

107

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

ABOGADOS

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 03-105528- -00010-0000

REACI
SIONALII

Señor

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMER

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Re: **P1.-SOCIÉTÉ DES PRODUITS NESTLÉ S.A.-Solicitud de Patente de Invención en Fase Nacional PCT para "GEN PROMOTOR ESPECÍFICO DE LA HOJA DEL CAFÉ".-Clase C12N 15/82.-Expediente número 03-105.528.-**

1. Me refiero al auto dictado por ese Despacho notificado por fijación en lista el 26 de Octubre de 2007 y a mi memorial de plazo de 21 de Enero de 2008.

2. Con el fin de dar respuesta a las objeciones expuestas por el señor Examinador en su Concepto Técnico No. **1911** bajo los acápites de Claridad de la Solicitud, No Invención y Excepciones a la Patentabilidad me permito presentar las siguientes modificaciones y argumentos técnicos, por medio de los cuales se superan completamente dichas objeciones.

2.1. Claridad. El señor Examinador objeta la claridad del capítulo descriptivo de la solicitud en estudio argumentando que *"no se incluye las ventajas técnicas de la invención sobre el estado de la técnica"* y *"que no aparece a lo largo de todo el capítulo descriptivo una evidencia sobre la solución positiva de esta problemática"*.

Sobre ese particular, me permito manifestar que el capítulo descriptivo incluye información suficiente **que demuestra la solución positiva de la problemática planteada y que esto se constituye en prueba inequívoca de la ventaja que presenta el método reclamado sobre el estado de la técnica** como me permito explicar a continuación:

- El problema a resolver por la presente invención es el de proporcionar una nueva herramienta que permita la expresión de genes exógenos en una planta, y que preferiblemente no resulte en la silenciación de dichos genes.

JOSE LLORED A CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C.

Tel: 6069700 Fax 6069701

En este sentido, la presente invención se relaciona con un método para hacer que se exprese un gen exógeno en plantas, haciendo la transfección de dicha planta con un vector que contiene una región promotora del *rbcS* de café. Aunque este promotor ha sido reconocido como un promotor altamente activo, la secuencia de nucleótidos incluida en el vector revelado en la presente invención **confiere una alta especificidad tisular y no incurre en silenciamiento de genes** como es común en los promotores de alta actividad.

Este hecho **se constituye por sí solo en una ventaja sobre el estado de la técnica**, resolviendo de esta forma el problema planteado. La resolución de dicho problema es claramente demostrada en la descripción en donde se muestra cómo el promotor de *rbcS* empleado en el vector de transfección de plantas de tabaco transgénicas, **permite expresar cantidades significativamente mayores de proteína con respecto a otro tipos de promotores, por ejemplo el CaMV 35S** (Página 26, Tabla 1).

Me permito resaltar que uno de los problemas de los promotores conocidos en estado del arte es que, en el caso de inducir la producción de la proteína, esta se obtiene en muy baja cantidad. Con respecto a este particular, la descripción claramente expresa "*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*". **El hecho que la expresión de la proteína sea significativamente mayor al emplear la secuencia promotora revelada en la solicitud en estudio, comparada con otros promotores considerados en el estado del arte, se constituye en una ventaja significativa** de la presente invención.

- Por otro lado, dicha expresión de la proteína no solamente es mucho mayor, sino que de igual forma es específica de los tejidos fotosintéticos. En la Tabla 1 (Página 26) se observa como **el vector empleado como control positivo (pBI121) presenta la expresión de la proteína tanto en las raíces como en las hojas de la planta transfectada, mientras que las plantas tratadas con el vector que incluye el promotor *rbcS* (pRBCS2) expresan únicamente la**

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

proteína en las hojas. Adicionalmente se observa el efecto de la luz en dicha expresión, encontrándose que las hojas de las plantas transfectadas con el vector pRBCS2, al ser dejadas en la oscuridad, **disminuyen significativamente la expresión de la proteína.**

El hecho que la expresión selectiva de la proteína sea debida al control del promotor rbcS es claramente demostrable con los estudios de la expresión del gen en diferentes tejidos de C.arabica (Página15 de la descripción), donde se revela de forma contundente que la sonda de rbcS se hidridiza únicamente con una sola clase de mRNAs y que dichos mRNAs son abundantes en las hojas, ligeramente detectables en las flores y están ausentes en los tejidos no fotosintéticos como son las raíces, los granos, los tallos y los embriones somáticos.

