mencionen, dicha estructura comprende su secuencia completa de aminoácidos (SEQ ID NO).”*

Respetuosamente se hace énfasis en que el objeto de la invención **no es el nuevo polipéptido**, como al parecer se interpretó, el objeto es **un método**, como claramente se indica en el preámbulo, para producir un polipéptido recombinante el cual tiene actividad antibacterial. Dado que **el polipéptido no es novedoso**, pues incluso así se afirma en el primer párrafo de la página 10 de la presente solicitud, donde se indica *“En cuanto a la producción de dicho antibiótico recombinante, la solicitud anterior (Título de solicitud de Patente: Un nuevo antibiótico y secuencia de nucleótido, método de preparación y aplicación del mismo, Solicitud No CN200910157564.5) divulga, en el ejemplo 1 de la descripción, un método de preparación integral de dicho péptido antibacterial, en donde el método de cultivo de rutina se llevó a cabo durante los pasos de expresión de la proteína*

recombinante inducida por la bacteria enriquecida después que se obtuvo un plásmido recombinante y se transformó en células competentes...”, la mención de la secuencia de nucleótidos dentro del contexto de los pasos o etapas del método reivindicado resulta innecesaria, pues la esencia de la invención está en las etapas del proceso, el medio de cultivo y las condiciones en que se adelantan dichas etapas, no en la secuencia del polipéptido que se intenta producir.

Así las cosas, el método reivindicado se ajusta a las disposiciones del artículo 30 de la Decisión 486 y a los lineamientos del numeral 2.6.3.2 de la Guía Para Examen De Solicitudes De Patente De Invención y Modelo De Utilidad publicada por esa Superintendencia, que establece *“Las reivindicaciones de procedimiento son las que se refieren a actividades ordenadas por una serie de pasos de manera determinada. Por ejemplo: un proceso de síntesis, un método para fabricar un aparato, etc.”*

En el caso que nos ocupa, el objeto reivindicado es un método, y este está perfectamente definido en función de la serie de pasos que se deben generar y las condiciones en que ellos se deben adelantar para lograr producir de forma eficiente y rentable un polipéptido recombinante con propiedades antibacteriales. Siendo así, no es posible, como en reiteradas ocasiones lo ha afirmado ese Despacho, definir un método en función de la secuencia de nucleótidos de la proteína que se va a producir, es decir, el método en función del producto.

Con relación a la reivindicación 2, en procura de superar la objeción del examinador que afirma que dicha reivindicación no es clara ya que se refiere a un paso previo del método de la reivindicación 1, el solicitante presenta un nuevo capítulo reivindicatorio donde ha incluido una etapa (b) correspondiente al paso de *“Pretratar dicha cepa de Escherichia coli”*, los pasos restantes han sido reenumerados y se ha modificado la reivindicación 2 para indicar en el preámbulo que dicho paso de pretratamiento consiste en la serie de sub-pasos y condiciones que allí se definen.

De esta manera, queda en claro que la característica definida en la reivindicación 2 no es esencial para el método en de la reivindicación 1. La reivindicación 1 se refiere a un método que comprende los pasos a), b) y c), originales. Los pasos listados en la reivindicación 1 son justo los pasos relacionados con algunos de los principales mejoramientos hechos por los inventores. Estos mejoramientos son suficientes para hacer que el método de la reivindicación 1 sea diferente de los métodos conocidos en el estado del arte. La reivindicación 2 se refiere justo a una solución opcional relacionada a un mejoramiento adicional hecho al método de la reivindicación 1.

b. Descripción

Según se afirma en la acción oficial, la descripción no es clara porque la información que contiene no permite que la persona del oficio normalmente versada en la materia pueda comprender el problema técnico y la solución aportada por la invención, ya que no se evidencia una definición estructural del péptido de interés generado por el péptido reclamado por la solicitante, así como tampoco la hay para los plásmidos recombinantes que se emplean en dicho método para llegar al péptido objeto del mismo.

Se requiere al solicitante hacer las aclaraciones necesarias.

Con todo respeto, esta objeción deja en evidencia que la invención divulgada en la presente solicitud ha sido mal interpretada. En primer lugar, se hace énfasis en que **el único objeto de la invención es el método** para producir un polipéptido, pues así lo indican las reivindicaciones, la invención no está dirigida ni al polipéptido, ni a los plásmidos, pues los polipéptidos y los plásmidos fueron divulgados en CN200910157564.5.

Tan claro es este hecho, que en el ejemplo 1 de la presente solicitud se indica como primer paso que los plásmidos que se introducen en la bacteria *Escherichia coli* se preparan conforme al ejemplo 1 de la solicitud CN200910157564.5. Esta información deja en evidencia que el objeto de la invención no es ni los polipéptidos ni los plásmidos, el objeto de la invención es el método para producir los polipéptidos a partir de una bacteria *Escherichia coli* transformada con los plásmidos antes mencionados.

