

HUMBERTO RUBIO & CIA.

ABOGADOS

Cra. 7 # 74 – 64 Oficina 506
Tel: (571) 3132408 – 3132423 - 3132410 - 3131759
Fax: (571) 3131647 - 3132367
E-mail: mail@rubiolawyers.com
Apartado Aéreo 21848
Bogota, D.C. -Colombia

Doctor

JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ

Jefe División de Nuevas Creaciones (C)

Superintendencia de Industria y Comercio

E. S. D.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-125171- -00007-0000

Fecha: 2012-10-08 14:28:04 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 13

REF: Expediente No. **08-125171**
Patente de Invención: **"PRODUCCION DE ISOPRENOIDES"**
PCT: **PCT/US2007/069807**
Clasificación Int.: **C12P7/04**
Titular: **AMYRIS INC.**

RESPUESTA A REQUERIMIENTO SEGÚN OFICIO No. 12550 NOTIFICADO POR FIJACION EN LISTA DE 18 DE JULIO DE 2012

HUMBERTO RUBIO CAMACHO, mayor de edad, domiciliado en Bogotá, D.C., identificado con la cédula de ciudadanía número 17'192.062 de Bogotá, abogado graduado portador de la Tarjeta Profesional No. 50.007 expedida por el Consejo Superior de la Judicatura, actuando en carácter de **Apoderado** de **AMYRIS INC.**, domiciliada en 5885 Hollis St., Ste 100, Emeryville, California 94608, Estados Unidos de America, debidamente reconocido por su Despacho, encontrándome dentro de la debida oportunidad procesal para dar respuesta al auto proferido por su Despacho, mediante Oficio No.12550 notificado por fijación en lista de 18 de julio de 2012, me permito:

Manifestar:

1.- En el informe emitido sobre la presente solicitud, se han formulado las observaciones que a continuación resumimos:

a. De la solicitud de Patente:

Reivindicaciones

- El método de la reivindicación 1 no es claro por que no especifica el tipo de células huésped utilizadas, el solicitante debe proporcionar su respectivo número de depósito. Por otra parte el solicitante no especifica cuál es la ruta enzimática usada para la producción de isoprenil pirofosfato, ni si dicha ruta es insertada en la célula huésped es natural de la misma. Por otra parte el solicitante debe suministrar las condiciones del cultivo del numeral b, ya que la

caracterización proporcionada corresponde a un resultado a alcanzar “velocidad de crecimiento”.

- La reivindicación 14 no es clara porque se reclama ácidos nucleicos pero los nombra como proteínas. El solicitante debe suministrar la secuencia nucleotida exacta a la que se refiere, y adjunta un listado anexo con su respectivo SEQ ID NO, el mismo proceso debe hacerse para la reivindicación 15.
- La reivindicación 16 debe modificarse, debe proporcionarse las condiciones del cultivo a las que se refiere en rangos estrechos. No se puede caracterizar las condiciones por el resultado a alcanzar. Las mismas observaciones aplican a las reivindicaciones 17 a 19, donde se debe eliminar el término aproximadamente.
- La reivindicación 20 no es clara porque pretende caracterizar el método de producción por la cantidad de fuente de carbono, este tipo de caracterización corresponde a un resultado a alcanzar. Debe especificarse la fuente de carbono y la cantidad de mismo necesaria para que la invención se lleve a cabo. Las mismas sugerencias aplican para las reivindicaciones 21 a 24 que se refieren a fuentes de carbono y las reivindicaciones 25 a 29 que se refieren a nitrógeno.
- Las reivindicaciones 30 y 31 no son claras porque pretenden caracterizar el método por un resultado a alcanzar. La misma observación aplica para las reivindicaciones 32 a 34 que pretenden caracterizar el método por el tiempo requerido para hacer la producción y la reivindicación 35 pretende caracterizar el método por una combinación. Se debe caracterizar el método por la serie de pasos sucesivos necesarios para llevar a cabo la invención.
- El método de la reivindicación 40 no es claro porque no especifica la identidad de la célula huésped, con su respectivo número de depósito, no proporciona la secuencia nucleotida exacta. Debe suministrarse toda esta información para que una persona versada en la materia sea capaz de reproducir la invención.
- Las reivindicaciones 41 y 42 no son claras porque caracteriza la célula huésped por un producto que es capaz de producir u no por sus características esenciales.