Esto demuestra que **el promotor rbcS del café esta regulando efectivamente la expresión de un gen exógeno en una planta confiriéndole las características de ser tejido-selectivo y sensible a la luz** (Página 28 de la descripción).

Me permito resaltar que los argumentos anteriormente expuestos demuestran que el capítulo descriptivo es suficiente para describir el objeto de la invención, **y que los resultados allí consignados son prueba de la utilidad del método reivindicado y de las ventajas de dicho método sobre el estado de la técnica.**

2.2. Capítulo Reivindicatorio-Modificaciones. El señor Examinador objeta el capítulo reivindicatorio citando el Artículo 15 de la Decisión 486 de 2000 con respecto a las reivindicaciones 1 a 3 y 5, y el Artículo 20 de la Decisión 486 de 2000 con respecto a las reivindicaciones 8 y 9. Teniendo en consideración dichas objeciones, me permito manifestar que es deseo del solicitante presentar un **nuevo capítulo reivindicatorio,** que reemplaza al anterior y que esta compuesto de 6 reivindicaciones.

Me permito resaltar que **la nuevas reivindicaciones no amplían de manera alguna el alcance de la solicitud,** toda vez que se encuentran plenamente sustentadas por la descripción como se muestra a continuación:

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

- Reivindicación 1. La nueva reivindicación 1 hace referencia al método por el cual se induce la expresión de un gen exógeno en una planta que incluye la transfección de dicha planta con un vector de expresión que contiene una secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID No.1 o una parte funcional de esta secuencia. Este método se enseña en las Páginas 6 y 19 a 24 de la descripción de la solicitud en estudio, donde se revela que tipo de vectores pueden ser empleados, como se construyen y como se hace la transfección de las plantas con dichos vectores.

La Nueva Reivindicación 1 se lee como sigue:

"Un método para la expresión de un gen exógeno en plantas que comprende el paso de transfectar las plantas con un vector de expresión que comprende el gen bajo control de la secuencia de nucleótidos desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 1067 de SEQ ID No.1 o una parte funcional de la misma, donde la parte funcional incluye una función promotora",

- Reivindicación 2. En esta reivindicación se hace referencia al caso cuando la secuencia de nucleótidos SEQ ID No.1 codifica una proteína rcbS de café (Páginas 24 a 28 de la descripción).
- Reivindicación 3. En esta reivindicación se hace referencia al caso cuando la secuencia de nucleótidos es el cDNA de la secuencia considerada en la reivindicación 1, la secuencia SEQ ID No.2, que codifica una proteína rcbS de café (Páginas 24 a 28 de la descripción).
- Reivindicación 4. Esta reivindicación especifica qué tipo de plantas pueden ser objeto del método reclamado en la reivindicación 1. Dichas plantas se encuentran relacionadas en la descripción (Página 6).
- Reivindicación 5. Esta reivindicación considera el vector que contiene la secuencia SEQ ID No.1 que codifica una proteína rcbS de café (Páginas 19 a 21 de la descripción).

- Reivindicación 6. Esta reivindicación considera el vector que contiene la secuencia SEQ ID No.2 que codifica una proteína rcbS de café (Páginas 19 a 21 de la descripción).

Me permito señalar que el nuevo capítulo reivindicatorio delimita de forma clara el objeto de la invención, permitiendo identificar lo novedoso e inventivo del desarrollo realizado.

2.3. No Invención y Excepciones a la Patentabilidad. Como el señor Examinador puede notarlo, el solicitante ha optado por excluir por completo las reivindicaciones 1 a 3 y 5 originales, que en opinión del Examinador contravenían el Artículo 15 de la Decisión 486 de 2000, así como las reivindicaciones originales 8 y 9, que en opinión del Examinador contravienen el Artículo 20 de la Decisión 486 de 2000.

3. Conclusión

Los argumentos técnicos expuestos mostraron que el capítulo descriptivo es claro y suficiente para revelar la invención objeto de la presente solicitud. Adicionalmente, el nuevo capítulo reivindicatorio presentado es igualmente claro y no incluye materia que no pueda ser considerada como invención o que incurra en excepciones de la patentabilidad, superando de esta forma las objeciones presentadas por el señor Examinador con respecto a la solicitud en estudio.