Cuando una persona versada en la materia lee la descripción de la presente solicitud, ella o el será y es capaz de conseguir la solicitud CN200910157564.5 y puede saber que los plásmidos mutantes recombinantes pBHC-SA1, pBHC-SA2, pBHC-SA3, pBHC-SA4, pBHC-SE o pBHC-PA son específicos para 6 clases de polipéptido. El o ellas pueden saber sobre la secuencia de amino ácido de este polipéptido. Por tanto, la descripción es clara.

Habiendo aclarado este punto, el solicitante dirige la atención del examinador al último párrafo de la página 10, donde se reconoce que la solicitud N° CN200910157564.5 divulga, el polipéptido y un método de preparación integral de dicho péptido antibacterial, en donde el método de cultivo de rutina se llevó a cabo durante los pasos de expresión de

la proteína recombinante inducida por la bacteria enriquecida, después que se obtuvo un plásmido recombinante y se transformó en células competentes. De acuerdo a las líneas finales de dicho párrafo, el problema técnico que se pretende superar mediante la presente invención es que *“El costo del proceso de preparación de dicha solicitud de patente es muy alto para ser utilizado y también muy difícil para obtener varios productos de expresión de proteína recombinante de alta pureza”*. Por lo tanto, reescribiendo el problema, para hacer aún más claro, la presente solicitud tiene por finalidad **proporciona un método para producir dicho polipéptido en forma eficiente, a menor costo y con alto grado de pureza.**

c. **Nivel inventivo**

Con relación al cumplimiento del requisito de nivel inventivo, el examinador indicó que la antigua reivindicación 1 de la presente solicitud carece de dicho requisito a la luz de los documentos D1 (EP1609867) y D2 (CN101914603), puesto que el documento D1 divulga un nuevo antibiótico que corresponde a un péptido alostérico de colicina y un péptido de feromona de *Straphylococcus* y sus secuencias de nucleótidos relacionadas, así como su método de preparación (Pág. 1, resumen) y el documento D2 divulga un método de fermentación para la producción de una proteína recombinante por medio de un transportador pMFH inducido por lactosa, en dicha invención la expresión se alcanza satisfactoriamente al reemplazar el IPTG por lactosa como agente inductor en un medio de cultivo de fermentación optimizada (Pág. 1, Resumen).

En primer, el solicitante ha enmendado la reivindicación 1 y ha adicionado una limitación. Ahora, el método de la reivindicación 1 se refiere a un método para producir un polipéptido recombinante antibacterial expresado por un plásmido recombinante seleccionado de pBHC-SA1, pBHC-SA2, pBHC-SA3, pBHC-SA4, pBHC-SE or pBHC-PA.

El ejemplo 2 muestra que la pureza del polipéptido preparado por el método de la presente invención es significativamente mejor. Sumado a lo anterior, los resultados del ejemplo 3 muestra que: “la escala de producción se aumentó de un matraz de agitación (8,4L), a un fermentador de 42L (25L), hasta el fermentador final 200L (100L), sin embargo, la productividad no se influenció, como se muestra en la figura 3. Así, esto establece la base para la producción a gran escala e industrial del polipéptido antibacterial.”

Considerando la información anterior, se puede llegar a la conclusión que el problema técnico solucionado mediante la presente invención es mejorar la pureza del polipéptido expresado por los plásmidos pBHC-SA1, pBHC-SA2, pBHC-SA3, pBHC-SA4, pBHC-SE or pBHC-PA, y aumentar la producción a gran escala.

D1 no divulga el método de la nueva reivindicación 1, y no puede solucionar el problema del estado de la técnica mencionado anteriormente, puesto que D1 se refiere a nucleótidos y vectores de expresión que codifican para una tioredoxina y para una hemoglobina.

Como una persona versada en la materia sabe, **no existe ninguna relación entre las proteínas tioredoxina o la hemoglobina**, a la que se refiere D1, y los polipéptidos antibacteriales de la presente invención, que como se indica en la página 5 de la presente solicitud, se refiere a **péptidos derivados de colicina, donde la colicina se fusiona con miméticos de anticuerpos** contra los antígenos de la bacteria patogénica **y una feromona antibiótica de amplio espectro**.

Siendo así, no existe ninguna razón para que una persona versada en la materia, enfrentada al problema de mejorar la producción de los péptido reportados en CN200910157564.5, considerara que, entre toda la información existente en el estado de la técnica, debería emplear como punto de partida la información de D1, que busca la producción de otro tipo de proteínas, para optimizar la expresión a gran escala de **péptidos de colicina fusionados con miméticos de anticuerpos y una feromona antibiótica de amplio espectro**.