b. Determinación del Estado de la Técnica

El Estado de la Técnica se determinó con base en la fecha de presentación de la solicitud de prioridad: 26/Mayo/2006, y se encontró el siguiente documento que anticipa el objeto de esta solicitud:

D1: US 2005266518

Dicho documento divulga un método y ácidos nucleicos para fabricar terpenos en una célula a partir de una secuencia polinucleotida que codifica una enzima en la vía metabólica mevalonato.

c. Examen de Patentabilidad (Art 14 D486)

Novedad

La reivindicación 1 consiste en "Un método para producir un isoprenoide, caracterizado porque comprende: a) obtener una pluralidad de células huésped que comprenden una ruta enzimática para elaborar isopentenil pirofosfato y en donde todas las enzimas de ruta están bajo el control de un regulador transcripcional y cultivar las células huésped en un medio, bajo condiciones que son sub-óptimas..

Las características **esenciales** de la reivindicación 1 habían sido divulgadas previamente en D1, el cual divulga un método para fabricar terpenos en una célula a partir de una secuencia polinucleotida.

Las reivindicaciones 2 a 43 no mencionan alguna característica que haga nueva la reivindicación 1 frente a D1, por lo cual se considera que no son nuevas.

Conclusión

Los requisitos de Patentabilidad de la presente solicitud están afectados por D1

2.- En contestación a las observaciones anteriores, manifestamos lo siguiente:

a. De la solicitud de patente:

Reivindicaciones (Art 30 D 486, Art 22 PCT)

Acompañamos a esta respuesta nuevo capítulo reivindicatorio (1-41). Con el objeto de superar las múltiples objeciones elevadas por el examinador, estamos presentando este nuevo capítulo reivindicatorio, cuyas cláusulas se obtuvieron a partir de las otorgadas en la Patente norteamericana No. 7,659,097 B2 (estamos adjuntando también copia de dicha patente), equivalente a la presente solicitud.

a) Sobre la objeción dirigida al método de la reivindicación 1, nos permitimos señalar que en la nueva reivindicación 1 que se presenta, las células huésped han sido especificadas

como bacterianas o fúngicas. Asimismo, la ruta enzimática se ha delimitado a la ruta de mevalonato y las condiciones del medio se están describiendo ahora. Dichas modificaciones están debidamente soportadas en el capítulo descriptivo originalmente presentado, ver, por ejemplo página 80, línea 15-página 81, línea 13.

Por otra parte, sobre el requerimiento del examinador en el sentido de indicar la secuencia nucleotídica y/o el número de depósito correspondiente, estamos en desacuerdo con especificar dichos datos en virtud de que las secuencias nucleotídicas empleadas para la expresión de las diferentes enzimas que codifican para un plásmido de la ruta de mevalonato son públicas y están disponibles de Gen Bank (ver, ejemplo 4). Asimismo, las secuencias de primers y operones empleados en los métodos de la presente invención se presentaron originalmente como un anexo de la solicitud. En vista de la metodología descrita en los ejemplos, un técnico en la materia sería capaz de llevar a cabo la presente invención.

En relación con la aseveración del examinador referente a que el método está siendo caracterizado por un resultado a alcanzar, a saber, la tasa de crecimiento específica máxima, diferimos de dicha opinión debido a que existe una relación directa entre la cantidad de fuente de carbono y el crecimiento máximo de las células huésped. De acuerdo a la presente invención (página 80, línea 15 – página 81, línea 13 del capítulo descriptivo), *al disminuir la velocidad de alimentación de la fuente de carbono a un microorganismo se puede mejorar la cantidad de isoprenoide producido. En la práctica, la fuente de carbono puede ser suministrada inicialmente en una cantidad suficiente para soportar un crecimiento inicial de las células huésped hasta que dicha fuente de carbono inicial es agotada sustancialmente, después de lo cual, la fuente de carbono es agregada a una velocidad exponencial, pero a una velocidad que es menor que aquella que soportaría la velocidad de crecimiento específica de las células huésped. Por ejemplo, en un método de la presente invención, la fuente de carbono es agregada en una cantidad que soportaría aproximadamente 90%, 80%, 75%, 60%, 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, o menos de la velocidad de crecimiento específica máxima.*