4. Anexo me permito presentar:

- (i) Recibo número 08-17,028, expedido por la Superintendencia de Industria y Comercio, que acredita el pago de las modificaciones mencionadas; y
- (ii) Copia del nuevo capítulo reivindicatorio, que reemplaza al anterior, en el cual se incluyen las 6 reivindicaciones antes mencionadas.

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

5. En vista de lo anterior, ruego a usted proceder a estudiar nuevamente la solicitud a la luz de las modificaciones y los argumentos presentados y conceder el privilegio de patente solicitado.

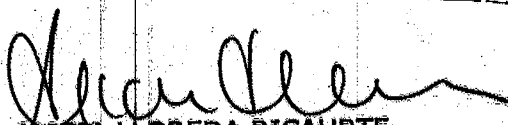
Señor Superintendente,

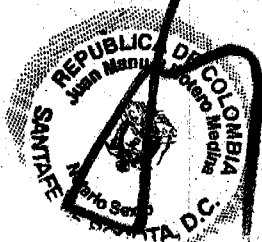

ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. 53.215

NOTARIA SEXTA DE BOGOTÁ
RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL
Bogotá, D.C. **21 FEB 2008**
Ante mí **JUAN MANUEL BOTERO MEDINA**
NOTARIO SEXTO DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ
Comparecieron:

quien(es) exhibió(aron) la(s) C.C. **39.690.713**
9072153215
y declaró(n) que la(s) firma(s) que aparece(n)
en el presente documento es(son) la(s) suya(s) y
que el contenido del mismo es cierto. En constan-
cia se firma esta diligencia


ALICIA LLOREDA RICAURTE
C.C. No. 39.690.713 de Usaquén



REIVINDICACIONES

1. Un método para la expresión de un gen exógeno en plantas que comprende el paso de transfectar las plantas con un vector de expresión que comprende el gen ^{exógeno} bajo control de la secuencia de nucleótidos desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 1067 de SEQ ID No.1 o una parte funcional de la misma, donde la parte funcional incluye una función promotora.
¿sec. promotora?
2. El método de la reivindicación 1, donde la secuencia identificada por SEQ ID No. 1 codifica una proteína rcbS de café. *aislado*.
3. El método de la reivindicación 1, donde la secuencia identificada por SEQ ID No. 2 codifica una proteína rcbS de café. *cDNA*.
4. El método de la reivindicación 1, donde la planta es seleccionada de un grupo que consiste de café, tomate, cacao, soya y achicoria.
5. Un vector que contiene una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 2.
6. Un vector que contiene una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 3.

D1.

(19)

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 139 565**(51) Int. Cl.⁶: C12N 15/01, C12N 1/20

C12N 5/00, A01H 1/00

A01H 1/04

(12)

TRADUCCION DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **89420101.1**(86) Fecha de presentación : **21.03.1989**(87) Número de publicación de la solicitud: **0 337 899**(87) Fecha de publicación de la solicitud: **18.10.1989**(54) Título: **Gen quimérico de resistencia a herbicidas.**(30) Prioridad: **23.03.1988 FR 88 04130**(73) Titular/es: **Rhone Poulenc Agro
14-20, Rue Pierre-Baizet
69009 Lyon, FR**(45) Fecha de la publicación de la mención BOPI:
16.02.2000(72) Inventor/es: **Leroux, Bernard;
Pelissier, Bernard y
Lebrun, Michel**(45) Fecha de la publicación del folleto de patente:
16.02.2000(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Fernando**

ES 2 139 565 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (artº 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

