



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

03 - 105528

21. EXPEDIENTE N° _____

54. TÍTULO "GEN PROMOTOR ESPECIFICO DE LA HOJA DEL CAFE" _____

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C12N 15/82 _____

71. SOLICITANTE SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A. _____

DOMICILIO VEVEY, SUIZA _____

74. REPRESENTANTE LEGAL JOSE ANTONIO LLOREDA
T.P. 10.784
Código 231 _____

22. BOGOTÁ, D.C. 1 DIC 2003 _____

AR

PETITORIO


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



03 105528 00

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 03105528 00000000 Folios: 00
Fecha (AFB): 2003-12-01 16:01:52
Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Procedencia: 0020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

①

SOLICITUD DE:



Patente de Invención



Patente de Modelo de Utilidad



Capítulo I.



Capítulo II.

②

SOLICITANTE
(71)

Nombre: **SOCIETE DES PRODUITS**
NESTLÉ S.A.

Dirección: P.O. Box 353, CH-1800 Vevey
Suiza.

Nacionalidad o Domicilio: Vevey, Suiza.

Lugar de Constitución: Suiza.

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: **JOSE ANTONIO LLORED**

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º,
Bogotá- Colombia

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 17.159.681 TP 10.784

④

INVENTOR(ES)
(72)

Nombre: **MARRACCINI, Pierre y ROGERS, John.**

Dirección: 6, rue du Clos Rousseau, F-37510 Savonnières y 6, rue Gallée, F-01630 St Genis Pouilly.

Nacionalidad o Domicilio: Francia.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP02/03469

Fecha: 27/03/02

Publicación Internacional No. WO 02/092822 A2

Fecha: 21/11/02

⑥

Título (54) " GEN PROMOTOR ESPECIFICO DE LA HOJA DEL CAFÉ "

⑦

Clasificación Internacional (51) C12N 15/82

⑧

Prioridad

SI



NO



(33) País de Origen

EP

(32) Fecha

11/05/01

(31) Número de Solicitud

01111573.0

⑨

Comprobante de Pago No. 3-83,307

Fecha: Noviembre 13 de 2003

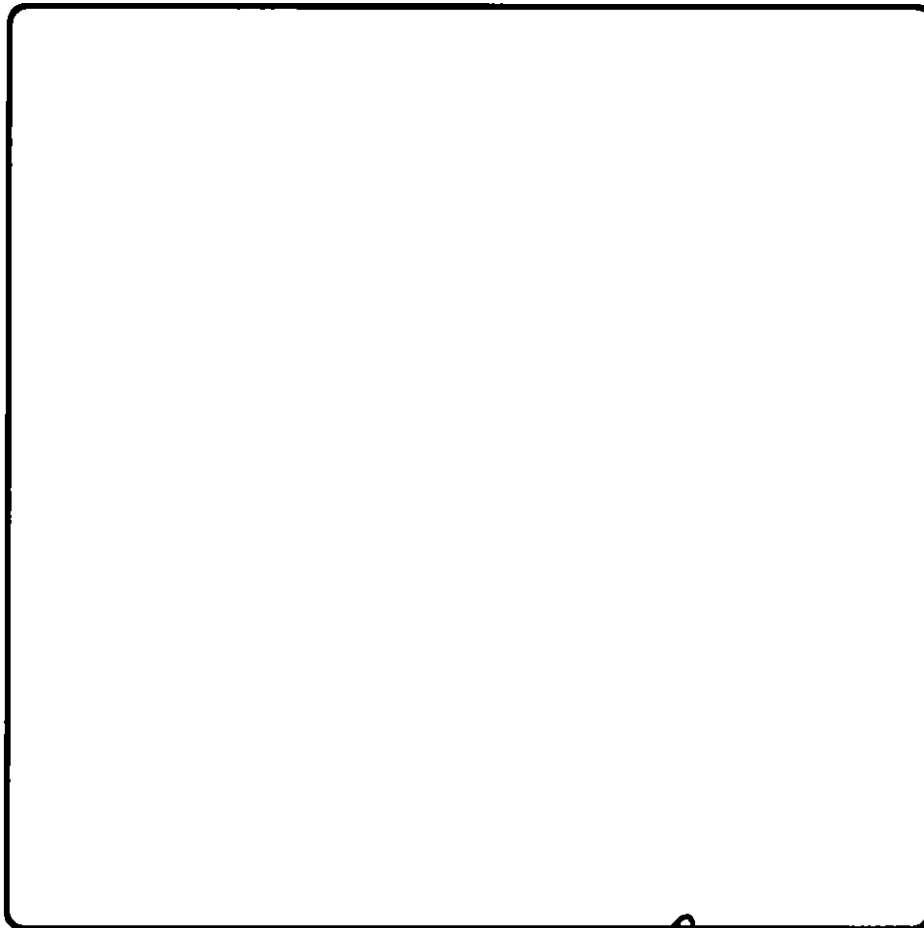
ANEXOS

10

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Documento de Representación Legal. Protocolizado bajo el número 11.145.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud Internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar Internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☒ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros Reporte de Búsqueda Internacional y su traducción, Publicación con su traducción, Capítulo Reivindicatorio como fue originalmente presentado en Fase Internacional con su traducción, Anexo Explicativo de Modificaciones a las Reivindicaciones y Listado de Secuencias

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: J SE ANTONIO LLOREDA

FIRMA:

C.C. 17.159.681 Etd. T.P. 10.784

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Indicacion : 03103526 00000000 Folios: 08
Fecha (MM): 2003-12-01 16:01:52
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE INICI 411 PRESENTAC
Procedencia: 2002 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 3 - 83,307
FECHA : NOVIEMBRE 13 DE 2003

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
LLORED A Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	19921153	13/11/2003	5,818,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. HISTORICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	400,000.00
	TOTAL :	\$ 400,000.00

SOM: CUATROCIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL ASUNTO No.

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores JOSE ANTONIO LLOREDA y/o ALFONSO LLOREDA CAMACHO para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se encuentra protocolizado ante esa División bajo el No. 11.145. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.



JOSE ANTONIO LLOREDA

T.P. No. 10.784

Código 231

Se retiran folios.

4. Extracto publicación.

5. Ficha autor.

6. Ficha temática.

N. S. S. 11-12-2003.
202052.

7
4

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES PCT

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

(PCT Artículo 18 y Reglas 43 y 44)

Registro de referencia del solicitante o agente 80322/WO	PARA FUTURAS ACCIONES ver Notificación o Transmisión del Reporte de Búsqueda Internacional (Forma PCT/ISA/220) así como, donde aplique, el ítem 5 a continuación.	
Solicitud internacional No. PCT/EP 02/03469	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 27/03/2002	Fecha de Prioridad (Primera) (día/mes/año) 11/05/2001
Solicitante SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A.		

Este Reporte de Búsqueda Internacional ha sido preparado por esta Autoridad de Búsqueda Internacional y es transmitido al solicitante según el Artículo 18. Una copia será transmitida a la Oficina Internacional.

Este Reporte de Búsqueda Internacional consta de un total de 4 hojas.

☒ También está acompañado de una copia de cada documento técnico anterior citado en este reporte.

1. Bases del reporte

a. Respecto al lenguaje, la búsqueda internacional se llevó a cabo según la solicitud internacional en el lenguaje en el cual se presentó, a menos que se indique de otro modo en este ítem.

☐ la búsqueda internacional se llevó a cabo según la traducción de la solicitud internacional proporcionada a esta Autoridad (Regla 23.1(b)).

b. Respecto a una secuencia de ácido nucleótico y/o amino revelado en la solicitud internacional, la búsqueda internacional se llevó a cabo según la lista de la secuencia:

☒ contenido en la solicitud internacional en forma escrita.

☒ presentada junto con la solicitud internacional en forma legible por computador.

☐ proporcionada subsiguientemente a esta Autoridad en forma escrita.

☐ proporcionada subsiguientemente a esta Autoridad en forma legible por computador.

☐ se ha proporcionado la afirmación de que el listado de secuencias escrito proporcionado subsiguientemente no va más allá de la revelación en la solicitud internacional según se presentó.

☐ se ha proporcionado la afirmación de que la información registrada en forma legible por computador es idéntica al listado de la secuencia escrita.

2. ☐ Ciertas reivindicaciones no pudieron localizarse (Ver Casilla I).

3. ☐ Falta unidad de invención (ver Casilla II).

4. Respecto al título,

☒ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☐ Esta Autoridad ha establecido que el texto se lee así:

5. Respecto al resumen,

☒ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☐ Esta Autoridad ha establecido el texto de acuerdo con la Regla 38.2(b), según aparece en la Casilla III. El solicitante puede, un mes después de la fecha de haber enviado por correo este reporte de búsqueda internacional, presentar comentarios a esta Autoridad.

6. La figura de los dibujos que se publicará con el resumen es la Figura No. _____

☐ como lo sugirió el solicitante.

☐ porque el solicitante no sugirió una figura.

☐ porque esta figura caracteriza mejor a la invención.

☒ Ninguna de las figuras.

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP 02/03469

A. CLASIFICACION DE MATERIA OBJETO

IPC 7 C12N15/60 C12N9/88 C12N15/82 A01H5/00 C12Q1/68

Según la Clasificación de Patente Internacional (IPC) o según la clasificación nacional y la IPC

B. CAMPOS BUSCADOS

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de símbolos de clasificación)

IPC 7 C12N

Documentación buscada fuera de documentación mínima hasta donde dichos documentos se incluyan en los campos buscados

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde sea práctico, buscar términos usados)

MEDLINE, BIOSIS, EPO-Internacional, WPI Dato

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	EP 0 894 865 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 3 de Febrero de 1999 (1999-02-03) el documento completo	1-10
X	WO 98 36053 A (STILES JOHN I; UNIV HAWAII (US); MOISYADI ISTEFO (US); NEUPANE KAB) 20 de Agosto de 1998 (1998-08-20) resumen	8,9
A	LAPORTE MARIANNE M Y COL: "Promotor de los efectos de resistencia y especificidad de tejido sobre el crecimiento de plantas de tomate transformada con sucrosa-fosfato sintasa de maíz". PLANTA (BERLIN), vol. 212, No. 5-6, Abril 2001 (2001-04), páginas 817-822, XP002179457 ISSN: 0032-0935 el documento completo	1-10

☒ En el recuadro C se enumeran más documentos.

☒ En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes.

* Categorías especiales de documentos citados:

'A' documento que define el estado general de la técnica el cual no se
considera de relevancia particular

'E' documento anterior pero publicado en o después de la fecha de
presentación internacional

'L' documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones de
prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra
citación u otra razón especial (según se especifica)

'O' documento que se refiere a una revelación oral, uso, exhibición u
otros medios

'T' documento publicado antes de la fecha de presentación internacional
pero después de la fecha de prioridad reivindicada

'T' documento posterior publicado después de la fecha de presentación
internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la
solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta
la invención

'X' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no
puede considerarse nueva o no puede considerarse que comprende
un paso inventivo cuando el documento se toma solo

'Y' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no
puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el
documento se combina con uno o más documentos, siendo dicha
combinación obvia para una persona experta en la técnica

'&' documento miembro de la misma familia de patentes

Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional

13 de Noviembre de 2002

Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional

27/11/2002

Nombre y dirección de correo de la ISA
European Patent Office, P. B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Funcionario autorizado
Bilang, J

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
 PCT/EP 02/03469

8
 6

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
A	NOMURA MIKA Y COL: "El promotor de rbcS en una planta C3 (arroz) dirige la expresión órgano-específico, dependiente de la luz en una planta C4 (maíz), pero no confiere expresión específica celular al manojito de envoltura". PLANT MOLECULAR BIOLOGY, vol. 44, No. 1, Septiembre de 2000 (2000-09), páginas 99-106, XP002179458 ISSN: 0167-4412 el documento completo	1-10
A	KANECHI MICHIO Y COL: "Inhibición no-estomatal asociada con la inhibición de rubisco en hojas de café deshidratado bajo condiciones de sombra y sin sombra". PLANT AND CELL PHYSIOLOGY, vol. 37, No. 4, 1996, páginas 455-460, XP009000728 ISSN: 0032-0781 el documento completo	1-10
A	RAMALHO JOSE C Y COL: "Deterioros por alta radiación sobre el transporte fotosintético de electrones, ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa y asimilación de N como función de la disponibilidad de N en plantas de café arabica L.". JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY, vol. 154, No. 3, Marzo de 1999 (1999-03), páginas 319-326, XP009000727 ISSN: 0176-1617 el documento completo	1-10

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Informe sobre miembros de familia de patentes

Solicitud Internacional No.

PCT/EP 02/03469

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes		Fecha de publicación
EP 0894865 A	03-02-1999	FR	2629098 A1	29-09-1989
		EP	0894865 A2	03-02-1999
		AT	188250 T	15-01-2000
		AU	629539 B2	08-10-1992
		AU	3159189 A	28-09-1989
		BR	8901499 A	14-11-1989
		CA	1314505 A1	16-03-1993
		CN	1036038 A,B	04-10-1989
		DD	294040 A5	19-09-1991
		DE	68929125 D1	03-02-2000
		DE	68929125 T2	31-05-2000
		DK	144689 A	24-09-1989
		EG	20026 A	30-10-1997
		EP	0337899 A1	18-10-1989
		ES	2139565 T3	16-02-2000
		GR	3032288 T3	27-04-2000
		HU	52158 A2	28-06-1990
		IL	89614 A	19-01-1996
		JP	2009374 A	12-01-1990
		KR	145703 B1	01-08-1998
		KR	218855 B1	01-10-1999
		NZ	228458 A	25-06-1991
		PL	278448 A1	27-12-1989
		RO	107001 B1	30-08-1993
		RU	2106410 C1	10-03-1998
		TR	23682 A	06-06-1990
		US	5559024 A	24-09-1996
		US	5773698 A	30-06-1998
		ZA	8902146 A	29-11-1989
WO 9836053 A	20-08-1998	WO	9836053 A2	20-08-1998
		AU	6324798 A	08-09-1998

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 80322/W0	FOR FURTHER ACTION see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP 02/03469	International filing date (day/month/year) 27/03/2002	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 11/05/2001
Applicant SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A.		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 4 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

- a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

- b. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing:

☒ contained in the international application in written form.