Más aún, la cantidad de la fuente de carbono variará en función del tipo de célula huésped empleada, por lo cual, la manera más clara y precisa de definir esta característica técnica esencial del método es indicando que la fuente de carbono debe estar presente en una cantidad tal que la velocidad de crecimiento máxima se reduzca en un porcentaje determinado (dicho porcentaje se indica en la reivindicación) dado que dicha reducción es proporcional a la producción de isoprenoides. Dicho porcentaje es un parámetro constante independiente del microorganismo que se esté empleando.

Finalmente, de acuerdo a las guías del examinador (4.2) de la Comunidad Andina (Manual para el Examen de Solicitudes de Patentes de Invención en las Oficinas de Propiedad Industrial de los Países de la Comunidad Andina, preparado por la Oficina Internacional de la OMPI), las características funcionales son aceptables si:

- A) El resultado se puede verificar por una prueba descrita en la descripción;
- B) Las cláusulas son claras; y
- C) Un técnico en la materia es capaz de reproducir la invención.

Consideramos que las tres condiciones expuestas anteriormente se cumplen por la reivindicación 1. De tal manera que su actual redacción es clara, por lo cual atentamente solicitamos que la objeción sea retirada.

b) Respecto al término “inducible” que aparece en la nueva reivindicación 2 (correspondiente a la cláusula 4 original), nos permitimos señalar que dicho término describe ciertas características del regulador transcripcional heterólogo que son evidentes para un técnico en la materia, por ejemplo, que dicho regulador permitirá la expresión de un gen después de determinado estímulo, lo cual permite diferenciar a dicho regulador de otros del arte previo, debido a que este tipo de reguladores presentan un mecanismo de acción específico.

Cabe destacar que este es el término empleado en la técnica. Por lo cual, no estimamos pertinente limitar la reivindicación como se solicita puesto que la característica de ser inducible resulta clara para un técnico con conocimientos medios en el arte y también en virtud de la información provista en la página 49, línea 10-página 51, línea 2 del capítulo descriptivo.

El mismo argumento aplica para las nuevas reivindicaciones 3 y 4 (correspondientes a las reivindicaciones 5 y 6 originales).

c) Sobre las nuevas reivindicaciones 6, 8 y 10 (correspondientes a las reivindicaciones 8, 11 y 13 originales), éstas ya especifican el nombre de la célula huésped, por lo cual, dicha objeción ha quedado plenamente superada. En referencia a los números de depósito se debe hacer notar que no es necesario especificar dichos números dado que los microorganismos no son el objeto de la invención y también porque, como se indicó anteriormente, las secuencias son públicas y están disponibles en el portal de Gen Bank.

d) La nueva reivindicación 9 (correspondiente a la reivindicación 12 original) especifica el ácido nucleico heterólogo que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica

para la enzima. La redacción de la nueva reivindicación define claramente el objeto de protección. Por tanto consideramos que la objeción ha quedado superada.

e) La nueva reivindicación 11 (correspondiente a la reivindicación 14 original) comprende el término “enzimas” en lugar de “ácidos nucleicos”, por lo cual, la objeción ha quedado superada. Sobre las secuencias nucleotídicas solicitadas, solicitamos al examinador revisar los argumentos expuestos en los incisos a) y c).

f) Sobre las nuevas reivindicaciones 13 a 16 (correspondientes a las reivindicaciones 16-19 originales), el examinador está requiriendo especificar las condiciones de reacción (nutrientes y temperatura). A este respecto, como se indicó en la página 73, último párrafo-página 74, primer párrafo del capítulo descriptivo, la temperatura a la cual la velocidad de crecimiento específica máxima de una célula huésped puede ser obtenida dependerá del tipo de célula huésped seleccionada. Nuevamente, no es posible definir una cantidad exacta, por lo cual se especifica que dicha temperatura y nutrientes deben estar por debajo de los niveles que proporcionarían la velocidad de crecimiento específica máxima para las células huésped.