REIVINDICACIONES

1. Utilización de un gen quimérico para aumentar la calidad de resistencia de las plantas a un herbicida basado en 3,5-dihalógeno-4-hidroxi-benzonitrilo, comprendiendo dicho gen quimérico al menos un gen que codifica la resistencia a ese herbicida, un promotor ajeno que proviene de un gen que se expresa de un modo natural en células vegetales y eventualmente una zona de señal de poliadenilación, **caracterizada** porque el promotor está escogido del grupo que comprende el promotor del ARN 35S del virus del mosaico de la coliflor (CamV 35S), el promotor de la pequeña subunidad (PSU) de la ribulosa-1,5-bis-fosfato-carboxilasa-oxigenasa (RuBisCo) del girasol (*Helianthus annuus*) y combinaciones de los mismos.
2. Utilización según la reivindicación 1, **caracterizada** porque el promotor es el promotor Cam V 35S.
3. Utilización según la reivindicación 1, **caracterizada** porque el promotor es el promotor de la PSU RuBisCo del girasol.
4. Utilización según la reivindicación 1, **caracterizada** porque el promotor es la combinación del promotor de CamV 35S y de la PSU RuBisCo del girasol.
5. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada** porque el gen quimérico comprende una zona intermedia no traducida (enlazador) entre el promotor y el gen que codifica la resistencia al herbicida, escogida del grupo que comprende la zona no traducida de pUC 19 modificada por clonación, la zona no traducida de la PSU RuBisCo del maíz y la zona no traducida de la PSU RuBisCo del girasol.
6. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada** porque el gen quimérico contiene además, entre la zona intermedia y la zona que codifica la resistencia al herbicida, una zona que codifica un péptido de tránsito capaz de introducir la protefina en el cloroplasto de las plantas a transformar.
7. Utilización según la reivindicación 6, **caracterizada** porque la zona que codifica el péptido de tránsito es la de la PSU RuBisCo del maíz.
8. Utilización según la reivindicación 6, **caracterizada** porque la zona que codifica el péptido de tránsito es la de la PSU RuBisCo del girasol.
9. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizada** porque la zona de poliadenilación proviene del gen de la nopalina sintasa.
10. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizada** porque la zona de poliadenilación proviene del gen de la PSU RuBisCo del maíz.
11. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizada** porque el gen codifica la resistencia al bromoxinilo o al yoxinilo o a uno de sus derivados en forma de sales o ésteres.

NOTA INFORMATIVA: Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.

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

Mika Nomura¹, Kenichi Katayama¹, Asuka Nishimura², Yuji Ishida³, Shozo Ohta³, Toshihiko Komari³, Mitsue Miyao-Tokutomi⁴, Shigeyuki Tajima¹ and Makoto Matsuoka^{2,*}

¹Faculty of Agriculture, Kagawa University, Miki, Kita, Kagawa, 761-0795, Japan; ²BioScience Center, Nagoya University, Chikusa, Nagoya, 464-8601, Japan (*author for correspondence; e-mail: j45751a@nucc.cc.nagoya-u.ac.jp); ³Plant Breeding and Genetics Research Laboratory, Japan Tobacco Inc., 700 Higashibara, Toyoda, Iwata, Shizuoka, 438, Japan; ⁴National Institute of Agrobiological Resources, Tsukuba, 305-8602, Japan

Received 31 January 2000; accepted in revised form 25 May 2000

Key words: evolution, C4 plant, maize, ribulose-bisphosphate carboxylase

Abstract

The small subunit of ribulose-bisphosphate carboxylase (Rubisco), encoded by *rbcS*, is essential for photosynthesis in both C3 and C4 plants, even though the cell specificity of *rbcS* expression is different between C3 and C4 plants. The C3 *rbcS* is specifically expressed in mesophyll cells, while the C4 *rbcS* is expressed in bundle sheath cells, and not mesophyll cells. Two chimeric genes were constructed consisting of the structural gene encoding β -glucuronidase (GUS) controlled by the two promoters from maize (C4) and rice (C3) *rbcS* genes. These constructs were introduced into a C4 plant, maize. Both chimeric genes were specifically expressed in photosynthetic organs, such as leaf blade, but not in non-photosynthetic organs. The expressions of the genes were also regulated by light. However, the rice promoter drove the GUS activity mainly in mesophyll cells and relatively low in bundle sheath cells, while the maize *rbcS* promoter induced the activity specifically in bundle sheath cells. These results suggest that the rice promoter contains some *cis*-acting elements responding in an organ-specific and light-inducible regulation manner in maize but does not contain element(s) for bundle sheath cell-specific expression, while the maize promoter does contain such element(s). Based on this result, we discuss the similarities and differences between the rice (C3) and maize (C4) *rbcS* promoter in terms of the evolution of the C4 photosynthetic gene.