☒ filed together with the international application in computer readable form.

☐ furnished subsequently to this Authority in written form.

☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.

☐ the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.

☐ the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box I).

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box II).

4. With regard to the title,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No.

☐ as suggested by the applicant.

☐ because the applicant failed to suggest a figure.

☐ because this figure better characterizes the invention.

☒ None of the figures.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/03469

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/60 C12N9/88 C12N15/82 A01H5/00 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

MEDLINE, BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 894 865 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 3 February 1999 (1999-02-03) the whole document	1-10
X	WO 98 36053 A (STILES JOHN I ;UNIV HAWAII (US); MOISYADI ISTEFO (US); NEUPANE KAB) 20 August 1998 (1998-08-20) abstract	8,9
A	LAPORTE MARIANNE M ET AL: "Promoter strength and tissue specificity effects on growth of tomato plants transformed with maize sucrose-phosphate synthase." PLANTA (BERLIN), vol. 212, no. 5-6, April 2001 (2001-04), pages 817-822, XP002179457 ISSN: 0032-0935 the whole document	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 November 2002

Date of mailing of the international search report

27/11/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentian 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bilang, J

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NOMURA MIKA ET AL: "The promoter of rbcS in a C3 plant (rice) directs organ-specific, light-dependent expression in a C4 plant (maize), but does not confer bundle sheath cell-specific expression." PLANT MOLECULAR BIOLOGY, vol. 44, no. 1, September 2000 (2000-09), pages 99-106, XP002179458 ISSN: 0167-4412 the whole document	1-10
A	KANECHI MICHIO ET AL: "Non-stomatal inhibition associated with inactivation of rubisco in dehydrated coffee leaves under unshaded and shaded conditions." PLANT AND CELL PHYSIOLOGY, vol. 37, no. 4, 1996, pages 455-460, XP009000728 ISSN: 0032-0781 the whole document	1-10
A	RAMALHO JOSE C ET AL: "High irradiance impairments on photosynthetic electron transport, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and N assimilation as a function of N availability in Coffea arabica L. plants." JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY, vol. 154, no. 3, March 1999 (1999-03), pages 319-326, XP009000727 ISSN: 0176-1617 the whole document	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 02/03469

11

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0894865	A	03-02-1999	FR 2629098 A1 29-09-1989
			EP 0894865 A2 03-02-1999
			AT 188250 T 15-01-2000
			AU 629539 B2 08-10-1992
			AU 3159189 A 28-09-1989
			BR 8901499 A 14-11-1989
			CA 1314505 A1 16-03-1993
			CN 1036038 A , B 04-10-1989
			DD 294040 A5 19-09-1991
			DE 68929125 D1 03-02-2000
			DE 68929125 T2 31-05-2000
			DK 144689 A 24-09-1989
			EG 20026 A 30-10-1997
			EP 0337899 A1 18-10-1989
			ES 2139565 T3 16-02-2000
			GR 3032288 T3 27-04-2000
			HU 52158 A2 28-06-1990
			IL 89614 A 19-01-1996
			JP 2009374 A 12-01-1990
			KR 145703 B1 01-08-1998
			KR 218855 B1 01-10-1999
			NZ 228458 A 25-06-1991
			PL 278448 A1 27-12-1989
			RO 107001 B1 30-08-1993
			RU 2106410 C1 10-03-1998
			TR 23682 A 06-06-1990
			US 5559024 A 24-09-1996
			US 5773698 A 30-06-1998
			ZA 8902146 A 29-11-1989
WO 9836053	A	20-08-1998	WO 9836053 A2 20-08-1998
			AU 6324798 A 08-09-1998

12

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional

21 de Noviembre de 2002 (21.11.2002)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional

WO 02/092822 A2

- (51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: C12N 15/82
- (21) Número de Solicitud Internacional: PCT/EP02/ 03469
- (22) Fecha de Registro Internacional: Marzo 27 de 2002 (27.03.2002)
- (25) Idioma de registro: Inglés
- (26) Idioma de Publicación: Inglés
- (30) Información de Prioridad:
01111573.0 Mayo 11 de 2001 (11.05.2001) EP
- (71) Solicitante (para todos los Estados designados excepto Estados Unidos): SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A. [CH/CH]; P.O. Box 353, CH-1800 Vevey (CH).
- (72) Inventores; e
- (73) Inventores/Solicitantes (para Estados Unidos solamente): MARRACCINI, Pierre [FR/FR]; 6, rue du Clos Rousseau, F-37510 Savonnières (FR). ROGERS, John [GB/FR]; 6, rue Galilée, F-01630 St Genis Pouilly (FR).
- (74) Agente: STRAUS, Alexander; Becker Kurig Straus, Bavariastr. 7, 80336 München (DE).
- (81) Estados Designados (nacional): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Estados Designados (regional): Patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente Eurasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) Patente Europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publicado:
— sin reporte de búsqueda internacional y para ser publicada de nuevo en el caso de recibo de ese reporte
- Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase a "Las Notas Guías sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada emisión regular de la Gaceta PCT.

(54) Título: GEN PROMOTOR ESPECIFICO DE LA HOJA DEL CAFE

(57) Resumen: La presente invención se relaciona con una secuencia nucleotídica derivada de las hojas del café que puede ser usada como un promotor para una expresión inducible de genes en plantas. En particular, la presente invención se relaciona con una secuencia nucleotídica que cubre el promotor y la región que codifica un gen rbcS. Adicionalmente la presente invención se relaciona con plantas transgénicas que contienen dichas secuencias nucleotídicas recombinantes.

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
21 November 2002 (21.11.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/092822 A2

- (51) International Patent Classification⁷: C12N 15/82
- (21) International Application Number: PCT/EP02/03469
- (22) International Filing Date: 27 March 2002 (27.03.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
01111573.0 11 May 2001 (11.05.2001) EP
- (71) Applicant (for all designated States except US): SOCI-
ETE DES PRODUITS NESTLE S.A. [CH/CH]; P.O. Box
353, CH-1800 Vevey (CH).
- (72) Inventors; and
- (73) Inventors/Applicants (for US only): MARRACCINI,
Pierre [FR/FR]; 6, rue du Clos Rousseau, F-37510 Savon-
nières (FR). ROGERS, John [GB/FR]; 6, rue Galilée,
F-01630 St Genis Pouilly (FR).
- (74) Agent: STRAUS, Alexander, Becker Kurig Straus,
Bavariastr. 7, 80336 Munich (DE).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, GR, GU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).
- Published:
— without international search report and to be republished
upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: LEAF SPECIFIC GENE PROMOTER OF COFFEE

(57) Abstract: The present invention relates to a nucleotide sequence derived from coffee leaves that may be used as a promoter for an inducible expression of genes in plants. In particular, the present invention pertains to a nucleotide sequence embracing the promoter and the coding region of a *rbcS* gene. In addition the present invention relates to transgenic plants containing such recombinant nucleotide sequences.

WO 02/092822 A2

**CAPITULO REIVINDICATORIO COMO FUE
ORIGINALMENTE PRESENTADO EN FASE
INTERNACIONAL JUNTO CON SU TRADUCCION**

REIVINDICACIONES

1. Una secuencia de nucleótidos a partir del nucleótido 1 al 1067 de la SEQ ID. No. 1 o partes funcionales del mismo.
2. Una secuencia de nucleótidos identificada por SEQ. ID. 1 o variantes funcionales de la misma, que codifica una proteína rbcS del café.
3. Una secuencia de nucleótidos como se identifica por SEQ. ID. No. 2 o variaciones funcionales de la misma, que codifica una proteína rbcS del café.
4. Un vector que contiene un nucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Una secuencia polipeptídica como se identifica por SEQ. ID. No. 3.
6. El uso de una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 1 para la expresión de un gen en plantas.
7. El uso de la reivindicación 5, en donde la planta es de café, de tomate, de cacao, de soya y de achicoria.
8. Una planta recombinante que contiene una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 1.
9. La planta recombinante de acuerdo con la reivindicación 7, la cual es de café, de tomate, de cacao, de soya y de achicoria.
10. El uso de una parte de una secuencia de un nucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o de sus hebras complementarias, que constituye al menos 10 bp de longitud, como cebador (primer) para realizar una PCR o como sonda para detectar *in vitro*, o para modificar *in vivo*, al menos un gen de interés.

Claims

16

1. A nucleotide sequence of from nucleotide 1 to 1067 of SEQ ID. No. 1 or functional parts thereof.
- 5 2. A nucleotide sequence identified by SEQ. ID. No. 1 or functional variants thereof, encoding a coffee *rbcS* protein.
- 10 3. A nucleotide sequence as identified by SEQ. ID. No. 2 or functional variants thereof, encoding a coffee *rbcS* protein.
4. A vector containing a nucleotide according to any of the claims 1 to 3.
- 15 5. A polypeptide sequence as identified by SEQ. ID. No. 3.
6. Use of a nucleotide sequence according to claim 1 for the expression of a gene in plants.
7. The use of claim 5, wherein the plant is coffee, tomato, cacao, soy and chicory.
- 20 8. A recombinant plant containing a nucleotide sequence according to claim 1.
9. The recombinant plant according to claim 7, which is coffee, , tomato, cacao, soy and chicory.
- 25 10. Use of a part of a nucleotide sequence according to any of the claims 1 to 3 or of their complementary strands, which is at least 10 bp in length, as primer to carry out a PCR or as probe to detect *in vitro* or to modify *in vivo* at least one gene of interest.

20
17

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES
PCT
REPORTE DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL

(PCT Artículo 36 y Regla 70)

Registro de referencia del solicitante o agente 80322 WO	PARA FUTURAS ACCIONES Ver Notificación o Transmisión del Reporte de Examen Preliminar Internacional (Formato PCT/PEA416)	
Solicitud Internacional No. PCT/EP02/03469	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 27/03/2002	Fecha de prioridad (día/mes/año) 11/05/2001
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC C12N 15/68		
Solicitante SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A. et al.		

1. Este informe de examen preliminar internacional ha sido preparado por esta Autoridad Examinadora Preliminar Internacional y se transmite al solicitante de conformidad con el Artículo 36. 2. Este REPORTE consta de un total de <u>6</u> hojas, incluyendo la carátula. ☒ Este reporte también está acompañado de ANEXOS, es decir, páginas de descripción, reivindicaciones y/o dibujos que han sido modificados y son la base de este informe y/o páginas que contienen rectificaciones hechas ante esta Autoridad (ver Regla 70.16 y la Sección 607 de las Instrucciones Administrativas de conformidad con el PCT). Estos anexos constan de un total de 1 hojas.	
3. Este informe contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems: I ☒ Bases del Reporte II ☐ Prioridad III ☐ No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad Industrial. IV ☒ Falta de unidad de invención V ☒ Afirmación razonada de conformidad con el Artículo 35(2) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación. VI ☐ Ciertos documentos citados VII ☐ Ciertos defectos en la solicitud internacional VIII ☐ Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional	
Fecha de presentación de la demanda 08/10/2002	Fecha de terminación de este reporte 26.06.2003
Nombre y dirección de correo de la autoridad de examen preliminar internacional: Oficina de Patentes Europea D-80298 Munich Tel. +49 89 2399-0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399-4465	Funcionario autorizado Bilang, J Teléfono No. +49 89 2399 8707

I. Bases del reporte

1. Respecto a los elementos de la solicitud internacional: (Carátulas de remplazo que han sido suministradas a la oficina receptora en respuesta a una invitación bajo el artículo 14 están referenciados en este reporte como "presentados originalmente" y no están anexos a este reporte dado que no contienen modificaciones (Reglas 70.16 y 70.17):

Descripción, páginas:

1-22 como se presentaron originalmente

Reivindicaciones, No.:

1-9 como se recibieron el 19/05/2003 con carta de 16/05/2003

Dibujos, hojas:

1/3-3/3 como se presentaron originalmente

Listado de secuencias parte de la descripción, páginas:

1-7, como se presentaron originalmente

2. Respecto al idioma, todos los elementos marcados anteriormente estuvieron disponibles o fueron suministrados a esta Autoridad en el idioma en el cual la solicitud internacional fue presentada, a menos que se indique lo contrario bajo este ítem.

Estos elementos estuvieron disponibles o fueron suministrados a esta Autoridad en el idioma: , el cual es:

- ☐ el idioma de una traducción suministrada para una búsqueda internacional (según la Regla 23.1 (b)).
- ☐ el idioma de una publicación de la solicitud internacional (según la Regla 48.3 (b)).
- ☐ el idioma de la traducción suministrada para el examen preliminar internacional (según las Reglas 55.2 y/o 55.3).

3. Respecto al nucleótido y/o secuencia amino ácida revelado en la solicitud internacional, se llevó a cabo el examen preliminar internacional según el listado de secuencia:

- ☒ contenido en la solicitud internacional en forma escrita.
- ☒ registrado junto con la solicitud internacional en forma legible por computador.
- ☐ proporcionado subsiguientemente a esta Autoridad en forma escrita.
- ☐ proporcionado subsiguientemente a esta Autoridad en forma legible por computador.
- ☐ Se ha proporcionado la afirmación respecto a la cual el listado de secuencia escrito proporcionado subsiguientemente no va más allá de la revelación en la solicitud internacional según se presentó.
- ☐ Se ha proporcionado la afirmación respecto a la cual la información presentada en forma legible por computador es idéntica al listado de secuencia escrita.