g) En relación con las nuevas reivindicaciones 17-21 (correspondientes a las reivindicaciones 22-24 originales), nuevamente por las razones antes expuestas no es posible definir cantidades como el examinador solicita, dado que las condiciones de reacción están en función del microorganismo empleado; por lo cual, la forma más clara para definir los parámetros de nutrientes (carbono, nitrógeno), temperatura, etc., es indicar los porcentajes (nutrientes) o grados (temperatura) que se requieren con respecto a la velocidad de crecimiento máxima de la célula huésped y que permiten obtener la producción de isoprenoides deseada. Ver también argumentos de inciso a).

h) En referencia a la objeción dirigida a las reivindicaciones 23 a 27 (correspondientes a las reivindicaciones 30-34 originales), estamos en desacuerdo con el examinador cuando señala que las cláusulas están dirigidas a un resultado a obtener, dado que estas cláusulas especifican los compuestos isoprenoides que se pueden obtener con el método de la reivindicación 1 pero, de ninguna manera, pretenden caracterizar el método.

i) Las nuevas reivindicaciones 32-41 no tienen equivalentes en las cláusulas presentadas originalmente, pero están orientadas a proveer características adicionales de los compuestos isoprenoides obtenidos, así como de las enzimas empleadas.

j) La materia de las reivindicaciones 40-43 originales no se incorporó en el nuevo capítulo reivindicatorio que se presenta.

En virtud de los argumentos anteriores, consideramos que las objeciones de claridad se encuentran superadas.

b. Examen de Patentabilidad:

El examinador estima que la materia que se divulga en el documento D1 (US2005/266518) es perjudicial para la novedad de la materia que aquí se reclama.

La reivindicación 1 de la presente invención requiere cultivar las células en un medio en donde la fuente de carbono está limitada de tal manera que el medio proporciona 75% o menos de proporción de bacterias u hongo. Dicho método es particularmente útil para incrementar el rendimiento total de isoprenoides producidos por la ruta de mevalonato. Ver ejemplo 12 (Figs. 12A, B), ejemplos 13, 14, 19, 21 y toda la descripción. Al contrario, D1 en ninguna parte ilustra restringir la fuente de carbono en el medio de fermentación a fin de mejorar la producción de isoprenoide.

El objeto de D1 es proveer polinucleotidos que comprenden secuencias de amino ácidos específicas que presentan actividad de HMG-CoA sintasa, que se emplean en la ruta biosintética de los isoprenoides. En otras palabras, aunque D1 está dirigido a incrementar la producción de isoprenoides, la forma en que lo resuelve es diferente de la solución técnica que provee la presente invención, dado que la solución propuesta por D1 es incrementar la expresión de genes que codifican para la ruta de mevalonato y que mejoran la producción de carotenoide en bacterias carotenogénicas o no carotenogénicas.

En relación con lo anterior, D1 no describe ni sugiere cultivar las células bacterianas o fúngicas bajo las condiciones descritas en la reivindicación 1, particularmente en el inciso b): cultivar las células huésped bacterianas o fúngicas en un medio donde la fuente de carbono sea limitada de modo que el medio proporcione el 75 % o menos de la velocidad de crecimiento específica máxima para las células huésped bacterianas o fúngicas, en donde la velocidad de crecimiento específica máxima es una velocidad que se habría logrado cultivando las células huésped bacterianas o fúngicas bajo una temperatura óptima para el crecimiento de las células huésped bacterianas o fúngicas, y en un medio donde los nutrientes se encuentran en exceso.

Se desea destacar también que la reivindicación 1 de la presente invención no se dirige al uso de una fuente de carbono per se en un medio de cultivo. En vez de esto indica una condición de crecimiento específica bajo la cual la fuente de carbono en el medio se limita de manera tal que el medio proporciona 75% o menos de velocidad de crecimiento específica máxima para las células huésped bacterianas o fúngicas.

HUMBERTO RUBIO & CIA.

ABOGADOS

Expediente No. 08-125171

Pagina 8 de 8

Por lo anterior, D1 y la presente invención resuelven el problema técnico por dos medios diferentes, por lo cual, D1 no es perjudicial para la novedad y/o actividad inventiva de la presente invención, cumpliendo así con los requerimientos de patentabilidad de la legislación colombiana.