Abbreviations: β -glucuronidase; GUS, ribulose-bisphosphate carboxylase, Rubisco

Introduction

In C4 plants, photosynthesis occurs in two differentiated cell types in leaf, mesophyll and bundle sheath cells, and the genes encoding photosynthetic enzymes are expressed either exclusively in mesophyll or in bundle sheath cells (reviewed by Nelson and Langdale, 1992), while the genes are expressed only in mesophyll cells in C3 plants. The small subunit of ribulose-bisphosphate carboxylase (Rubisco), encoded by *rbcS*, is essential in photosynthesis in both C3 and C4 plants, but the cell specificity of *rbcS* expression differs between C3 and C4 plants. The

C3 *rbcS* is specifically expressed in mesophyll cells, while the C4 *rbcS* is expressed in bundle sheath cells, not in mesophyll cells. Langdale *et al.* (1988) have suggested that maize, and perhaps other C4 plants, exhibits a C3-type expression pattern of Rubisco as a default manner, that is expression in all photosynthetic cells. They have also demonstrated that the repression of Rubisco in maize occurs under the light condition only in mesophyll cells positioned no more than three cells away from a vein (Nelson and Langdale, 1992). Even though a difference in *rbcS* expression is observed between C3 and C4 plants, the structure of the

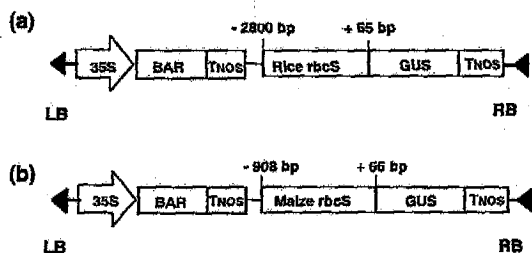


Figure 1. Structure of chimeric constructs used for maize transformation. The promoter sequences for the rice (a) and maize *rbcS* (b) were fused separately to the GUS coding region, which was followed by the polyadenylation signal from the nopaline synthetase (TNOS) gene. 35S, cauliflower mosaic virus 35S promoter; BAR, phosphinothricin acetyltransferase gene; RB, right border; LB, left border.

apparently different from types I and II. Based on this search, we can estimate that 64% of the *rbcS* mRNA is derived from the type I gene and 33% from type II in green leaves. Thus, we used the promoter for the type I gene in the following experiments.

A 2.8 kb PCR-amplified fragment of the type I *rbcS* gene (Kyoizuka *et al.*, 1993), containing 65 bp (2 bp upstream of the first ATG) of the 5'-transcribed and about 2.8 kb of the 5'-flanking region of the rice gene, was used as the rice promoter (Figure 1). As a maize promoter, we used the sequence from -908 to +66 (just from the first ATG) of the maize *rbcS* gene (*rbcS-m3*), since this gene is highly expressed in maize bundle sheath cells (Figure 1; Schäffner and Sheen 1991, Viret *et al.*, 1994).

The chimeric genes were introduced into maize by *Agrobacterium*-mediated transformation and transgenic maize plants were selected by phosphinothricin resistance (Ishida *et al.*, 1996). We made more than ten transgenic plants for each construct and utilized these for further analyses. The GUS activity was transmitted to the next generations in a Mendelian manner with the cosegregation of phosphinothricin resistance.

Fluorometric analyses revealed the highest level of GUS activity in the leaf blades of the transformants carrying either construct, while the activity in leaf sheath was much lower than that in leaf blade, and the activity was low in a non-photosynthetic organ, the root (Table 1). GUS activity in leaf blades of the transformants carrying the rice promoter::GUS was almost equivalent to or slightly lower than that in leaf blades of the transgenic maize with GUS controlled by the promoter of an endogenous maize C4-type pyruvate, orthophosphate dikinase (3000–30 000 pmol/min per mg protein; Nomura *et al.*, 2000), which is one

Table 1. GUS activity controlled by the promoter of rice maize *rbcS* in different organs of transgenic maize plants.