4. Las modificaciones han resultado en la cancelación de:

- ☐ la descripción, páginas:
- ☐ las reivindicaciones, Nos.:
- ☐ los dibujos, hojas:

5. ☐ Este reporte ha sido establecido como si (algunas de) las modificaciones no se hubiesen hecho, ya que se ha considerado que van más allá de la revelación según se presentó, como se indicó en Casilla Suplementaria (Regla 70.2 (c)):

(Cualquier hoja de remplazo que contenga tales modificaciones debe ser referida bajo el ítem 1 y anexada a este reporte)

6. Observaciones adicionales, si son necesarias:

IV. Falta de unidad de invención

1. En respuesta a la invitación para restringir o pagar derechos adicionales el solicitante ha:

- ☐ restringido las reivindicaciones.
- ☐ pagado derechos adicionales.
- ☐ pagado derechos adicionales bajo protesta.
- ☐ ni restringido ni pagado derechos adicionales.

2. ☒ Esta Autoridad encontró que el requisito de unidad de invención no se ha cumplido y escogió, de conformidad con la Regla 68.1, no invitar al solicitante para que restrinja o pague derechos adicionales.

3. Esta Autoridad considera que el requisito de unidad de invención de acuerdo con las Reglas 13.1, 13.2 y 13.3 es

- ☐ se ha cumplido.
- ☒ no se ha cumplido por las siguientes razones:
ver hoja separada

4. Por consiguiente, las siguientes partes de la solicitud internacional fueron el objeto del examen preliminar internacional para establecer en este reporte:

- ☒ todas las partes.
- ☐ las partes que se relacionan con las reivindicaciones Nos.

V. Afirmación razonada bajo el Artículo 35(2) respecto a novedad, paso inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación

1. Afirmación

Novedad (N)

Sí: Reivindicaciones 1-9

No: Reivindicaciones

23
20

Nivel inventivo (IS)	Sí: Reivindicaciones
	No: Reivindicaciones 1-9
Aplicabilidad industrial (IA)	Sí: Reivindicaciones 1-9
	No: Reivindicaciones

2. Citaciones y explicaciones
ver hoja separada

24
21

1. Esta solicitud carece de unidad porque sus reivindicaciones se relacionan con más de una invención.

Una solicitud debe relacionarse sólo con una invención o a un grupo de invenciones enlazadas de manera tal que formen un solo concepto inventivo general.

La unidad de la invención se cumple sólo cuando existe una relación técnica entre las invenciones que implican una o más de las mismas o correspondientes características técnicas especiales, siendo tales características las que definen una contribución que cada una de las invenciones reivindicadas, consideradas como un total, hacen sobre el arte anterior.

La relación técnica entre el objeto actual de las reivindicaciones 1 y 2 es "ribulosa biscofosfato carboxilasa/oxigenasa (rubisco)". Sin embargo, esta relación no puede ser considerada concordante con una característica técnica especial, tal como se definió anteriormente, porque el rubisco era bien conocido en la técnica. Aun más, era obvio que el café comprendiera un gen rubisco.

Las contribuciones reivindicadas en la presente solicitud que son presuntamente realizadas sobre el arte anterior son:

1. Una secuencia de nucleótidos que representa el promotor del gen rbcS del café y su uso (reivindicación 1, 6-9 (completamente) y 4 (parcialmente));
2. Una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína rubisco del café, la secuencia polipeptídica que representa dicha proteína y su uso (reivindicaciones 2, 3, 5 (completamente) y 4 (parcialmente)).

Estas contribuciones no están enlazadas como para formar un solo concepto inventivo. Por lo tanto, las presentes reivindicaciones caen aparte dentro de dos grupos de invenciones.

2. Las reivindicaciones 2-5 carecen de una actividad inventiva (Artículo 33 (3) PCT).

La proteína RbcS era bien conocida en la técnica. Esto no requiere de ninguna actividad inventiva para aislar el homólogo del café y deducir la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína.

3. Las reivindicaciones 1 y 6-9 carecen de una actividad inventiva (Artículo 33 (3)PCT).

El arte anterior divulga el uso del promotor de rbcS para la expresión (inducible por la luz) de transgenes. Aún mas, era obvio que el café también tuviera un rbcS. Al parecer la persona versada en la técnica usaría *a priori* el promotor rbcS para la expresión específica orgánica de un gen (ver por ej., Laporte et al., Nomura et al). Los solicitantes no proporcionan ninguna evidencia en cuanto a que los efectos indicados en la presente solicitud sean únicos para el promotor rbcS del café. Esta autoridad por lo tanto considera los efectos observados como efectos adicionales. Un paso inventivo solo puede ser reconocido si los solicitantes pueden demostrar que los promotores rbcS son derivados de otras plantas que no tienen los efectos observados para el promotor rbcS del café.

4. La reivindicación 1 y 2 cubren variantes funcionales de la secuencia nucleótida identificada por (parte de) SEQ ID NO: 1. No es claro cuál es la función de dicha SEQ ID.

REIVINDICACIONES

1. Una secuencia de nucleótidos a partir del nucleótido 1 al 1067 de la SEQ ID No. 1 o partes funcionales de la misma.
2. Una secuencia de nucleótidos identificada por la SEQ ID No. 1 o variantes funcionales de la misma, que codifica una proteína *rbcS* del café.
3. Una secuencia de nucleótidos tal como está identificada por la SEQ ID No. 2 o variantes funcionales de la misma, que codifica una *rbcS* proteína del café.
4. Un vector que contiene un nucleótido conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Una secuencia polipeptídica tal como está identificada por la SEQ ID No. 3.
6. Uso de una secuencia de nucleótidos conforme a la reivindicación 1 para la expresión de un gen en plantas.
7. El uso de la reivindicación 5, en donde la planta es café, tomate, cacao, soya y achicoria.

8. Una planta recombinante transformada con al menos una secuencia de nucleótidos conforme a la reivindicación 1.

9. La planta recombinante conforme a la reivindicación 7, la cual es café, tomate, cacao, soya y achicoria.

PATENT COOPERATION TREATY

25

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:	
Straus, Alexander BECKER, KURIG, STRAUS Bavariastrasse 7 D-80336 München ALLEMAGNE	
BECK, KURIG STRAUS BAVARIASTRASSE 7 - 80336 MÜNCHEN 27. Juni 2003 WV: / LF:	

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT
(PCT Rule 71.1)

Date of mailing (day/month/year)	26.06.2003
-------------------------------------	------------

Applicant's or agent's file reference 80322 WO		IMPORTANT NOTIFICATION	
International application No. PCT/EP02/03469	International filing date (day/month/year) 27/03/2002	Priority date (day/month/year) 11/05/2001	
Applicant SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A. et al.			

- The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the International preliminary examination report and its annexes, if any, established on the International application.
- A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
- Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.
- REMINDER**

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

For the purpose of deciding whether the claimed invention is patentable or not, the elected Offices may apply criteria additional to or different from the criteria on which the International preliminary examination report is based (see Articles 27(5), 33(5)). Additional criteria may include e.g. exemptions from patentability and the requirements of enabling disclosure and of clarity and support of claims.

Name and mailing address of the IPEA/  European Patent Office D-80299 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Authorized officer Büchler, S Tel. +49 89 2399-8080	
--	---	---

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 80322 WO		FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP02/03469	International filing date (day/month/year) 27/03/2002	Priority date (day/month/year) 11/05/2001	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N15/68			
Applicant SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A. et al.			
1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet. ☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of 1 sheets.			
3. This report contains indications relating to the following items: - I ☒ Basis of the report - II ☐ Priority - III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability - IV ☒ Lack of unity of invention - V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement - VI ☐ Certain documents cited - VII ☐ Certain defects in the international application - VIII ☐ Certain observations on the international application			
Date of submission of the demand 08/10/2002		Date of completion of this report 26.08.2003	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80296 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tlx 523656 epmu d Fax +49 89 2399 - 4465		Authorized officer Bilang, J Telephone No. +49 89 2399 6707 	

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/EP02/03469

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17)*):

Description, pages:

1-22 as originally filed

Claims, No.:

1-9 as received on 18/05/2003 with letter of 18/05/2003

Drawings, sheets:

1/3-3/3 as originally filed

Sequence listing part of the description, pages:

1-7, as originally filed

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language: , which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of the international search (under Rule 23.1(b)).
☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
☐ the language of a translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☒ contained in the international application in written form.
☒ filed together with the international application in computer readable form.
☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

31
196

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/EP02/03469

- ☐ the description, pages:
☐ the claims, Nos.:
☐ the drawings, sheets:

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2(c)):

(Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.)

6. Additional observations, if necessary:

IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- ☐ restricted the claims.
☐ paid additional fees.
☐ paid additional fees under protest.
☐ neither restricted nor paid additional fees.

2. ☒ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

- ☐ complied with.
☒ not complied with for the following reasons:
see separate sheet

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- ☒ all parts.
☐ the parts relating to claims Nos. .

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N) Yes: Claims 1-9

32
29

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/EP02/03469

	No:	Claims	
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	
	No:	Claims	1-9
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1-9
	No:	Claims	

2. Citations and explanations
see separate sheet

23
30

1. The application lacks unity because its claims relate to more than one invention.

An application must relate to one invention only or to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

Unity of invention is fulfilled only when there is a technical relationship among the inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features, special technical features being such features that define a contribution which each of the claimed inventions, considered as a whole, makes over the prior art.

The technical relationship among the present subject-matter of claims 1 and 2 is "ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase (rubisco)". However, this relation cannot be considered to consist of a special technical feature as defined above, because rubisco was well known in the art. Moreover, it was obvious that coffee comprises a rubisco gene.

The contributions claimed in the present application which are allegedly made over the prior art are:

1. A nucleotide sequence representing the promoter of the coffee rbcS gene and its use (claims 1, 6-9 (completely) and 4 (partially));
2. A nucleotide sequence encoding the coffee rubisco protein, the polypeptide sequence representing said protein, and their use (claims 2, 3, 5 (completely) and 4 (partially)).

These contributions are not so linked as to form one single inventive concept. Hence, the present claims fall apart into two groups of inventions.

2. Claims 2-5 lack an inventive activity (Article 33(3) PCT).

RbcS Protein was well known in the art. It does not require any inventive activity to isolate the homolog from coffee and deduce the nucleic acid sequence encoding the protein.

3. Claims 1 and 6-9 lack an inventive activity (Article 33(3) PCT).

34
31

The prior art discloses the use of the promoter of *rbcS* for the (light- inducible) expression of transgenes. Moreover, it was obvious that coffee also has a *rbcS*. It would appear that the skilled person *à priori* would use the *rbcS* promoter for the organ specific expression of a gene (see e.g. Laporte et al., Nomura et al.). The applicants do not provide any evidence that the effects shown in the present application are unique to the coffee *rbcS* promoter. This authority thus considers the observed effects to be bonus effects. An inventive step only could be acknowledged if the applicants could demonstrate that the *rbcS* promoters derived from other plants do not have the effects observed for the coffee *rbcS* promoter.

4. Claims 1 and 2 embrace functional variants of the nucleotide sequence identified by (part of) SEQ ID NO: 1. It is not clear what the function of said SEQ ID is.

32

Anmelder:
Unser Zeichen:

Société Des Produits Nestlé S.A.
80322/WO

Claims

- 5 1. A nucleotide sequence of from nucleotide 1 to 1067 of SEQ ID. No. 1 or functional parts thereof.
2. A nucleotide sequence identified by SEQ. ID. No. 1 or functional variants thereof, encoding a coffee *rbcS* protein.
- 10 3. A nucleotide sequence as identified by SEQ. ID. No. 2 or functional variants thereof, encoding a coffee *rbcS* protein.
4. A vector containing a nucleotide according to any of the claims 1 to 3.
- 15 5. A polypeptide sequence as identified by SEQ. ID. No. 3.
6. Use of a nucleotide sequence according to claim 1 for the expression of a gene in plants.
- 20 7. The use of claim 5, wherein the plant is coffee, tomato, cacao, soy and chicory.
8. A recombinant plant transformed with at least one nucleotide sequence according to claim 1.
- 25 9. The recombinant plant according to claim 7, which is coffee, , tomato, cacao, soy and chicory.

AMENDED SHEET

ANEXO EXPLICATIVO DE MODIFICACIONES A LAS REIVINDICACIONES

En ejercicio del derecho conferido por el Artículo 28 numeral 1 del Tratado de Cooperación en materia de Patentes PCT, atentamente me permito informar a ese Despacho que el capítulo reivindicatorio tal como fue presentado originalmente en Fase Internacional ha sido modificado.

Las modificaciones realizadas se encuentran plenamente sustentadas en la descripción de la presente invención y en este sentido, no configuran una ampliación del invento o de la divulgación contenida en la solicitud presentada.

GEN PROMOTOR ESPECÍFICO DE LA HOJA DEL CAFÉ

RESUMEN - OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con una secuencia nucleótida derivada de las hojas del café que puede ser usada como un promotor para una expresión inducible de genes en plantas. En particular, la presente invención se relaciona con una secuencia nucleótida que cubre el promotor y la región que codifica un gen rbcS. Adicionalmente la presente invención se relaciona con plantas transgenicas que contienen dichas secuencias nucleótidas recombinantes.

GEN PROMOTOR ESPECÍFICO DE LA HOJA DEL CAFÉ

La presente invención se refiere a una secuencia de nucleótidos derivada de DNA genómico del café que se puede utilizar como un promotor capaz de inducir la expresión de genes en plantas. En particular, la presente invención se relaciona con una secuencia de nucleótidos que abarca el promotor y la región que codifica el gen *rbcS*. Además, la presente invención se refiere a plantas transgénicas que contienen tales secuencias recombinantes de nucleótidos.

Se denominan promotores a las secuencias de DNA que controlan el nivel de transcripción de un gen particular. Estos promotores proporcionan un sitio de unión para polimerasa RNA que se une en tal sitio y produce la transcripción de la estructura del(los) gen(es) bajo el control de la misma, que resulta en la producción del RNA mensajero (mRNA) que en cambio proporciona la plantilla para la síntesis de los correspondientes polipéptidos.