Respetuosamente, el considerar la información de D1 como base para solucionar el problema planteado en la presente solicitud es una clara evidencia de que el análisis efectuado es un análisis retrospectivo, donde el examinador parte de la información aquí divulgada y pretende extraer información de un contexto que no tiene ninguna relación con el problema a solucionar, para indicar que existía información que podría haber llevado a que la invención sea obvia.

En este sentido, respetuosamente recordamos a ese Despacho que **el análisis de las anterioridades debe hacerse dentro del contexto del documento en que se encuentra la información y debe evitarse la realización de análisis de patentabilidad retrospectivo**, pues éste resulta contrario a lo establecido por las buenas prácticas de las oficinas de patente y a los lineamientos de la "GUÍA PARA EXAMEN DE SOLICITUDES

DE PATENTE DE INVENCION Y MODELO DE UTILIDAD”¹ emitida por la Superintendencia de Industria y Comercio, señala sobre este tema que *“Es importante tener en cuenta que una invención reivindicada que, a primera vista, parece evidente, puede ser inventiva. Una vez formulada una nueva idea, a menudo se puede **demonstrar teóricamente el modo en el que se podría llegar a ella**, a partir de algo conocido, a través de una serie de etapas aparentemente fáciles. El examinador de patentes debe **evitar el uso de un análisis ex post facto** de este tipo.*

*“Es decir, el estado de la técnica se debe examinar **sin el beneficio del conocimiento ofrecido retrospectivamente por la invención reivindicada**. La indicación o la sugerencia que permita llegar a la invención reivindicada **deben proceder del estado de la técnica o de los conocimientos generales** de la persona del oficio normalmente versada en la materia, y no basarse en la divulgación del solicitante.*

“Uno de los factores que deben tomarse en consideración para establecer si la persona del oficio normalmente versada en la materia hubiera estado motivada a combinar los documentos del estado de la técnica es la probabilidad razonable de éxito como resultado de tal combinación de sugerencias del estado de la técnica, consideradas colectivamente.

“En cualquier caso, el examinador de patentes deberá esforzarse por hacer una evaluación práctica conforme a la realidad. Deberá tener en cuenta todo lo que se sabe en cuanto a los antecedentes de la invención reivindicada y dar el valor justo a los argumentos o pruebas pertinentes presentados por el solicitante.” (El resaltado es nuestro)

En el caso que nos ocupa, D1 no ofrece ninguna enseñanza sobre cómo mejorar la producción de **péptidos de colicina fusionados con miméticos de anticuerpos y una feromona antibiótica de amplio espectro**. D1 se limita medios y condiciones de cultivo para producir **tiorredoxina o la hemoglobina**. Siendo así, no es posible afirmar que era obvio que para producir unas proteínas completamente distintas a las que se reportan en D1, se debía utilizar el método divulgado en D1, pero con unas fuentes de nitrógeno diferentes, como son la peptona y el extracto de levadura, se debía reducir la velocidad de agitación y se debía inducir la expresión no solo adicionando IPTG, **sino aumentando al máximo el oxígeno y reduciendo la temperatura a 30°C, luego adicionar IPTG aumentando la temperatura a 42°C por media hora, y seguido, reducir la**

¹ Guía para Examen de Solicitudes de Patentes de Invención y Modelo de utilidad. Superintendencia de Industria y Comercio. 2012. Sección 2.13.6.3. Páginas 137 y 138. Relativo al *Análisis ex post facto o retrospectivo o hindsight* (disponible electrónicamente en http://api.sic.gov.co/Documentos/Guia_Examen_Patentes.pdf)

temperatura a 37°C. Ni la cantidad de oxígeno ni los cambios de temperatura durante el proceso de inducción fueron revelados en D1.

En este orden de ideas, la pregunta que deberíamos hacernos es ¿por qué razón, una persona enfrentada al problema de optimizar la producción a gran escala de péptidos de colicina fusionados con miméticos de anticuerpos y una feromona antibiótica de amplio espectro, habría partido de la información de un documento que hace alusión a un par de proteínas absolutamente distintas y habría variado la cantidad de oxígeno y la temperatura durante la etapa de inducción? La respuesta es sólo una, **se efectuó un análisis retrospectivo, donde a partir de la información suministrada en la presente solicitud se intenta demostrar que teóricamente se podría llegar a la invención aquí reivindicada.**

Por su parte, D2 se refiere a un método de fermentación para proteínas recombinantes absolutamente distintas, como son las MFH y sus enseñanzas alejan a cualquier persona versada en la materia de adicionar IPTG a un método para producir proteínas a gran escala, pues dicho documento señala que la **lactosa induce pMFH y que se debe reemplazar IPTG por lactosa.** Esto es una forma diferente para expresar una proteína recombinante, y no soluciona los problemas del estado de la técnica que resuelve la presente invención.