	GUS activity (pmol 4-MU/min per mg protein)		
	leaf blade	leaf sheath	root
rice <i>rbcS</i> ::GUS 1	8874	239	154
rice <i>rbcS</i> ::GUS 2	4980	169	166
rice <i>rbcS</i> ::GUS 3	4094	97	186
rice <i>rbcS</i> ::GUS 4	5798	111	171
rice <i>rbcS</i> ::GUS 5	4183	240	35
rice <i>rbcS</i> ::GUS 6	4648	267	106
rice <i>rbcS</i> ::GUS 7	3073	196	55
rice <i>rbcS</i> ::GUS 8	2260	335	34
rice <i>rbcS</i> ::GUS 9	3589	477	235
rice <i>rbcS</i> ::GUS 10	18981	950	275
maize <i>rbcS</i> ::GUS 1	3166	712	226
maize <i>rbcS</i> ::GUS 2	3794	835	311
Non-transformant 1	33	50	118
Non-transformant 2	38	75	170

of the most highly expressed genes in maize leaves, indicating that the promoter of the rice *rbcS* retains high transcriptional activity in leaves of a C4 plant. In contrast with the rice promoter, the maize promoter could not induce much GUS activity in transgenic maize plants, probably because of its bundle sheath cell-specific expression of GUS (see below).

The cell specificity of the GUS activity in leaf blades of the transformants was determined by observing *in situ* histochemical staining. A similar pattern of GUS staining was observed in more than five independent transformants. In leaf blades from the transformants carrying the rice promoter::GUS, strong activity was seen in mesophyll cells, while relatively low activity was seen in bundle sheath cells (Figure 2a and c). The GUS activity in mesophyll cells was always found in all leaves of six independent lines we tested. On the other hand, the maize promoter mainly induced the GUS activity in bundle sheath cells, while the promoter induced it at a low level in mesophyll cells (Figure 2b and d). In stems and roots, neither the rice nor the maize *rbcS* promoter induced GUS activity (Figure 2e, f, g and h). It has been reported that the endogenous *rbcS* gene in C4 plants, including maize, is preferentially expressed in bundle sheath cells but not expressed at all or expressed at a low level in mesophyll cells under light conditions (Langdale *et al.*, 1988). Therefore, the bundle sheath cell-specific

expression caused by the maize promoter mimicked the expression pattern of the endogenous gene, and consequently the maize promoter we used contains the sequence sufficient for bundle sheath cell-specific expression. In contrast to this, the promoter from the rice *rbcS* cannot induce such cell-specific expression but only leaf organ-specific expression.

In contrast to leaf tissue, each promoter was unable to drive GUS activity in non-photosynthetic organs such as stem (Figure 2e and f) or root (Figure 2g and h). No or low histochemical evidence of GUS activity controlled by the promoters in non-photosynthetic organs is consistent with the fluorometric analysis of the GUS activity in roots (Table 1) and indicates that both promoters induce organ-specific expression in transgenic maize plants.

Light induction of the rice promoter::GUS in transgenic maize

The above results demonstrate that the rice promoter can drive GUS in an organ-specific but not bundle sheath-specific manner. We also tested another expression property, light-mediated expression, of the rice promoter in maize, since light-regulated expression of *rbcS* commonly occurs in both C3 and C4 plants (Tobin and Silverthorne, 1985; Edwards and Coruzzi, 1990; Gilmartin *et al.*, 1990). Seeds from three self-pollinated transformants with rice *rbcS*::GUS (rice *rbcS*::GUS 1, 4 and 10 in Table 1) and a self-pollinated transformant with maize *rbcS*::GUS (maize *rbcS*::GUS 1 in Table 1) were germinated in the dark for 10 days then exposed to light (ca. 100 mE m⁻² s⁻¹). Figure 3a shows the results of GUS assays conducted in the second or third leaves of 10 seedlings from rice *rbcS* promoter::GUS transformed lines. In all three transformed lines, GUS activity in the leaf blades of etiolated seedlings was less than 20% of the levels observed in that in green leaf blades of grown under normal conditions. The induction of activity initiated after a lag phase of about 8 h increased almost linearly through 2 days of exposure to light. The similar induction of the GUS activity was also seen controlled by the maize promoter (Figure 3b). The GUS activity in etiolated leaf blades was about 10% of green leaf blades as its induction occurred after a lag phase of about 8 h and increased almost linearly through 2 days under the light condition. The induction profile of these GUS activities was also similar to that of the endogenous *rbcS* gene in maize (data not shown), suggesting that the rice