Los promotores se han estudiado en una variedad de organismos tales como p. ej., virus, bacterias, animales y también en plantas. Para especies dadas o tipos de organismos se han encontrado regiones conservadas de DNA (secuencias consenso) dentro de los promotores asociados con una variedad de genes estructurales. Se cree que estas regiones se encuentran involucradas en el papel desempeñado por el promotor en el proceso de transcripción.

En la técnica, se han realizado muchos estudios para introducir genes foráneos en plantas y que se expresen por medio de sus propios promotores. Estos ensayos involucran el uso de inserciones de DNA foráneo en el plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* y la introducción del mismo

en las plantas (cf. R.T Fraley y otros, Proc. Natl. Acad. Sci., (1983) 80, 4803-4807).

Sin embargo, estas medidas expresan genes foráneos en plantas probadas que son únicamente de éxito limitado dado que, la cantidad del producto del gen foráneo obtenido de este modo es bastante baja. Con este propósito, las investigaciones se han enfocado en el aislamiento de promotores nativos, es decir, promotores que la planta en si misma contiene. Estos promotores preferiblemente deben poseer una elevada actividad, esto es, proporcionar una alta expresión y de manera adicional debe ser inducidos.

Se conocen que ciertos polipéptidos son altamente expresados en plantas y por consiguiente han sido objetos de extensos estudios. Uno de estos polipéptidos es la enzima ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa (Rubisco), que es la enzima principal de la ruta de fijación de carbono en cloroplastos de plantas de la clase C3. La enzima consta de dos tipos principales de subunidades polipeptídicas: La subunidad pequeña (rbcS) y la subunidad grande (rbcL) con la enzima que está compuesta de 8 subunidades grandes y 8 pequeñas (Backer y otros, J. Mol. Biol., 91 (1975), 391-399) que se codifica por el gen rbcL del cloroplasto y la familia de genes rbcS nucleares respectivamente (Dean y otros, Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol., 40 (1989) 417-439).

Se sabe que Rubisco se acumula en respuesta a la luz y los estudios han demostrado que existe un correspondiente incremento en los estados de niveles continuos del mRNA del rbcS que resulta de una transcripción incrementada del gen rbcS (Smith y otros, J. Mol. Appl. Genet, 1(1981), 127-137).

La estructura de los promotores *rbcS* regulados por la luz, se estudiaron en diferentes plantas tales como en arveja o petunias (cf. Herrera y otros., Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 49 (1998) 525 - 555). Hasta la fecha se conoce que varias regiones de DNA sensibles a la luz que enlazan factores en función trans son necesarios para controlar la expresión del gen *rbcS* en el nivel de transcripción. Algunos de los promotores *rbcS* aislados hasta donde han sido caracterizados y utilizados, expresan fosfato de sucrosa sintasa (cf. Worrel y otros, Plant Cell 3 (1991), 1121-1130) o glutamina sintasa (Migge y otros, Planta, 210 (2000), 252-260) en las hojas de plantas transgénicas.

En la técnica se han realizado también reportes de copias múltiples del gen *rbcS* en el DNA nuclear de varios genomas de plantas que incluyen: petunias, arveja o trigo y debido a que no se han estudiado hasta el momento todas las regiones promotoras de dicha enzima, existe aún la necesidad de proporcionar promotores adicionales que le permitan a una persona versada en la materia expresar genes foráneos en una planta.

Por consiguiente, el problema de la presente invención reside en proporcionar una nueva herramienta que permita la expresión de genes en una planta, que no debe preferiblemente no deba resultar en un silenciador de genes, cuando los transgenes múltiples sean dirigidos por el mismo promotor en una célula, un hecho conocido el cual ocurre con promotores que son de alta actividad.

El problema anterior se ha resuelto mediante una secuencia de nucleótidos como se identifica por los nucleótidos 1 hasta 1067 de SEQ ID. No.1 o partes funcionales de la misma.

De acuerdo con otra realización, la presente invención se proporciona para la secuencia del gen completo de un gen *rbcS* (SEQ. ID. No. 1) y el cDNA (SEQ. ID. No 2) transcrito de ahí mismo.

Aún mas, de acuerdo con otra realización, la presente invención se proporciona para un polipéptido *rbcS* como se identifica mediante SEQ. ID. No 3 que forma parte de Rubisco.

En las figuras:

La Fig. 1 muestra un análisis de manchas de Northern de RNA total aislado de varios tejidos de café e hibridados con el *rbcS* cDNA.

La Fig. 2 muestra un mapa que indica el promotor y la región que codifica o el gen *rbcS*.

La Fig. 3 muestra una prueba de manchas de Southern (Southern-blot) de DNA geonómico de café *arabica* variedad Caturra.

La región promotora de la presente invención se realiza de varias formas diferentes. La región promotora se puede representar mediante una secuencia de nucleótidos identificada mediante los nucleótidos No 1 a 1067 de la SEQ. ID. No 1, o en caso de una forma en donde, el extremo 3' de la misma se ha modificado de tal forma se pueda realizar una fácil fusión con un gen de interés. Esto puede ser p. ej., logrado mediante la creación de un sitio de restricción en el extremo 3' de la región promotora. Además, se puede crear un sitio de restricción dentro de la región codificadora del gen *rbcS* y de este modo, al insertar un gen foráneo, será sintetizado un polipéptido de fusión. El DNA identificado por los nucleótidos 1 a 1067 de la secuencia nucleica SEQ. ID. No. 1 se puede utilizar de manera beneficiosa

por su fusión completa o parcial con un gen de interés, mientras que preserva el marco de lectura y luego por clonación total en un vector de expresión el cual se introduce en el café para permitir la expresión de la proteína codificada por este gen en las hojas del café.

De acuerdo con una realización, el polipéptido a ser enlazado al promotor *rbcS* puede ser el polipéptido *rbcS* como tal y de esta manera introducir dicha construcción en una célula de planta donde será expresado el actual gen *rbcS* del café. Por lo tanto, de conformidad con una realización de la presente invención se proporciona una secuencia de nucleótidos como se identifica por SEQ ID. No. 1 y el correspondiente cDNA (SEQ ID No. 2) y el polipéptido sintetizado sobre la traslación de dicho cDNA (SEQ ID. No. 3).

El promotor de la presente invención se puede utilizar para producir cualquier gen deseado en una planta, preferiblemente en el café o también en el cacao, tomate, achicoria y soya. Dado que el promotor es fuerte y puede ser inducido por la luz, éste promotor representa una herramienta valiosa para la expresión de genes exógenos en plantas. Más aún, como se pudo demostrar el uso múltiple de dicho promotor en células de plantas y que no resultó en un silenciador de genes.

Es más, parte de cualquier secuencia de nucleótidos de acuerdo con la presente invención o parte de sus hebras complementarias, que son al menos de 10 bp de longitud, pueden ser utilizadas como un cebador (primer) para realizar una PCR o como sonda para detectar *in vitro* al menos un gen de interés. Se prefiere que tal secuencia de nucleótidos sea una secuencia derivada de los nucleótidos 51 a 596 de la secuencia de nucleica SEQ ID No. 2.

La invención también protege todos los productos alimenticios, cosméticos o farmacéuticos que contienen todo o parte del DNA o de las proteínas recombinantes de acuerdo con la invención. Seguramente, las personas versadas en la materia serán capaces de detectar la presencia de éstas proteínas en cantidades muy bajas por medio de sondas de oligonucleótidos o de anticuerpos apropiados.

Los actuales inventores durante los estudios que lideran la presente invención, han aislado y caracterizado un novedoso polipéptido producido en grandes cantidades en las hojas del café, durante condiciones de luz. Con este propósito, se ha identificado el polipéptido de las hojas del café mediante la secuenciación del N-terminal seguido de electroforesis bi-dimensional en gel. Se clonó la longitud total del rbcS del cDNA a partir de la biblioteca de cDNA de hojas de café como también sus genes correspondientes. Se aisló mediante aproximaciones de PCR, un fragmento de DNA genómico que contenía el promotor de éste gen. Se probó el promotor en tabaco transgénico para verificar su especificidad, utilizando el gen reportero *uidA*.

I. Identificación de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa de las hojas de café

La totalidad de proteínas se extrajeron de las hojas de *café arabica* de la variedad Caturra.

Para realizar esto, las hojas de café se molieron de forma rápida en nitrógeno líquido, que luego se redujeron a un polvo de acuerdo con el método de Damerval y otros (Electrophoresis 7 (1986), 52-54). Luego, las proteínas del café se extrajeron de 10 mg de este polvo que se solubilizó en

100 µl de solución que contenía 3% p/v de CHAPS, úrea 8.5 M, 0.15% p/v de DTT y 3% v/v de soporte de anfolito pH 3-10.

Luego, se centrifugó la mezcla a 13,000 g durante 5 minutos y se recuperó el sobrenadante, que contenía la totalidad de las proteínas de los granos del café.

Las proteínas en el sobrenadante se separaron luego mediante electroforesis bi-dimensional en gel. Inicialmente, se realizó la electroforesis con base en gradiente de pH, utilizando un sistema Multiphore (Amersham Pharmacia Biotech AB, Bjökgatan 30, 75182 Upsala, Suecia). Para realizar esto, se depositó 50 µl del sobrenadante sobre la franja del gel de gradiente de pH inmovilizado y re-hidratado (Amersham Pharmacia Biotech) y la electroforesis se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

A fin de separar la totalidad de proteínas de acuerdo con sus pesos moleculares, se llevó a cabo una segunda electroforesis SDS-PAGE en los geles derivados de la primera etapa de electroforesis, utilizando un equipo Bio-Rad (Laboratorios Bio-Rad, 2000 Alfred Nobel Drive, Hércules, California 94547 E. U.) bajo condiciones estándar de acuerdo con el método Laemmli (Nature, 277 (1970), 680-688). Para realizar este propósito, las bandas del gel derivadas de la primera electroforesis uni-dimensional se equilibraron con 5 ml/gel de solución amortiguadora de Tris que contenía úrea 6M, 30% v/v de glicerol, 2% p/v de SDS, 2% p/v de DTT y 2.5 % p/v de yodoacetamida. Las bandas del gel luego se colocaron sobre los geles de la segunda electroforesis SDS-PAGE y se realizó la migración de las proteínas en un equipo Bio-Rad a 40 mA y a una temperatura de 12°C durante 9 horas.

De este modo, los geles producidos se tñieron con plata según el método de Bjellqvist y otros (Electrophoresis, 14 (1993), 1357-1365).

Luego, las imágenes se analizaron con ayuda de un explorador (Scanner XRS 12CX, X-Ray Scanner Corporation, 4030 Spencer Street, Torrance, California 90503 E. U.) y con ayuda del programa de Imagen de Bio (Bio Image, 777 East Eisenhower Parkway, Suite 950, Ann Arbor, Michigan 48108, E. U.).

Las proteínas separadas por electroforesis bi-dimensional se transfirieron sobre membranas de PVDF en una solución amortiguadora de CAPS, con ayuda de una celda Transblot de Bio-Rad (Bio-Rad, E. U.) que se mantuvo a 420 mA y a una temperatura de 4°C durante 1 hora y 30 minutos. Entonces, las membranas se tñieron con azul de Coomassie, de acuerdo con las instrucciones de Applied Biosystems (Applied Biosystems Inc., 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404 E. U.).

Luego de la transferencia, antes de guardar las membranas en pequeñas bolsas plásticas a 18°C, se secaron a temperatura ambiente.

Se realizó la micro-secuenciación de las secuencias N-terminal de las manchas (blots) de proteína, con la ayuda de un secuenciador del tipo Beckman LF 3000 y del sistema HPLC Gold Bekman (Bekmann Instruments Inc., 250 Harbor Boulevard Box 3100, Fullerton, California 92634 E. U.).

El perfil electroforético bi-dimensional bajo condiciones desnaturalizantes de las hojas de *C. arabica*, mostraron una proteína que posee un peso molecular aparente de alrededor de 16 kDa y un punto isoeléctrico de 6.1 que se presentó en altas cantidades. Al compararla con otros perfiles

electroforéticos bi-dimensionales de tejidos no fotosintéticos de *C. arabica*, p. ej., endosperma de granos verdes de café, embriones somáticos (estado de torpedo); parece ser que la acumulación de esta proteína es específica de la hoja. La secuencia N-terminal de esta proteína se identificó mediante la degradación de Edman.

II. Construcción de la librería de cDNA de la hoja del café

Se extrajo la totalidad del RNA mensajero, de acuerdo con Rogers y otros (Plant Physiol Biochem, 37 (1999), 261-272), a partir de hojas jóvenes de café de *Café arabica* variedad Caturra 2308, crecidas en invernadero con temperatura de aproximadamente 25°C, 70% de humedad e iluminación natural. Se molieron finamente las hojas en nitrógeno líquido y al final de la extracción, el RNA se suspendió en agua estéril y se cuantificó por adsorción a 260 nm. El mRNA Poli (A)⁺ se purificó del RNA total en un sistema de purificación oligo-dT (Qiagen INC., 9600 De Soto Avenue, Chatsworth, CA, 91311 E. U.) y se monitoreo su calidad mediante electroforesis y ensayos de translación *in vitro* para mRNA.

La biblioteca de cDNA se construyó como se describe en Rogers (supra), se esperó que el cDNA se ligara en el pCR Script Cam SK (+) (Stratagene, 11011 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, E. U.). La mezcla del ligamiento se utilizó para transformar *E. coli* XL 10 Gold km^R (Stratagene, E.U.). Las transformadas se seleccionaron sobre agar de LB (Luria-Bertani) que contenía 30 µg/ml de cloranfenicol en presencia de IPTG y X-Gal (Sambrook y otros, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor NY. 1989).