Sumado a lo anterior, D2 tampoco enseña ni sugiere que para la inducción de péptidos recombinantes derivados de **colicina o de feromonas antibiótica de amplio espectro** se deba aumentar la cantidad de oxígeno y modificar la temperatura, reduciéndola a 30°C, luego, durante la adición de IPTG debe aumentarse a 42°C y seguido, estabilizarla en 37°C.

Siendo así, una persona versada en la materia consideraría que D2 no se dirigía a solucionar el problema que aquí se plantea y no ofrece ninguna luz para resolverlo, pues justo sus enseñanzas llevarían a la persona versada en la materia a proponer un método de inducción de expresión basado en lactosa en lugar de IPTG, como es el método que aquí se reclama.

En conclusión, ni la información de D1, ni la información de D2, ni la información combinada de estos documentos llevaría a una persona versada en la materia a establecer los pasos, medios y condiciones en los cuales deberían cultivarse las bacterias transformadas con los plásmidos pBHC-SA1, pBHC-SA2, pBHC-SA3, pBHC-SA4, pBHC-SE or pBHC-PA para hacer eficiente el proceso de producción a gran escala de péptidos

recombinantes derivados de **colicina o de feromonas antibiótica de amplio espectro**. Como aquí se ha expuesto, D1 y D2 están dirigidas a solucionar problemas técnicos distintos, su contexto técnico es otro y no ofrecen ninguna ayuda para solucionar el problema técnico que aquí se plantea.

Así las cosas, me permito establecer que, gracias a las modificaciones realizadas y los argumentos expuestos anteriormente, las dos (2) reivindicaciones que hacen parte del capítulo reivindicatorio adjunto cumplen cabalmente con los requisitos de claridad, unidad de invención, novedad y nivel inventivo.

Por lo tanto, solicito a ese despacho reconocer estos requisitos y conceder el privilegio de patente de modelo de utilidad a la solicitud de mi mandante.

Señor Superintendente,

Cordialmente,



ANDRÉS MÁRQUEZ ACOSTA
C.C. No 71.666.347 de Medellín
T.P. No 156.659 del C.S. de la J.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la preparación de un polipéptido recombinante antibacterial, caracterizado porque comprende los pasos de:

(a) preparar una cepa de *Escherichia coli* que comprende un plásmido recombinante y congelar para conservación, donde dicha *Escherichia coli* se refiere a *Escherichia coli* BL-21 que contiene un plásmido recombinante seleccionado de pBHC-SA1, pBHC-SA2, pBHC-SA3, pBHC-SA4, pBHC-SE o pBHC-PA,

(b) Pretratar dicha cepa de *Escherichia coli*;

(c) cultivar a gran escala en un medio de producción líquido, e

(d) inducir la expresión y purificación del péptido antibacterial recombinante;

en donde el medio de producción líquido comprende, en % de peso/volumen, fosfato

disodio hidrogenado 0.68%, fosfato de potasio dihidrógeno 0.3%, cloruro de amonio 0.1%, cloruro de calcio 0.001%, sulfato de magnesio 0.02%, peptona 2.5%, polvo de extracto de levadura 0.75%, glucosa 0.2%, cloruro de sodio 0.6% y el resto de agua,

en donde dicho cultivo a gran escala consiste de tres etapas, con parámetros de trabajo de 220 rpm, 37°C, y de 3-8 horas en todas las diferentes etapas,

en donde dicha inducción de la expresión del péptido recombinante se refiere a tratar el líquido de cultivo del paso (c) así: tasa de agitación de 220 rpm, oxígeno máximo, 30°C, 2-4 horas; 42°C, 0.5 horas; y 37°C, 1-2 horas, con la adición de IPTQ a una concentración final de 0.5 mM a 42°C.

2. El método de preparación de la reivindicación 1, caracterizado porque el pretratamiento de dicha cepa de *Escherichia coli* se refiere a:

(1) Descongelar la cepa a 4°C y recuperarla durante toda la noche en un medio líquido LB que contiene 50 µg/ml de AMP a 220 rpm, 37°C, y luego, esparcirlo sobre el medio sólido LB para cultivar colonias individuales;

(2) Recoger la colonia individual y cultivarla en 1.5 ml de medio líquido LB a 220 rpm, 37°C por 5-8 horas, y luego, transferirla a 100 ml de medio líquido LB y cultivarla a 220 rpm, 37°C por 5-8 horas;

en donde la composición y la proporción masa-volumen de dicho medio LB son cloruro de sodio 1%, peptona 1%, extracto de levadura 0.5%, agar 0.8-1%, y el resto de agua.