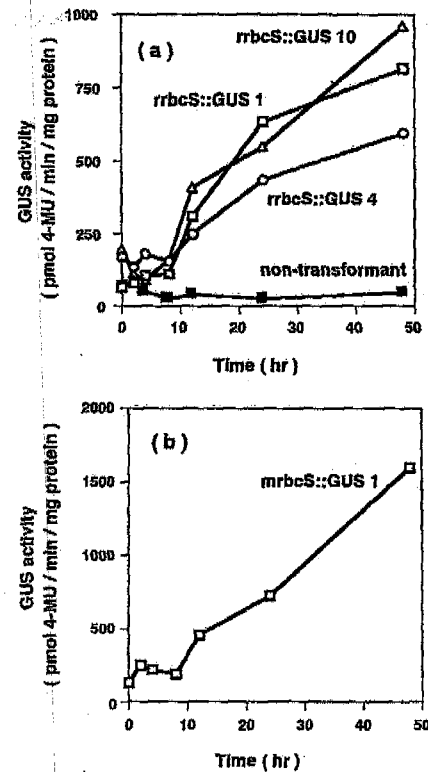


Figure 3. Light induction of GUS activity in greening maize seedlings transformed with rice *rbcS* promoter::GUS (a) and maize *rbcS* promoter::GUS (b) constructs. Seedlings were grown in the dark for 10 days then transferred to light. GUS activity in green leaves of plants carrying the rice *rbcS* promoter::GUS (a) and maize *rbcS* promoter::GUS (b) constructs were measured by the formation of 4-methylumbelliferone (4-MU) at the indicated times after transfer to the light. Three independent lines carrying the rice *rbcS* promoter::GUS construct (a; rice *rbcS*::GUS 1, □; rice *rbcS*::GUS 4, ○; rice *rbcS*::GUS 10, Δ) and one line carrying the maize *rbcS* promoter::GUS construct (b) and non-transformant (■) in (a) were analyzed.

promoter may be controlled by the same factors that regulate maize endogenous *rbcS* gene expression (see Discussion).

Discussion

Previously, we have shown that the maize *rbcS* promoter can drive GUS activity specifically in mesophyll cells in a light-dependent manner in transgenic rice plants, which is the same as the expression pattern of the endogenous rice *rbcS* gene (Matsuoka *et al.*, 1994). Based on this result, we discussed the possibil-

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

Abogada
Alicia Lloreda Ricaurte

ASUNTO	Radicación	03-105528
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	430
	Oficio	3991
	Folios	009

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

1. Documentos estudiados

<u>Descripción:</u>	Folios: 35 a 61 como se radicó inicialmente.	
<u>Reivindicaciones:</u>	Folios: 62 a 63 como se radicó inicialmente. Folios: 114 modificadas el 29/02/2008	
<u>Figuras:</u>	Folios: 64 a 77 como se radicó inicialmente.	
<u>Prioridad:</u>	EP 01111573.0	11/05/2001

2. Objeto de la invención

Título de la solicitud: "Gen promotor específico de la hoja del café".

El objeto de la presente solicitud de patente de invención consiste en una secuencia nucleotídica derivada de las hojas de café que puede utilizarse como un promotor de expresión inducible de genes en plantas y los vectores transformados resultantes.

El problema planteado en esta solicitud es la carencia de promotores efectivos de expresión de genes dirigidos a tejidos específicos.

Para solucionar este problema técnico la solicitud en estudio proporciona una secuencia promotora para expresión de genes vegetales, sin que se produzca un silenciamiento consecuente de la utilización del mismo y que se expresa en tejido foliar únicamente.

IPC: C12N 15/82.

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

3.1. Reivindicaciones (artículo 30 D 486)

El capítulo reivindicatorio carece de claridad por cuanto:

- La reivindicación 1 que trata sobre un método para la expresión de un gen exógeno en plantas, tal como esta redactada no es clara en definir que comprende el vector de expresión. Parece que se omitió mencionar que el gen bajo control de la secuencia de nucleótidos es el gen exógeno.
- La misma reivindicación 1 contiene términos ambiguos como "o una parte funcional de la misma", que no permiten definir ni limitar el segmento de la secuencia de nucleótidos al cual se refiere.