III. Separación de la longitud total del rbcS del cDNA

Se realizó un experimento de RT-PCR, utilizando 10 ng de RNA total de las hojas, como plantilla, en presencia de transcriptasa reversa AMV y polimerasa *Tfi* DNA como se describe en el sistema RT-PCR kit Access (Promega Corporation, 2800 Woods Hollos Road, Madison, Winsconsin 53711 E. U.). Los cebadores (primers) generados utilizados fueron RBC1 (SEQ ID No 6) y RBC3 (SEQ ID No. 7). El RBC1 fue deducido del secuenciamiento N-terminal del polipéptido del café aislado como el anterior (SEQ ID No. 4). En este caso, al compararla con otras proteínas RbcS, la histidina en la posición 1 se corrigió y se reemplazó por una metionina y el residuo no determinado en la cuarta posición se consideró como un triptófano (W). El RBC3 se dedujo de la secuencia de aminoácido YWTMWK (SEQ ID No. 5) que corresponde a una región altamente conservada en otras proteínas RbcS de plantas. La reacción de PCR (Patente E.U. 4,683,195 y Patente E.U. 4,683,202) se realizó en un Robocycler (Stratagene, E.U.) por 50 ciclos a 94°C por 60 segundos, 50°C por 90 segundos y 68°C por 2 minutos, seguida por una extensión final a 68°C por 7 minutos. Bajo estas condiciones, únicamente uno de los fragmentos de PCR de aproximadamente 200 bp se observó luego de realizar electroforesis en gel de agarosa y se clonó en el vector pGEM-T easy (Promega, E. U.) como se describe por el proveedor, su análisis de secuencia reveló que efectivamente correspondía a un rbcS parcial de cDNA de 213 bp, flanqueado por los cebadores (primers) RBC1 y RBC3 en sus extremidades y localizado entre los nucleótidos 234 y 446 de la secuencia SEQ ID No.2.

Los cebadores (primers) específicos RBC11 (SEQ ID No.8) y RBC31 (SEQ ID No.9), que se derivan de RBC1 y RBC3, respectivamente y se utilizaron para apantallar por PCR, 300 clones individuales de *E. coli* que contienen un cDNA de hoja. Esta reacción se llevó a cabo en un volumen total de 50 μ l que contenían 3 unidades de polimerasa *Taq* DNA (Stratagene, E. U), KCl 50 mM, $MgCl_2$ 1.5 mM, gelatina 0.1 mg/ml, 0.2 mM de cada dNTP, cebadores (primers) 0.25 μ M y Tris HCl 10 mM pH 8.8. La reacción de PCR se realizó utilizando un Robocycler (Stratagen, E. U.) por 30 ciclos a 94°C por 60 segundos, 65°C por 75 segundos y 72°C por 2 minutos, seguida por una extensión final a 72°C por 7 minutos. Únicamente un clon apareció positivo.

IV. Análisis del rbcS de cDNA del café

Este cDNA (934 bp) contenía una región 5' no transformada de 50 bases y una región 3' no transformada de 278 bases que incluye un sitio putativo de poliadenilación (AATAAA), localizado 30 bases arriba de la cola de poliA que contiene 62 residuos de adenosina. El cDNA también contenía un marco de lectura abierto de 543 bases que codifican para una proteína de 181 aminoácidos presente en la secuencia SEQ ID No.3. Esta proteína tiene un peso molecular teórico de aproximadamente 20.4 Kda y un pI (punto isoeléctrico) de 8.86 en su forma madura. Al comparar su secuencia N-terminal, que comienza en la posición 59 en la secuencia SEQ ID No.3, se dedujo el peso molecular de la forma procesada de esta proteína de aproximadamente 15.6 Kda con un pI de 6.1. Estos datos se correlacionaron con aquellos estimados por electroforesis en gel 2D, como se describió anteriormente.

V. Clonación del gen rbcS

Con el fin de aislar el gen rbcS que corresponde al cDNA clonado anteriormente, se diseñaron dos cebadores (primers) sintéticos designados RBC100 y RBC101, para realizar una reacción de PCR utilizando como plantilla 50 ng de DNA genómico de café. Este DNA genómico se purificó de acuerdo con el protocolo descrito anterior (Paillard y otros, Theor Appl Genet, 93 (1996), 41-47). El cebador (primer) RBC100 corresponde a la secuencia SEQ ID No.10 y se localizó entre los nucleótidos 28 y 59 en la secuencia SEQ ID No.2.

El cebador (primer) RBC101 se localizó luego de la secuencia que codifica la translación, en la hebra antisentido de la secuencia de nucleica SEQ ID No. 2, entre los nucleótidos 650 y 681. Se realizó una reacción de PCR como se describió anteriormente, por 45 ciclos a 94°C por 60 segundos, 55°C por 90 segundos y 72°C por 4 minutos seguido por una extensión final a 72°C por 7 minutos, luego por electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR, se detectó únicamente una banda de aproximadamente 1000 bp y se clonó en el vector pGEMT-easy de acuerdo con la recomendación del proveedor (Promega, E.U.) y se secuenció. Su análisis reveló, que correspondía al gen rbcS que contiene los intrones cortos de 120 y 235 bp respectivamente, localizados en la secuencia SEQ ID No.1, entre los nucleótidos 1229 y 1350 para el primero y entre los nucleótidos 1484 y 1720 para el segundo. Dado el hecho que este gen pertenece a una familia de multigenes, como se observó en otras plantas, (Dean y otros 1989), se denominará mas adelante rbcS1.

50
47

VI. Análisis de hibridación de Southern

Se purificó el DNA genómico del café de acuerdo con el protocolo descrito anterior (Paillard y otros, Theor Appl Genet 93, 41-47, 1996). Se realizó la digestión del DNA genómico (10 µg) mediante enzimas de restricción y se realizó la mancha (blot) sobre una membrana de nylon como se describió previamente (Southern, J Mol Biol 98, 503-517, 1975) y se sondeó con el producto de PCR de 1-kb P³²-marcado que corresponde al gen *rbcS1*. Se utilizaron cinco enzimas de restricción (*DraI*, *HincII*, *HindIII*, *SspI* y *EcoRI*) para cortar el DNA genómico del café. Este DNA se hidrolizó con una sonda que corresponde al gen *rbcS1* 1Kb antes aislado, luego de la amplificación del DNA genómico mediante los cebadores (primers) RBC100 (SEQ ID No. 10) y RBC101 (SEQ ID No. 11). Este producto de la amplificación se purificó en un cartucho Microcon 100 (Amicon INC, 72 Cherry Hill Drive, Beverly, Massachussets 01915 E. U.) y 50 ng de este fragmento se marcaron por extensión al azar del cebador (primer) con 50 µCi de [α -³²P]dCTP de acuerdo con el kit Megaprime (Amersham, R. U.). Además, el filtro de nylon se pre-hibridó por 4 horas a 65°C en una solución que contenía SSC 6X, Denhart 1X (0.2% de Ficoll, 0.2% de polivinilpirrolidona, 0.2% de fracción IV de BSA) y 50 µg/ml del DNA desnaturalizado de esperma de salmón. El filtro de nylon fue entonces hibridado durante 10 horas a 65°C en la misma solución con la sonda marcada y luego se lavó tres veces durante 30 minutos a 65°C en presencia de: SSC 2X -0.1% de SDS, SSC 1X -0.1% de SDS y SSC 0.1X -0.1% de SDS, sucesivamente.

Se observaron dos bandas cuando se cortó el DNA del café por las enzimas *DraI*, *HindI* y *EcoRV*, mientras que ningún sitio de restricción se encontró

presente en la parte del gen *rbcS1* que hibridó la sonda (figura 3). Al comparar con la secuencia SEQ ID No. 1, se esperaba una señal mayor que 1.75-kb cuando el DNA del café fuese cortado por la enzima *DraI*, que se caracteriza efectivamente por una fuerte hibridación en 2.25-kb y además una señal tenue (1.3-kb). Se detectó una fuerte hibridación (0.8-kb) por la digestión con la enzima *HincII*, que corresponde probablemente al fragmento esperado del gen *rbcS1*, que es interno a la sonda. También, de nuevo se reveló una señal discreta en 1.5 kb. Se presentó un sitio de *SspI* en el gen *rbcS1*, que dirige teóricamente a la detección de dos fragmentos mayores que 1.6 y 0.4 kb. Efectivamente, se observaron tres bandas de hibridación de 0.9, 2.25 y 2.75 kb. Se puede realizar la misma clase de análisis para la digestión con la enzima *EcoRI*, con dos fragmentos esperados mayores que 1.45 y 0.55 kb y la presencia de tres bandas en 2.3, 4.2 y 10 kb. Juntos, estos análisis confirmaron la existencia de una familia de genes *rbcS* en el café con algunos de ellos probablemente organizados como uno tras otro.

VII. Expresión del gen *rbcS* en diferentes tejidos del *C. arabica*.

Se realizó un experimento de manchas de northern para analizar la expresión del gen *rbcS* en diferentes tejidos cosechados de *café arabica* variedad Caturra 2308, criado en invernadero, esto es, hojas, raíces, tallos, flores, como también en granos verdes de café a las 35 semanas luego de florecer. Para realizar esto, se desnaturalizó 20 µg del RNA total durante 15 minutos a 65°C en solución amortiguadora 1X MOPS (MOPS 20 mM, acetato de sodio 5 mM, EDTA 1 mM, pH 7) en presencia de formamida (50%) y formaldehído, concentración final 0.66 M, que se separaron luego por electroforesis. El RNA total se transfirió luego y se fijó sobre una

membrana de nylon cargada de manera positiva, de acuerdo con las recomendaciones suministradas por el proveedor (Boehringer Mannheim, DE). Se sintetizó una sonda mediante una reacción de PCR que corresponde a 200 bp del gen *rbcS*, utilizando los cebadores (primers) RBC11 y RBC31 descritos anteriormente y como plantilla la longitud total del gen *rbcS* previamente clonado. El fragmento obtenido luego de la amplificación se purificó en un cartucho Microcon 100 (Amicon INC, 72 Cherry Hill Drive, Beverly, Massachussets 01915 E.U.) y 50 ng de este fragmento se marcaron por extensión al azar del cebador (primer) con 50 μ Cl de [α - 32 P]dCTP de acuerdo con el kit Megaprime (Amersham, R.U.). Además, el filtro de nylon se pre-hibridó por 4 horas a 65°C en una solución que contenía SSC 6X, Denhart 1X (0.2% de Ficoll, 0.2% de polivinilpirrolidona, 0.2% de la fracción IV de BSA) y 50 μ g/ml del DNA desnaturalizado de esperma de salmón. El filtro de nylon fue entonces hibridado durante 10 horas a 65°C en la misma solución con la sonda marcada y luego se lavó tres veces durante 30 minutos a 65°C en presencia de: SSC 2X -0.1% de SDS, SSC 1X -0.1% de SDS y SSC 0.1X -0.1% de SDS, sucesivamente.

Este análisis demostró que la sonda *rbcS* se hibridó con una sola clase de mRNAs. Para la cual el tamaño estimado fue aproximadamente de 900 bases, cercana a la longitud de la secuencia nucleica SEQ ID No. 2. También se demostró que los mRNAs específicos de *rbcS* son muy abundantes en las hojas, cualquiera que sea su edad, ligeramente detectables en flores pero ausentes en otros tejidos no fotosintéticos probados tales como raíces, granos maduros, tallos y embriones somáticos (figura 1).

VIII. Aislamiento del promotor del gen *rbcS* de *Café arabica*

El promotor del gen *rbcS* se aisló por varias PCRs inversas de acuerdo con el método de Ochman y otros (Genetics 120 (1988), 621-623). Para realizar esto, el DNA nuclear del *C. arabica*, (0.5 a 1 µg) se digestó con varias enzimas de restricción, por ejemplo tales como *Bst*BI y *Nde*I y luego se trató con fenol:cloroformo (1:1) y se precipitó por 12 horas a -20°C en presencia de acetato de sodio a concentración final de 0.3 M y etanol (2.5 volúmenes). Después de centrifugar a 10,000 g durante 15 minutos a 4°C, se trató el DNA como se describió anteriormente (WO 99/02688).

a) Reacción de PCR inversa No. 1

Esta primera reacción se llevó a cabo utilizando el oligonucleótido sintético RBC102, que posee la secuencia de nucléica SEQ ID No. 12 y el oligonucleótido RBC104, que posee la secuencia de nucléica SEQ ID No. 13. Esta reacción de PCR inversa se realizó en presencia de 50 ng de DNA genómico ligado, como se describió anteriormente y se incubó durante 45 ciclos (94°C-60 s, 65°C-60 s, 72°C-4 min.) seguido de un ciclo de extensión final a 72°C por 7 minutos. Se amplificó un fragmento de DNA de alrededor de 600 bp y se derivó a partir de la reacción de PCR inversa en el DNA genómico inicialmente digestado con la enzima de restricción *Bst*BI. Este DNA se clonó entonces en un vector p-GEMT-easy. El análisis de su secuencia reveló que contenía aproximadamente 350 bp arriba del cebador (primer) RBC102, que corresponde a los nucleótidos localizados entre los nucleótidos 731 y 1082 en la secuencia SEQ ID. No.1.

b) Reacción de PCR inversa No. 2

Con el fin de obtener las secuencias nucleicas localizadas arriba del sitio de restricción de *BstBI* que corresponde a los nucleótidos 732 a 737 de la secuencia SEQ ID No. 1, se realizó otra reacción de PCR inversa, esta vez, los oligonucleótidos sintéticos RBC401 y RBC400 se dedujeron a partir de la secuencia de DNA genómico previamente clonada durante la primera reacción de PCR Inversa. RBC401 y RBC400 correspondieron a las secuencias nucleicas SEQ ID No. 14 y SEQ ID No. 15, respectivamente. Esta reacción de PCR inversa se llevó a cabo bajo condiciones idénticas a aquellas descritas para la reacción de PCR inversa No. 1, con la condición que la unión de los oligonucleótidos se realizara a 60°C. Se observó un fragmento de DNA de 1 kb amplificado a partir del DNA genómico inicialmente digerido con la enzima de restricción *NdeI* después de la electroforesis en gel. Este fragmento se trató como se definió anteriormente y su análisis de secuencia reveló que contenía alrededor de 890 bp arriba del cebador (primer) RBS401, que corresponde a los nucleótidos localizados en las posiciones 1 y 894 de la secuencia SEQ ID No. 1.

c) Clonación de los fragmentos de DNA genómico

Los experimentos de PCR Inversa a partir de las moléculas lineales quiméricas mediante la unión de fragmentos no contiguos de DNA en el genoma, el uno con el otro (Ochman y otros, 1988). Además, las medidas de la frecuencia de mutación mostraron que la polimerasa *pfu* DNA es de aproximadamente 12 veces más preciso que la polimerasa *Taq* DNA, que redujo la probabilidad de mutaciones puntuales durante las amplificaciones de PCR (Lundberg y otros, *Gene* 108 (1991), 1-6). Por estas razones, se

realizó una reacción de PCR sobre el DNA genómico nativo de *C. arabica* variedad Caturra, en presencia de polimerasa *pfu* DNA. Esta reacción se llevó a cabo en presencia de 50 ng de DNA genómico, en un volumen final de 50 µl que contenía KCl 10 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 6 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8.0, Tritón X-100 0.1%, MgCl_2 2 mM, BSA 10 µg/ml, 0.2 mM de cada dNTP, 3 unidades de polimerasa *pfu* DNA y 0.25 µM de los oligonucleótidos RBC101 y RBC150. Se describió el oligonucleótido RBC101 anteriormente, mientras que el cebador (primer) RBC150 (SEQ ID No. 16) se localizó sobre la hebra sentido de la secuencia nucleica SEQ ID No. 2 y corresponde a los nucleótidos 6 a 35. La mezcla de reacción se incubó durante 35 ciclos (94°C-60 s, 55°C-90 s, 72°C-4 minutos), seguida de un ciclo de extensión final a 72°C por 7 minutos.