Habiéndose superado los defectos formales de la solicitud original y demostrado el cumplimiento de los requisitos de patentabilidad por la misma, solicito que, sobre la base de las nuevas reivindicaciones y lo expuesto anteriormemte, se proceda a la concesión de la presente solicitud.

Por tanto, consideramos que la presente solicitud de invención cumple con lo establecido en los artículos 16, 18 y 30 de la Decisión 486, es decir, la solicitud en estudio es una invención novedosa, tiene nivel inventivo y no se deriva de manera evidente del estado de la técnica, es susceptible de aplicación industrial, por tanto cumple con los requisitos establecidos en nuestra legislación para que sea otorgado el privilegio de invención.

Anexar:

- i. Nuevo capítulo Reivindicatorio.

Petición:

Conforme a lo anterior, una vez atendidos los requerimientos y exigencias del examinador y al tener en cuenta el nuevo capítulo descriptivo, reivindicatorio y pliego de figuras, además de lo manifestado anteriormente, solicito muy respetuosamente a su Despacho, continuar el trámite de rigor y de ser el caso se hagan las correspondientes observaciones con el ánimo de hacer lo pertinente dentro del presente trámite.

Atentamente,



HUMBERTO RUBIO CAMACHO

C.C. 17'192.062 de Bogotá

**T.P. 50.007 Consejo Superior
de la Judicatura**

COD. 4134

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un isoprenoide que comprende:

5 (a) la obtención de una pluralidad de células huésped bacterianas o fúngicas que comprenden un ácido nucleico heterólogo que codifica una o más enzimas de una ruta de mevalonato para elaborar isopentenil pirofosfato, en donde la expresión de una o más enzimas está bajo el control de
10 al menos un regulador transcripcional heterólogo, en donde la ruta de mevalonato comprende (i) una enzima que condensa acetoacetil-CoA con acetil-CoA para formar HMG-CoA; (ii) una enzima que convierte HMG-CoA en mevalonato; (iii) una enzima que fosforila mevalonato en mevalonato 5-fosfato;
15 (iv) una enzima que convierte mevalonato 5-fosfato en mevalonato 5-pirofosfato; y (v) una enzima que convierte mevalonato 5-pirofosfato en isopentenil pirofosfato; y

(b) cultivar las células huésped bacterianas o fúngicas en un medio donde la fuente de carbono sea
20 limitada de modo que el medio proporcione el 75 % o menos de la tasa de crecimiento específica máxima para las células huésped bacterianas o fúngicas, en donde la tasa de crecimiento específica máxima es una tasa que se habría logrado cultivando las células huésped bacterianas o
25 fúngicas bajo una temperatura óptima para el crecimiento de las células huésped bacterianas o fúngicas, y en un medio donde los nutrientes se encuentran en exceso.

2. El método según la reivindicación 1, donde el al menos un regulador transcripcional heterólogo es inducible.

30 3. El método según la reivindicación 1, donde las enzimas de la ruta de mevalonato están bajo el control de

un solo regulador transcripcional.

4. El método según la reivindicación 1, donde las enzimas de la ruta de mevalonato están bajo el control de un regulador transcripcional múltiple.

5 5. El método según la reivindicación 1, donde las células huésped comprenden una pluralidad de ácidos nucleicos heterólogos que codifican para todas las enzimas de una ruta de mevalonato.

6. El método según la reivindicación 1, donde las
10 células bacterianas son *E. coli*.

7. El método según la reivindicación 1, donde el ácido nucleico heterólogo comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una enzima de la ruta de mevalonato de un hongo que tiene una ruta de mevalonato
15 endógena.

8. El método según la reivindicación 1, donde las células huésped son *S. cerevisiae*.

9. El método según la reivindicación 1, donde el ácido nucleico heterólogo comprende una secuencia de ácido
20 nucleico que codifica para una enzima de la ruta de mevalonato de una bacteria que tiene una ruta de mevalonato endógena.

10. El método según la reivindicación 9, donde la bacteria es del género seleccionado de entre *Enterococcus*,
25 *Pseudomonas* y *Staphylococcus*.