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

4. No es una invención (artículo 15 D 486 literal a)-f))

Teniendo en cuenta que bajo la legislación colombiana el material biológico tal como se encuentra en la naturaleza no se considera una invención; las secuencias nucleotídicas o polipeptídicas derivadas de algún ser vivo, tal como se reclaman (reivindicaciones 1,2,4,5), no son materia susceptible de patente.

De tratarse de secuencias desarrolladas en el laboratorio deben poder diferenciarse de las naturales, mostrando las modificaciones realizadas, que confieren novedad e inventiva a las mismas. De no ser así, las secuencias que correspondan con los naturales deberán excluirse.

5. Determinación del Estado de la Técnica

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

Fecha de presentación de la solicitud prioritaria – 11/05/2001

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

Nº	Documento	Título	Fecha de publicación
D1	ES 2139565 T3	"Gen quimérico de resistencia a herbicidas"	18/10/1989
D2	Nomura M., et.al. Plant Molecular Biology, vol 44, N°1:99-106	"The promoter of rbcS in a C3 plant (rice) directs organ-specific, Light-dependent expresión in a C4 plant (maize), but does not confer bundle sheath cell-specific expresión"	09/2000

5.1. Nivel inventivo (art 18, D486)

El documento más cercano a la solicitud es ES 2139565 (D1) el cual divulga la utilización del promotor del gen de la pequeña subunidad de la ribulosa-1,5-bis-fosfato-carboxilasa-oxigenasa (Rubisco) aislado de girasol (*Helianthus annuus*) para dirigir la expresión de un gen quimérico en una planta determinada (ver reivindicación 1).

La diferencia entre D1 y la solicitud en estudio, es que en D1 el promotor es aislado del girasol, mientras que en la solicitud es aislado de la planta de café.

Por otra parte, el documento de Nomura, *et. al.*, 2000 (D2), divulga la transformación de plantas de maíz con el gen GUS usando un promotor de la rubisco aislado de arroz (C3) o de maíz (C4), en ambos casos la expresión del gen foráneo se logra en tejido fotosintetizador, específicamente en las hojas, mientras que la expresión es inhibida en tejido no-fotosintetizador tal como la raíz o incluso el tallo (ver pág 101, columna izq; pág 103, columna izq).

De estos dos documentos (D1 y D2), es claro que en el estado de la técnica se conocía que:

1. todas las plantas de tipo C3 y C4 poseen el gen de la rubisco para su actividad fotosintetizadora y que este gen es por tanto, altamente conservado;
2. el promotor del gen de rubisco permite la expresión de un gen foráneo dirigida a tejido fotosintetizador, específicamente a las hojas;
3. independientemente del origen del promotor de la rubisco, es decir de la planta de la cual se aisló, el promotor tiene el mismo efecto sobre la expresión de un gen introducido en otra planta.

Por tanto, resulta obvio que la planta de café posea este gen, con una expresión dirigida a las hojas y que la secuencia específica de este gen se obtiene a partir de técnicas convencionales de biología molecular y que por tanto, el reporte de su secuencia en la planta de café corresponde a una estandarización de la técnica de aislamiento de un gen. Así como también resulta obvio, la actividad que tendrá el promotor de la rubisco sobre la expresión de un gen foráneo en plantas de café o en otras plantas tales como las mencionadas en la solicitud.

De esta manera, respecto al estado de la técnica divulgado por D1 y D2, el método para la expresión de un gen exógeno que utiliza el promotor de la rubisco aislado del café, no puede considerarse inventivo de acuerdo con lo establecido en el artículo 18 de la Decisión 486.

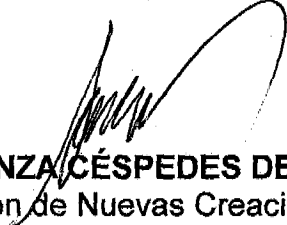
6. Conclusión:

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

N°	Documento N°	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D1	ES 2139565 T3	1-6	Nivel inventivo
D2	Nomura M., et.al. Plant Molecular Biology, vol 44, N°1:99-106	1-6	Nivel inventivo

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

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 CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de División de Nuevas Creaciones

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

03 ABR 2009

CONCEPTO TÉCNICO No. 699	EXAMINADOR TÉCNICO Código No.202052
------------------------------------	---