Seguida esta PCR, se obtuvo un fragmento sencillo de al rededor de 2 kb y se clonó en el vector pCR-Script Cam SK (+) para dar el vector pRBCS1. Al realizar la secuenciación, mostró que este fragmento de DNA genómico corresponde a la secuencia entre los oligonucleótidos RBC101 y RBC150. Como se describe a continuación, el DNA amplificado durante esta reacción de PCR se utilizó entonces para la construcción de los vectores. Se presenta un esquema que resume estos experimentos en la figura 2.

IX Construcción del vector de transformación genética necesario para el análisis funcional del promotor *rbcS*

Las secuencias localizadas arriba del sitio de partida translacional (ATG en la posición 51 de la secuencia SEQ ID No. 2) y que corresponden a las primeras 1049 bases de la secuencia nucleica SEQ ID No. 1, se analizaron

con el fin de probar su capacidad para controlar la expresión del gen reportero *uidA* en las hojas de plantas transformadas.

Para realizar esto, se preparó un constructor en un vector de transformación binaria pBI101 (Clontech Laboratories Inc., 1020 East Meadow Circle, Palo Alto, California 94303-4230 E.U.). Este vector contenía el gen reportado *uidA* que codifica la β -glucuronidasa (GUS) y el gen bacterial *nptII*, que codifica la neomicina fosfotransferasa, ésta última, confiere resistencia a kanamicina en las plantas transformadas. Estos dos genes bordearon los extremos derecho e izquierdo del T-DNA del plásmido pTIT37 de *Agrobacterium tumefaciens* (Bevan, Nucl. Acids Res. 12, 8711-8721, 1984) que define la región del DNA capaz de ser transferida en el genoma de plantas infectadas con esta bacteria.

El vector pBI101 fue doblemente digerido con la enzima de restricción *HindIII* y *XbaI* de acuerdo con el protocolo definido por el proveedor (Promega, E.U.), a continuación, se obtuvo un fragmento de DNA que contenía el promotor *rbcS* mediante la reacción de PCR realizada con 5 ng del plásmido pRBCS1, en un volumen de 50 μ l que contenía KCl 10 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 6 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8., 0.1% de Tritón X-100, MgCl_2 2 mM, 0.2 mM de cada dNTP, 10 μ g/ml de BSA, 0.25 μ M de los oligonucleótidos sintéticos RBC150H3 y RBC102X1 que corresponden respectivamente a las secuencias SEQ ID No. 17 y SEQ ID No. 18. La mezcla de reacción se incubó durante 30 ciclos (94°C-60 s, 55°C-60 s, 72°C-3 minutos), seguida de un ciclo de extensión final a 72°C por 7 minutos. El producto amplificado por PCR se clonó en el pCR-Script Cam SK (+) como se describió anteriormente para proporcionar el vector recombinante

denominado pRBCS2. Entonces, este vector se digestó con las enzimas de restricción *HindIII* y *XbaI* con el fin de purificar el fragmento de DNA que incluye la región del promotor *rbcS*. Este DNA se clonó en el vector pBI101 que también se había digestado con las enzimas de restricción *HindIII* y *XbaI*, que conduce al vector denominado pRBCS2. Mediante esta aproximación, se obtuvo una fusión translacional entre los 8 primeros aminoácidos de la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa del café y el extremo N-terminal de β -glucuronidasa.

En el plásmido pBI101, el gen reportero *uidA* es silencioso debido a su carencia de promotor. A cambio de ello, este mismo gen se expresó en plantas transformadas con el vector pBI121 debido a que se encuentra bajo control del promotor constitutivo CaMV 35 S (Jefferson y otros, EMBO J., 6 (1987), 3901-3907). Estos dos plásmidos se utilizaron respectivamente como controles negativos y positivos para la expresión del gen reportero *uidA*.

X. Transformación y regeneración de *Nicotiana tabacum*

La transformación de *Nicotiana tabacum* variedad XHFD8 se realizó con el vector pRBCS2 descrito anteriormente, así como con los pBI101 y pBI121, de acuerdo con el protocolo descrito por Horsh y otros (Plant Mol. Biol. Manuel, Gelvin, Schilperoort y Verma Eds, Kluwer, Academic Publishers Dordrecht, Países bajos, A5 (1993), 1-9).

Con el fin de realizar esto, discos foliares de pequeñas plantas (plantlets), las cuales germinaron *in vitro*, se incubaron por 2 minutos aproximadamente con un cultivo transformado de fase estacionaria de *Agrobacterium tumefaciens* diluido en una solución de NaCl al 0.9%, a fin de obtener una medida OD a 600 nm entre 0.2 y 0.3. Luego se secaron sobre papel 3MM

(Whatmann) y se incubaron sin seleccionar presión en una cámara de cultivo en medio MS-stem (sales de MS 4.3 g/l, sucrosa 30 g/l, agar 8 g/l, mioinositol 100 mg/l, tiamina 10 mg/l, ácido nicotínico 1 mg/l, piridoxina 1 mg/l, ácido naftalenacético (ANA) 0.1 mg/l, benciladenina (BA) 1 mg/l) (Murashige y Skoog, *Physiol. Plant* **15** (1962), 473-497).

Los discos se transfirieron tres días después, a un medio MS que se encontraba con suplemento de kanamicina (100 µg/ml) y con cefotaxima (400 µg/ml) con el fin de multiplicar las células transformadas y de esta manera obtener calli¹. Luego, estos discos se subcultivaron cada semana con "medio para tallo MS" fresco.

Luego de 21 a 28 días, las yemas que germinaron se cortaron del calli y se subcultivaron con medio MS estándar, esto es, un medio MS libre de fitohormonas pero con suplemento de kanamicina (100 µg/ml) y cefotaxima (200 µg/ml). Luego de enraizar en un disco de Petri, las pequeñas plantas se transplantaron en materas de loza en un sustrato compuesto de turba y abono, luego crecieron en un invernadero a una temperatura de 25°C con un período de luz de 16 horas. Para cada experimento de transformación, se seleccionaron 30 plantas pequeñas (generación R0). Todas las pequeñas plantas se probaron para ser morfológicamente normales y fértiles; se auto-polinizaron (Selfed) y produjeron semillas (generación R1)

XI. Análisis del DNA genómico de plantas de tabaco transformadas con *Agrobacterium tumefaciens*

¹ N.T. Calli: se refiere a pequeños excrecencias en el verticilo de los pétalos de una flor, en algunas plantas.

El DNA genómico de plantas transgénicas de tabaco se extrajo de las hojas de acuerdo con el protocolo descrito por Rogers y Bendich (Plant Mol. Manuel, Gelvin, Schilpoort y Verma Eds, Kluwer Academic Publishers Dordrecht, Países bajos, A6 (1993), 1.11) y se analizaron posteriormente por PCR y por hibridación molecular, de acuerdo con la técnica de manchas de Southern (Southern Blot).

Las reacciones de PCR se realizaron con 10 ng del DNA en un volumen final de 50 µl que contenía KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8.8, MgCl₂ 1.5 mM, gelatina 0.1 mg/ml, 0.2 mM de cada dNTP, 3 unidades de polimerasa *Taq* DNA, 0.25 µM del oligonucleótido BI104, que tiene la secuencia SEQ ID No. 19 y 0.25 µM del oligonucleótido BI105 que tiene la secuencia SEQ ID No. 20. El oligonucleótido BI104 se localizó a 27 bp abajo del sitio *Bam*HI del plásmido BI101 y el oligonucleótido BI105 se localizó a 73 bp arriba del sitio *Bam*HI del plásmido pBI101. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo durante 30 ciclos

(94°C-30 s, 54°C-30 s, 72°C-2 minutos, seguido de un ciclo de 7 minutos a 72°C (extensión final).

Los fragmentos de DNA amplificados a partir de plantas transgénicas de tabaco, transformadas con los plásmidos pBI101 (control negativo), pBI121 (control positivo) y pRBCS2 tuvieron pesos moleculares de aproximadamente 280 bp, 1030 bp y 1300 bp, respectivamente. En todos los casos, se concluyó que el fragmento inicialmente clonado arriba del gen reportero *uidA* se encontraba intacto.

Se realizó la digestión de 10 µg (diez microgramos) del DNA de plantas de tabaco transformadas con *Agrobacterium tumefaciens* con *Bam*HI. A continuación, los fragmentos de restricción obtenidos se separaron por electroforesis en un gel de agarosa (1%) y el DNA se transfirió sobre un filtro de nylon, antes de hibridarlos independientemente con una sonda *uidA* y una sonda *nptII* descrita en WO 99/02688. Estas dos sondas se purificaron y se marcaron 50 ng por extensión al azar del cebador (primer) con 50 µCi de [α - 32 P]dCTP de acuerdo con el protocolo del kit Megaprime (Amersham, Internacional plc, Amersham Place, Little Chalfont, Buckinghamshire HP7 9NA, R.U.).

Los perfiles de hibridación obtenidos para cada sonda fueron luego comparados, a fin de seleccionar las plantas de tabaco transformadas con *agrobacterium tumefaciens* que tenían integrado dentro de su genoma una copia sencilla no reorganizada del T-DNA. La selección de estas plantas también se confirmó mediante los análisis de los resultados de la segregación del carácter resistente a kanamicina, luego de la germinación *in vitro* de las semillas de R1 de estas plantas en medio MS estándar. Efectivamente, en este caso se observó $\frac{3}{4}$ - $\frac{1}{4}$ de segregación del carácter de resistencia a kanamicina, que es compatible con la integración del T-DNA en un sitio sencillo del DNA nuclear.

XII. Estudio del promotor *rbcS* del café in plantas de tabaco transgénicas

Este estudio se llevó a cabo en las plantas de la generación R0.

Las medidas de la actividad de la GUS se realizaron en las hojas y raíces de acuerdo con el método descrito por Jefferson y otros (1987), se utilizó como sustrato MUG (metil umbeliferil glucuronida) y se midió la aparición de MU

(metilumbeliferoma) mediante fluorimetría. Para realizar esto, las explantaciones foliares (10 mg) y las semillas (aproximadamente 40) se molieron en arena estéril con 300 µl de solución amortiguadora de extracción (Na_2HPO_4 , pH 7.0, EDTA 10 mM, β -mercaptoetanol 10 mM). Los restos celulares se retiraron por centrifugación durante 15 minutos a 4°C y las proteínas solubles en el sobrenadante se cuantificaron mediante el método de Bradford (Anal. Biochem. 72, 248-254, 1976) de acuerdo con el protocolo definido por Bio-Rad (E.U.) y se utilizó BSA como estándar. Las medidas de la actividad de la GUS se realizaron en un placas de microtítulo encubadas a 37°C, utilizando 1 µg de proteínas solubles en 150 µl de solución amortiguadora de reacción (solución amortiguadora de extracción con MUG 1 mM). Las medidas de fluorescencia se expresaron en pmol MU /min/mg de proteínas y se realizaron a una longitud de onda de excitación de 365 nm y una longitud de onda de emisión de 455 nm (FluoroskanII, Labsystem).

Ninguna actividad de la GUS se encontró en las raíces y hojas de WT (plantas no transformadas) como se muestra en la tabla 1, así como, en las plantas transformadas por el vector pBI101. Se encontraron niveles similares de actividades de la GUS como en el control positivo, en ambos tejidos de plantas de tabaco transformadas por pBI121, que confirma el carácter constitutivo del promotor 35S. Para 21 plantas de tabaco independientes transformadas por el vector pRBCS2, la actividad de la GUS se encontró exclusivamente en las hojas, que oscila entre 0.2 a 124 nmol MU min⁻¹ de proteína, mientras que no se encontró ninguna actividad de la GUS en las correspondientes raíces. Para cinco de ellas, se decidió analizar el efecto de la luz sobre el control del gen reportero de la GUS. Por consiguiente, estas plantas se mantuvieron en condiciones de oscuridad por 24 horas, luego de

este período, sus hojas se congelaron de manera rápida en nitrógeno líquido y se probó la expresión de la GUS en la proteína (actividad de la GUS) y el nivel nucleico por manchas de Northern (Northern blot). Las medidas de las actividades de la GUS, mostraron claramente una reducción mayor de esta actividad enzimática en las hojas crecidas en la oscuridad mediante un factor que oscila entre 2 a 40 (promedio del factor de reducción: 13) (cf. Tabla 1, a continuación).