11. El método según la reivindicación 1, donde el ácido nucleico heterólogo comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una enzima de la ruta de mevalonato seleccionada de acetil-CoA tiolasa, HMG-CoA
30 sintasa, HMG-CoA reductasa, y mevalonato cinasa.

12. El método según la reivindicación 1, donde el

ácido nucleico heterólogo comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para HMG reductasa Clase II.

13. El método según la reivindicación 1, donde las células huésped son cultivadas en el medio donde tanto los nutrientes como la temperatura se mantienen a un nivel por debajo de lo que proporcionaría la tasa de crecimiento específica máxima para las células huésped.

14. El método según la reivindicación 1, donde la temperatura del medio es de al menos 2-20 °C por debajo de la temperatura óptima.

15. El método según la reivindicación 14, donde las células huésped son cultivadas a una temperatura de al menos 5 °C por debajo de la temperatura óptima.

16. El método según la reivindicación 14, donde la temperatura del medio es de al menos 10 °C por debajo de la temperatura óptima.

17. El método según la reivindicación 1, donde el medio proporcionará el 60% o menos de la tasa de crecimiento específica máxima.

18. El método según la reivindicación 1, donde el medio proporcionará el 50% o menos de la tasa de crecimiento específica máxima.

19. El método según la reivindicación 1, donde el medio proporcionará el 40% o menos de la tasa de crecimiento específica máxima.

20. El método según la reivindicación 1, donde el medio proporcionará el 25% o menos de la tasa de crecimiento específica máxima.

21. El método según la reivindicación 1, donde el medio proporcionará el 75%-10% de la tasa de crecimiento específica máxima.

22. El método según la reivindicación 1, donde el medio está restringido de nitrógeno.

23. El método según la reivindicación 1, donde el isoprenoide se produce en una cantidad mayor que 10 gramos
5 por litro de medio.

24. El método según la reivindicación 1, donde el isoprenoide se produce en una cantidad mayor que 50mg por gramo de peso de célula seco.

25. El método de cualquiera de las reivindicaciones 23
10 ó 24, donde la cantidad de isoprenoide se produce en un tiempo menor que 150 horas.

26. El método según la reivindicación 23 ó 24, donde la cantidad de isoprenoide se produce en un tiempo menor que 96 horas.

15 27. El método según la reivindicación 23 ó 24, donde la cantidad de isoprenoide se produce en un tiempo menor que 72 horas.

28. El método según la reivindicación 1, donde el isoprenoide se selecciona a partir del grupo que comprende
20 un hemiterpeno, monoterpeno, diterpeno, triterpeno, tetraterpeno, sesquiterpeno y politerpeno.

29. El método según la reivindicación 1, donde el isoprenoide es un sesquiterpeno.

30. El método según la reivindicación 1, donde el
25 isoprenoide es un isoprenoide C₅-C₂₀.

31. El método según la reivindicación 1, donde el isoprenoide se selecciona a partir del grupo que comprende abietadieno, amorfadieno, careno, α -farneseno, β -farneseno, farnesol, geraniol, geranilgeraniol, isopropeno, linalool, limoneno, mirceno, nerolidol, ocimeno, patchoulol, β -
30 pineno, sabineno, γ -terpineno, terpendeno y valenceno.

32. El método según la reivindicación 1, donde los nutrientes comprenden una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno.

33. El método según la reivindicación 29, donde el
5 sesquiterpeno es α -farneseno.

34. El método según la reivindicación 29, donde el sesquiterpeno es β -farneseno.

35. El método según la reivindicación 29, donde el sesquiterpeno es amorfadieno.

10 36. El método según la reivindicación 29, donde el sesquiterpeno es farnesol.

37. El método según la reivindicación 29, donde el sesquiterpeno es nerolidol.

15 38. El método según la reivindicación 30, donde el sesquiterpeno es patchoulol.

39. El método según la reivindicación 30, donde el sesquiterpeno es valenceno.

40. El método según la reivindicación 1, donde una o más enzimas es una enzima bacteriana.

20 41. El método según la reivindicación 1, donde una o más enzimas es una enzima fúngica.