



No. 12-000507- -00000-0000

Fecha: 2012-01-03 10.42:09 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 90

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO _____ ANALISIS MULTIPLEX DE PROTEINA TRANSGENICA APELLADA

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE _____ DOW AGROSCIENCES LLC

DOMICILIO _____ INDIANAPOLIS, INDIANA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO _____ LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C., _____



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-000507- -00000-0000

Fecha: 2012-01-03 10:42:09 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 90

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

1

☒ Patente de Invención.
☒ Capítulo I.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.
☐ Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: **DOW AGROSCIENCES LLC**
Sociedad constituida y existente bajo las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América.

Dirección: 9330 Zionsville Road,
Indianápolis,
Indiana 46268-1054,
Estados Unidos de América.

Domicilio: Indianápolis
Indiana,
Estados Unidos de América.

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____

Número _____

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@cavelier.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____

Número 35.456.344 T.P 23.555

4

INVENTOR (ES)
(72)

1. John LAWRY
15726 Wildrye Dr.,
Westfield,
Indiana 46074
Estados Unidos de América.

2. Joshua FLOOK
2434 W. Division Road,
Tipton,
Indiana 46072,
Estados Unidos de América.

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCTUS2010/037192 Fecha: 03 de junio de 2010
Publicación Internacional No. WO 2010/141674 A3 Fecha: 09 de diciembre de 2010

6

Título (54)

ANÁLISIS MÚLTIPLEX DE PROTEÍNA TRANSGÉNICA APILADA

7

Clasificación Internacional (51)

B01D 059/044

8

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

US

03 de junio de 2009

61/183,777

9

Comprobante de pago No.: 12-000101
Comprobante de pago No.: 11-122624

Fecha: 02 de enero de 2012
Fecha: 16 de diciembre de 2011

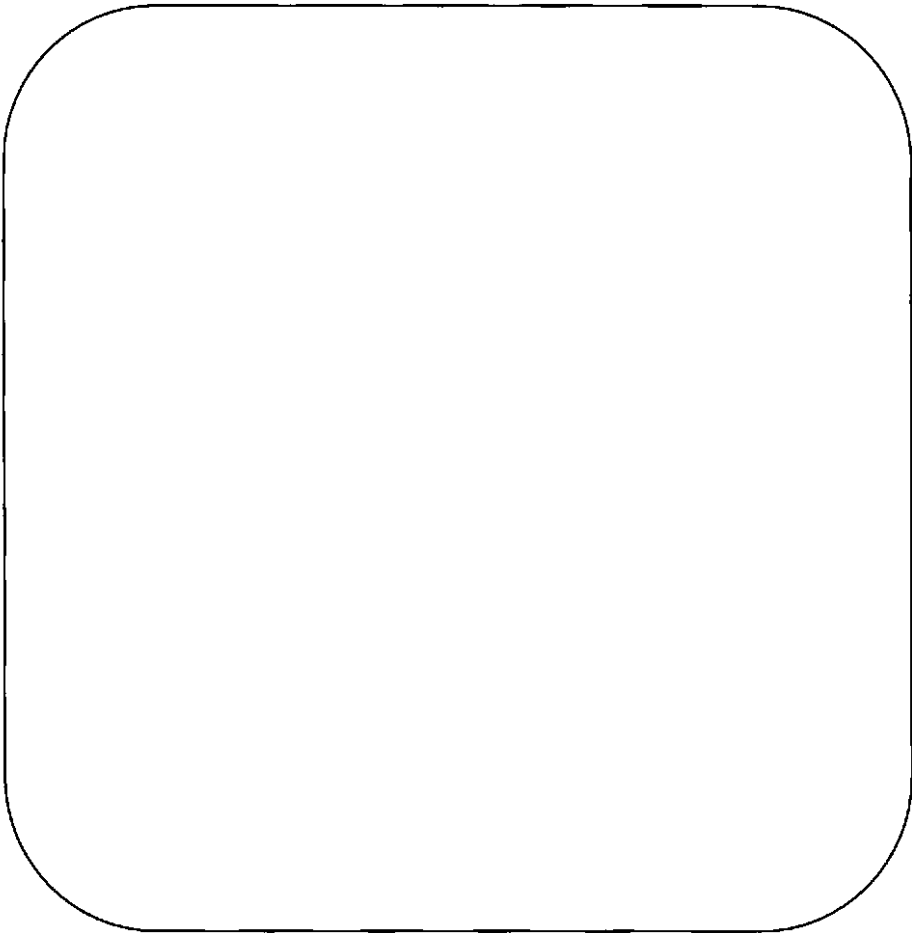
10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 590.000.oo.
- ☒ Comprobante de pago por 10 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$300.000.oo.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poder de **DOW AGROSICIENCES LLC.**
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia de la carátula de la Publicación Internacional. WO 2010/141674 A3
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar 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.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ 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, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