Tabla 1: Actividades de la GUS en plantas de tabaco

	Raíces (R)	Hojas (L)	Hojas en la oscuridad (LD)	N
WT	0	0	Nd	6
pBI101	0	0	Nd	4
pBI121	3.62 (0.6-11)	1.25 (0.3-3.2)	Nd	6
Prbcs2	0	15.2 (0.2-124)	Nd	21
pRBCS2⁽¹⁾	0	16.09 (1.45-52)	1,25 (0-4)	5

El ensayo de fluorimetría para actividad de la GUS se realizó como se describe en Jefferson y otros (EMBO J., 6, 3901-3907, 1987). Las proteínas solubles se extrajeron de las hojas y granos de auto-fertilización a plantas de tabaco en solución amortiguadora de fosfato /fosfato de sodio 50 mM pH 7, Na₂EDTA 10 mM, 40 mM de 2 β-mercaptoetanol) sin detergente. Cualquiera de 1 ó 4 µg de proteína soluble se incubó con MUG 1 mM (4-metil-umbeliferil glucuronida) en un 200 µl finales de mezcla de reacción. La fluorescencia se midió a intervalos de 2 minutos durante 40 minutos con un fluorímetro

Flouroskan II (Thermo Labsystems Oy, Sorvaajankatu 15, P.O. Box 208, FIN-00811 Helsinki, Suomi). Se utilizó como estándar para la fluorescencia una solución de 4-metilumbeliferona (MU) en solución amortiguadora.

La actividad de la GUS se midió en: hojas frescas crecidas a la luz (L), hojas crecidas en la oscuridad 24h (LD) y raíces (R). Se indican los nombres de los plásmidos, como también el número de transformadas probadas (n). Los valores indicados, representa el promedio de la actividad de la GUS para varias transformadas independientes (n) expresadas como picomoles de 4-MU (metil-umbiliferona) por minuto por mg de proteínas totales. Los valores entre paréntesis representan valores extremos. (nd) no determinado. (1) cinco transformadas entre 21 que fueron probadas.

Este resultado también se confirmó mediante manchas de Northern (northern blot), que demostró una disminución importante de mRNA específico de *uidA* en hojas de transformantes crecidas en la oscuridad, al comparar con las hojas de transformantes crecidas a la luz en transformadas. Estos dos resultados demostraron que el promotor *rbcS* del café probado en plantas de tabaco transformadas, confieren tanto la especificidad a la hoja como la regulación a la luz de la expresión del gen en esta planta. Esto se puede explicar mediante el hecho de que este promotor contiene un elemento semejante a la caja TATA, localizado 35 bp arriba del extremo 5' del cDNA como también un motivo CCAAT a alrededor de 80 bp arriba de la caja anterior. Un análisis más detallado también reveló que esta secuencia del café contiene varios elementos sensibles a la luz (Light-Responsive Elements LRE) conocidos por ser esenciales para la foto-regulación de la expresión del gen en otras plantas.

Los resultados anteriores demostraron que el promotor *rbcS1* del café contiene todas las secuencias del DNA requeridas para regular la expresión del gen en una forma específica de tejido y de la luz y demuestra que los motivos del DNA del café son reconocidos de manera correcta por los factores que actúan en forma *trans*.

REIVINDICACIONES

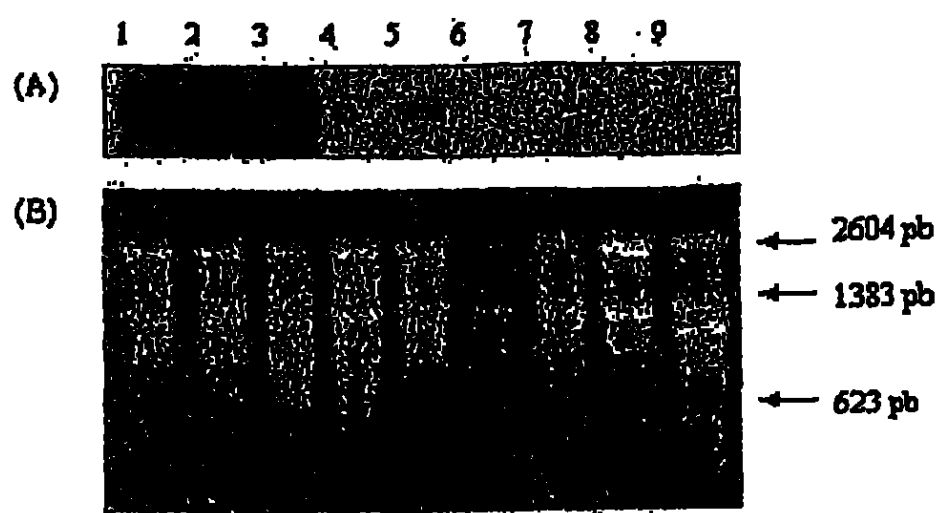
1. Una secuencia de nucleótidos a partir del nucleótido 1 al 1067 de la SEQ ID No. 1 o partes funcionales de la misma.
2. Una secuencia de nucleótidos identificada por la SEQ ID No. 1 o variantes funcionales de la misma, que codifica una proteína *rbcS* del café.
3. Una secuencia de nucleótidos tal como está identificada por la SEQ ID No. 2 o variantes funcionales de la misma, que codifica una *rbcS* proteína del café.
4. Un vector que contiene un nucleótido conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Una secuencia polipeptídica tal como está identificada por la SEQ ID No. 3.
6. Un método para la expresión de un gen en plantas que comprende el paso de incorporar una secuencia nucleótida de acuerdo a la reivindicación 1, en dichas plantas.
7. El método de acuerdo a la reivindicación 6, en donde el paso de incorporar una secuencia nucleótida en una planta comprende el paso de seleccionar las plantas del grupo de café, tomate, cacao, soya y achicoria.

8. Una planta recombinante transformada con al menos una secuencia de nucleótidos conforme a la reivindicación 1.

9. La planta recombinante conforme a la reivindicación 7, la cual es café, tomate, cacao, soya y achicoria.

67
64.

Figura 1



Leyenda:

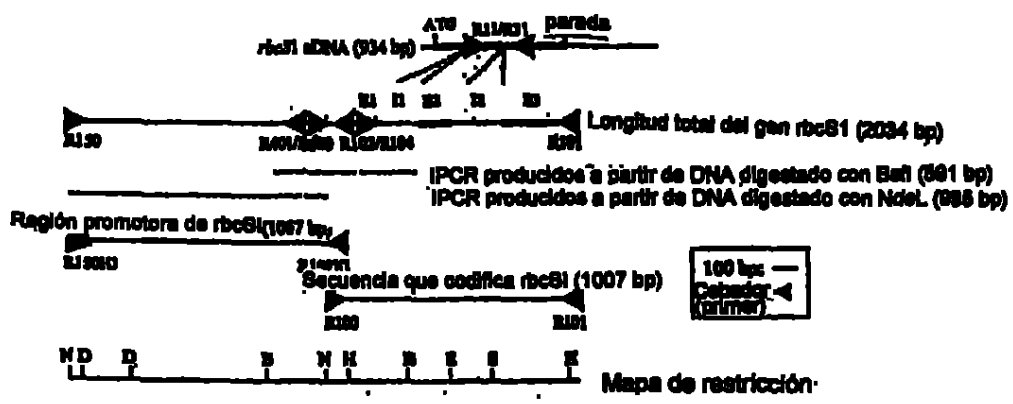
(A): Análisis de manchas de Northern (Northern-blot) de RNA total (20 μ g) de varios tejidos de café probados con el cDNA *rbcS*.

(B): Preparaciones de RNA total separadas mediante electroforesis en gel de agarosa y teñido con bromuro de etidio. También mediante las flechas se indican los pesos moleculares.

Carril 1: hojas jóvenes (longitud <5 cm); carril 2: hojas medias (longitud >5 cm y <10 cm); carril 3: hojas viejas (longitud > 10 cm); carril 4: flores maduras; carril 5: flores en botón; carril 6: tallos; carril 7: raíces; carril 8: granos de 35 semanas luego de florecer; carril 9: embriones somáticos de *C. Arabica*.

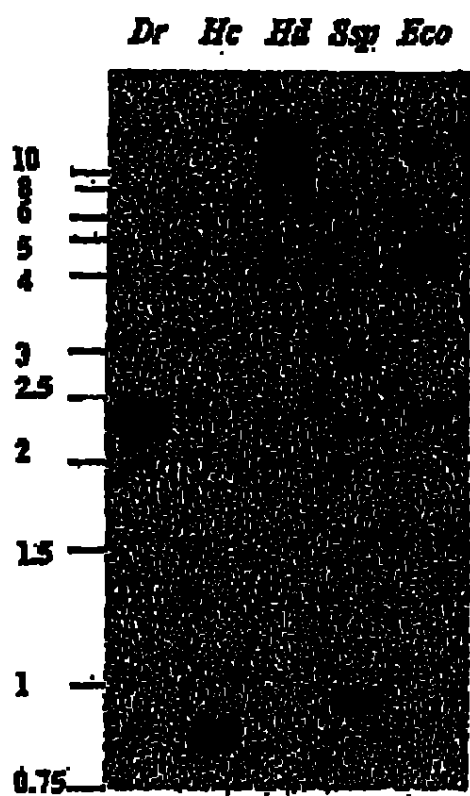
65

Figura 2



69
66

Figura 3 Manchas de Southern (Southern-Blot)



Manchas de Southern (Southern-blot) del DNA genómico de *C. arabica* digestado con enzimas de restricción *Dra*I (carril *Dr*), *Hinc*II (carril *Hc*), *Hind*III (carril *Hd*), *Ssp*I (carril *Ssp*) y *Eco*RI (carril *Eco*) e hibridado con el gen *rbc*SI. También se indican al lado izquierdo las marcas de las distancias de recorrido molecular (kbp).

70
67

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Société des Produits Nestlé S. A.

<120> Gen promotor específico de la hoja del café

<130> 80322

<150> EP 0111573.0

<151> 2001-05-11

<160> 20

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 2034

<212> DNA

<213> Café arábica

<400> 1

catatggaaa ttaatatgca tcaatccttc tototctott tttaaaaaa attaatgttt	60
atatgtcttc ttcactcctt taatgttgca attagcttgt aaggttaagt tgtggggaag	120
atatatggat agttgtcgga ggaacaattt tttttttttt ttgagacaat aacaattgta	180
taacctattt tatcctaac tatstagaat agggagtota agaaaaotg tgttaggaac	240
taacagatac acagacctta ctanattaaa gagatatttt gacaccaott ttanattttg	300
ttcaotgcag gtgaatttg agccctaac taacatacac aggtcactoa ttgacaatca	360
acgagccaaag ctocgtggtt tgttgaggga acatttatga aantaaggaa ggcaacggcc	420
atcacaccag agtctatgtc ogtocagaaa tgtactgaag acaattgatg tagcaataa	480
aatatcttaa gaaacgata agtttaotca atacatttga gtctgagcaa gggaaatggc	540
atcgagaaag gaaagaaocg cgaattttct gaactgtaga tgtctgaagta tgattctggg	600
ctcgaaacag aamtcaaga atttttattt ttattttttt tgtgttttgg gtttgaaaa	660
aagatatatc gactggaccc aaaaattaac aacgttaot tatontcott ogattonagt	720
ccttcatttc attcgaaaaa cagatgagat aagatgattg aaataaato gccacgtggc	780
agtgcgagtg tggtggttaa tgataaggct aaggtccaaa aaccttgtag cttcattgtg	840
tcattaagta ggyaatgttg tgaaccaat aatccaatgg cggagatgg tctaagatca	900
ggatgatgga tttttgcocg ttagatacag gaacctgga agagcaagta gttgcattat	960
atatagaagg ggttctgtag agcaaggcc atatgattga ttcoottgct gttattagaa	1020
gaanaaagga agggacagag ctacgagaa tggcactcto antgatctca toggcagctg	1080
ttgcacccac caaccgggcc agocctgcto aagctagcat ggttgaccca ttcaacggcc	1140
tcaangccga ttcttcattc ocaatttcaa agaagtcagt cgaattact tcccttgcaa	1200
ccaacgggtg aagagtcag tgcattcagg taccocacaa caaccgcaaa atactagcac	1260

71
68

tctctctcta tatatgtaca tgtatgcatt caacttggat ttccactcga gtttgattcg	1320
anccacacaca cacacacttt taatttttagg tgtggccacn aaggggautp mayangtaog	1380
agactttgtc atatcttcca gctctcaccg acgagcaatt gctcnaggaa attgattacc	1440
ttatccgcag tggatgggtt ccttgcttgg aattcgagtt gggggtanaa aaaaaaanaa	1500
aaggttacac agtaangatg tttgcctgta ctaacatatt atttttcagt ggcggaaaga	1560
tttatacaaa caaacaaata aaaggggtat agagacaggc atttaatat tatactgaag	1620
ctaatacgtt cgtttgggta atgttaatag cagttagata gactagatag attaatatoc	1680
tgatgcgggg tttgtgattt ggtgggtttg aacgtgtaga aaggatttgt gtaccgtga	1740
taccacaggt caccgggata ctatgacgga cgtacttgga ccattgtgga gctgcctatg	1800
tacggctgca cggacgcacac tcaggtgctg aacgaggttg gggaaatgct gaaggaaatc	1860
ccaaattgct gggtcaggat catcgattc gacacgctcc gtcagggtga gtgcacagt	1920
ttcatlgccg ccaagccaaa gggtttctaa gcccttctt cacaatttg gccccggccc	1980
ctcaaatttg aggtgcgat tcttggcagt tgacagttag ttgtcaataa aatt	2034

<210> 2
<211> 934
<212> DNA
<213> *Café arabica*

<400> 2	
atttccttgc tgttattaga agaaaaagg aagggaaaga gctagcgaga atggcatcct	60
caatgatctc ctgcgcagct gttgocacca ccaccagggc cagccctgct caagctagca	120
tggttgcacc ctccaacggc ctcaagccg ctctctcatt ccccatcttc aagaagtcoy	180
tcgacattac ttcccttgcc accaacggtg gaagagtcga gtgcattgag gtgtggccac	240
caaggggact gaagaagtac gagactttgt catatcttcc agatctcacc gacgagcaat	300
tgctcnagga aattgattac ctatccgca gttgatgggt tccctgcttg gaattcgagt	360
tggagaaagg atttgtgtac cgtgaatacc acaggtcacc gggatactat gacggagcgt	420
actggaccat gtggaaactg cctatgtacg gctgcacgga cgcactcaa gtgctgaacg	480
aggttgggga atgcctgaag gaatacccaa attgctgggt caggatcttc ggattcgaca	540
acgtcogtca ggtgcagtgc atcagtttca ttgccgcca gccaaagggt ttctaagccc	600
cttcttcaca aatttggccc cggccctcca aatttgaggc tgcgattctt ggcagttgac	660
agttagttgt caataaatt gagaactggg gctgtacttt tngctgtttt tcatltttat	720
ttgccttttc cgtggtggtc tggttttgot tctattcttc tcccttcttt ttttcogctt	780
tgacattcgg ttccggtata tgtttccgga ttccaaaga tatgtatgag acttttaata	840
atgaagccg ctttatattc gtctgctacg ctaaaaaaa naaaaaaaaa aaaaaaaaaa	900

72
69

AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

934

<210> 3
<211> 181
<212> PRT
<213> Café arabica

<400> 3

Met Ala Ser Ser Met Ile Ser Ser Ala Ala Val Ala Thr Thr Thr Arg
1 5 10 15

Ala Ser Pro Ala Gln Ala Ser Met Val Ala Pro Phe Asn Gly Leu Lys
20 25 30

Ala Ala Ser Ser Phe Pro Ile Ser Lys Lys Ser Val Asp Ile Thr Ser
35 40 45

Leu Ala Thr Asn Gly Gly Arg Val Gln Cys Met Gln Val Trp Pro Pro
50 55 60

Arg Gly Leu Lys Lys Tyr Glu Thr Leu Ser Tyr Leu Pro Asp Leu Thr
65 70 75 80

Asp Glu Gln Leu Leu Lys Glu Ile Asp Tyr Leu Ile Arg Ser Gly Trp
85 90 95

Val Pro Cys Leu Glu Phe Glu Leu Glu Lys Gly Phe Val Tyr Arg Glu
100 105 110

Tyr His Arg Ser Pro Gly Tyr Tyr Asp Gly Arg Tyr Trp Thr Met Trp
115 120 125

Lys Leu Pro Met Tyr Gly Cys Thr Asp Ala Thr Gln Val Leu Asn Gln
130 135 140

Val Gly Glu Cys Leu Lys Glu Tyr Pro Asn Cys Trp Val Arg Ile Ile
145 150 155 160

Gly Phe Asp Asn Val Arg Gln Val Gln Cys Ile Ser Phe Ile Ala Ala
165 170 175

Lys Pro Lys Gly Phe
180

<210> 4
<211> 15
<212> PRT
<213> Café arabica

78
70

WO 02/092822

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> "X" = residuo no-determinado

<400> 4

His Gln Val Asa Pro Pro Arg Gly Leu.Lys Lys Tyr Glu Thr Leu
1 5 10 15

<210> 5
<211> 6
<212> PRT
<213> Café arabica

<400> 5

Tyr Trp Thr Met Trp Lys
1 5

<210> 6
<211> 17
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> RBC1 primer

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(15)
<223> "n" = a ó g ó c ó t/u, no conocido u
otro.

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> "n" = a ó g ó c ó t/u, no conocido u.
otro.

<400> 6
atgaagtgtt ggcctcc

<210> 7
<211> 18
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> RBC3 primer

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> "n" = a ó g ó c ó t/u, no conocido u
otro.

<400> 7
yttccacatn gtccarta

<210> 8
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> RBC11

<400> 8
atgcaggtgt gccaccaa g gga 24

<210> 9
<211> 25
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> RBC31

<400> 9
ccacatggtc cagtaggto cgtca 25

<210> 10
<211> 30
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> RBC100

<400> 10
ggaggggaa gagctagcga gactggccto 30

<210> 11
<211> 30
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> RBC101

<400> 11
aattttattg acaactaact gtoaactgoc 30

<210> 12
<211> 30
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> RBC102

<400> 12
acagctgccg aggagatcat tgaggatgoc 30

<210> 13

<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia artificial	
<220>		
<223>	RBC104	
<400>	13	
cagggccagc cctgctcaag ctatcatgg		29
<210>	14	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia artificial	
<220>		
<223>	RBC101	
<400>	14	
aacgggcaaa atccatcat cctgatct		28
<210>	15	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia artificial	
<220>		
<223>	RBC100	
<400>	15	
ggaaacatgg aagagcaagt agttgca		27
<210>	16	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia artificial	
<220>		
<223>	RBC150	
<400>	16	
ggaaattaat atgcatcaat ccttctctct		30
<210>	17	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia artificial	
<220>		
<223>	RBC150H3	
<400>	17	
cacaaagcttg gaatttaata tgcatacata cttctctct		39
<210>	18	
<211>	41	
<212>	DNA	
<213>	Secuencia artificial	

<220>
<223> NUC102X1

<400> 18
ctagtctaga caggagatc attgaggatg cacttctoga' t 41

<210> 19
<211> 30
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> BI104

<400> 19
tttgatttca cgggttggg tttctacgg 30

<210> 20
<211> 30
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> BI105

<400> 20
ggctcgtatg ttgtgtggaa ttgtgaggg 30

Listado De Secuencias

SEQ ID NO. 1 gen

CATATGGAAATTAATATGCATCAATCCTTCTCTCTCTCTTTTFAAAAAAATTA
AGTTTTATATGTCTTCTTCACTCCTTTAATGTTGCAATTAGCTTGTAAGGTAAG
GTTGTGGGGAAGATATATGGATAGTTGTCGGAGGAACAATTTTTTTTTTTTTT
GAGACAATAACAATTGTATAACCTATTTTATCCTAAACTATATAGAATAGGGA
GTCTAAAGAAACTCGTGTTAGGAACTAACAGATACACAGACCTTACTAAATTA
AAGAGATATTTTGACACCACTTTTAAATTTTGTTCAGTGCAGGTGAAATTTGAG
CCCTACATAACATACACAGGTCCCTCCTTGACAATCAACGAGCCAAGCTCCG
TGGTTTGTGGAGGAACAATTATGAAAATAAGGAAGGCAACGGCCATCACAC
CAGAGTCTATGTCCGTCCAGAAATGTACTGAAGAACAATGATGTAGCAAATA
AAATATCTTAAGAAAACGATAAGTTTACTCCATACATTTGAGTCTGAGCAAGG
GAATGGCGATCGCAGAAGGAAAAGACCGCGACATTTCTGCACTGTAGCTGCT
GCAGTATGATTCTGGGCTCGAAAACGAAATCAAAGAATTTTATTFTTATTTT
TTTGTGTTTTGGGTTTGAAAAAAGATATATCGACTGGACCCAAAATTAACCA
ACCGTTACTTATCATCCTTCGATTACGTCCTTCCATTCAATGAAAAACAGAT
GAGATAAGATGATTGAAAATCAATCGCCACGTGGCAGTGCGAGTGTGGTGGT
TAATGATAAGGCTAAGGTCCAAAAACCTTGTGCCTTCATGTGGTCATTAAGTA
GGGAATGTGGTGAACCACATAATCCAATGGCGGACGATGGTCTAAGATCAGG
ATGATGGATTTTTGCCCCGTTAGATACAGGAACCATGGAAGAGCAAGTAGTTGC
ATTATATATAGAAAGGGTTCTGTAGAGCAAAGGCCATATGATTGATTCCCTTG
CTGTTATTAGAAGAAAAAAGGAAGGGAACGAGCTAGCGAGAATGGCATCCTC
AATGATCTCCTCGGCAGCTGTTGCCACCACCACCAGGGGCCAGCCCTGCTCAAG
CTAGCATGGTTGCACCCCTCAACGGCCTCAAAGCCGCTTCTTCATTCCCCATTT
CCAAGAAGTCCGTCGACATTACTTCCCTTGCCACCAACGGTGGAAGAGTCCAG
TGCATGCAGGTACCCACACCAACCGCAAAATACTAGCACTCTCTCTCTATAT
ATGTACATGTATGCATTCAACTTGGATTTCCACTCGAGTTTGATTGGAACACAC
ACACACACACTTTTAATTTTAGGTGTGGCCACCAAGGGGACTGAAGAAGTACG
AGACTTTGTCATATCTTCCAGATCTCACCGACGAGCAATTGCTGAAGGAAATT
GATTACCTTATCCGCAGTGGATGGGTTCCCTTGCTTGGAATTCGAGTTGGAGGT

75

[illegible]

SEQ ID NO. 3 Secuencia de la proteína

MASSMISSAAVATTTRASPAQASMVAPFNGLKAASSFPISKKSVDITSLATNGGRV
QCMQVWPPRGLKKYETLSYLPDLTDEQLLKEIDYLIRSGWVPCLEFELEKGFVYR
EYHRSPGYDGRYWTMWKLPMYGCTDATQVLNEVGECLKEYPNCWVRIGFDN
VRQVQCISFLAAKPKGF

SEQ ID NO: 4 N- Secuencia de la proteína RbcS

HQVXPPRGLK KYETL

SEQ ID NO: 5 Secuencia conservada de la proteína RbcS en planta

YWTMWK

SEQ ID NO: 6 Primer RBC1

ATGCARGTTT GGCCICC

SEQ ID NO: 7 Primer RBC3

YTTCCACATI GTCCARTA

SEQ ID NO 8: RBC11

ATGCAGGTGT GGCCACCAAG GGGA

SEQ ID NO 9: RBC31

CCACATGGTC CAGTAGCGTC CGTCA

SEQ ID NO 10: RBC100

GGAAGGGAAC GAGCTAGCGA GAATGGCATC

SEQ ID NO 11: RBC101

80
77

AATTTTATTG ACAACTAACT GTCAACTGCC

SEQ ID NO 12: RBC102

ACAGCTGCCG AGGAGATCAT TGAGGATGCC

SEQ ID NO 13: RBC104

CAGGGCCAGC CCTGCTCAAG CTAGCATGG

SEQ ID NO 14: RBC401

AACGGGCAAA AATCCATCAT CCTGATCT

SEQ ID NO 15: RBC400

GGAACCATGG AAGAGCAAGT AGTTGCA

SEQ ID NO 16: RBC150

GGAAATTAAT ATGCATCAAT CCTTCTCTCT

SEQ ID NO 17: RBC150H3

CCCAAGCTTG GAAATTAATA TGCATCAATC CTTCTCTCT

SEQ ID NO 18: RBC102X1

CTAGTCTAGA CGAGGAGATC ATTGAGGATG CCATTCTCGC T

SEQ ID NO 19: BI104

TTTGATTCA CGGGTTGGGG TTTCTACAGG

SEQ ID NO 20: BI105

GGCTCGTATG TTGTGTGGAA TTGTGAGCGG

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION [X]

MODELO DE UTILIDAD []

- | | |
|---|--------|
| ♦ Indicación de que se solicita la concesión de una patente | [X] 1 |
| ♦ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud | [X] 1 |
| ♦ Descripción de la invención | [X] 37 |
| ♦ Dibujos de ser estos pertinentes | [X] 67 |
| ♦ Comprobante de pago de las tasas establecidas | [X] 2 |

COMPLETA [X]

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- | | |
|---|-----|
| ♦ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial | [] |
| ♦ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud | [] |
| ♦ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño | [] |
| ♦ Comprobante de pago de las tasas establecidas | [] |

COMPLETA []

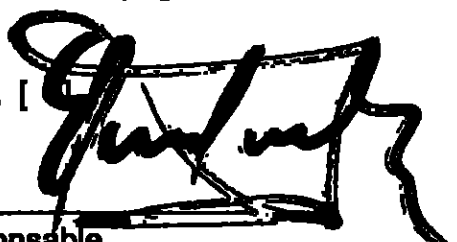
INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- | | |
|---|-----|
| ♦ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado | [] |
| ♦ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud | [] |
| ♦ Representación gráfica del esquema trazado | [] |
| ♦ Comprobante de pago de las tasas establecidas | [] |

COMPLETA []

INCOMPLETA []


Firma Responsable

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Fecha indicación : 03/05/2003 00:00:00 Folios: 00
Fecha (IMP): 2003-12-01 16:01:52
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE INCI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: Info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

Folio. 22
Extracto publicación



88
79

2020
Bogotá, D.C.,

Doctor:
José Antonio Lloreda
Apoderado
Societe Des Produits Nestlé S.A.

Oficio N°
11398

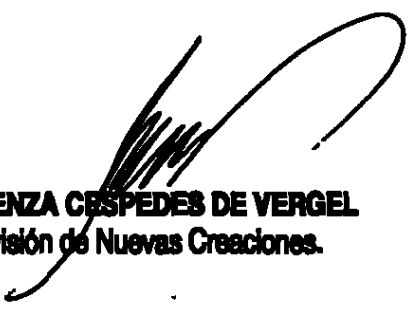
ASUNTO:	Radicación N°	03-105528
	Solicitud internacional	PCT/EP02/03469
	Fecha inicio fase nacional	11/12/2003
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	430
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

☐ La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486).

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

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


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

26 DIC. 2003

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