FIRMA : *Luiz Clemencia de Paez*
C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555


SCI

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2010/141674 A3

Descripción:

Páginas 36 en español

Reivindicaciones: Número (20)

Dibujos : Número (10)

2. ☒ Forma PCT/ISA/210. Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Extracto de publicación.

4. ☒ Listado de Secuencias

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE
INTERNACIONAL**

10115
6.228

CAVELIER
ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4ª N° 72-35
BOGOTÁ, 8 - COLOMBIA

For patents, utility models, industrial designs,
trademarks, commercial names, trade emblems,
slogans.

Para patentes, modelos de utilidad, diseños
industriales, marcas de fábrica, nombres
comerciales, enseñas, lemas comerciales.

REPRESENTACION, RATIFICACION Y PODER

REPRESENTATION, RATIFICATION AND
POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned /Yo (nosotros), abajo firmado (s)
Dow AgroSciences LLC
of/domiciliado (s) en 9330 Zionsville Road,
Indianapolis, Indiana 46268, United
States of America,

por el presente ratificamos la _____
presentada por _____
como agente oficioso ante _____
en _____
el _____
y por el presente nombramos a GERMAN CAVELIER, tpa. 832;
GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO, tpa.
31929; y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; domiciliados
en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a
lo dispuesto en el parágrafo 1º del Artículo 543 del Código de
Comercio, el primero como principal y los demás como
suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en
todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para
recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o
extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al
principal en caso de ausencia o impedimento temporal o
definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el
segundo representante suplente haya de reemplazar al primero,
y el tercero al segundo. En tales casos, el representante
principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos,
declararán su intención de no ejercer la representación
mediante declaración autenticada por Notario Público en
Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul
de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento,
con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare
definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la
ausencia o impedimento del representante principal, o de su
primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la
representación, en su orden, uno u otros según el caso,
asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese
momento el ejercicio de la representación por el primero,
segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba
nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra)
propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo
efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me
(nos) representen ante cualesquiera entidades o personas,
ejerczan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden
administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como
los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los
siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención,
modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas
de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales,
nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales y
denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de
nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de
licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de
competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u
observaciones, cancelación administrativa o judicial, nulidad,

hereby ratify the _____
filed without a Power of Attorney by _____
before _____
in _____
on _____
and do hereby appoint GERMAN CAVELIER, tpa. 832;
GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO, tpa.
31929; and LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; domiciled
at Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, in due compliance
with the terms of Paragraph 1st. of Article 543 of the
Commercial Code, the first as principal and the others as
alternates, in the order of their appointment, as our
representatives for all industrial property matters with faculty
to receive notifications and to appoint attorneys in and out of
Court. The first alternate shall replace the principal in case of
his absence or of temporal or definitive impediment. The same
rule will apply when the second alternate representative is to
replace the first one, or when the third is to replace the first or
second alternates in their turn, or both of them, second. In such
cases, the principal representative, or the shall state their
intention not to act as representatives through a declaration
given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or
another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in
case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If
any of the appointees were to be definitely absent, the
following alternate shall take his place. When the absence or
impediment of the principal representative, or of the first or
second alternate in their turn ceases, the representation can be
taken again in their sequence, by the principal, the first or
second alternate depending on case, and the mere fact or its
exercise will suffice. The exercise of the representation by the
first, second or third alternates in their turn shall end at such
time.

AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIO

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the
above-named attorneys-at-law so that they may obtain the
protection of my (our) industrial property and against the
unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said
attorneys to represent me (us) before any authorities or persons,
with or without jurisdiction, specially those administrative,
administrative contentious and judicial, as well as before
Arbitration Court, in all matters concerning the following: a)
Obtainment of patents, utility models and industrial designs;
the registration of trademarks, collective, defensive and service
marks, slogans, commercial names, trade emblems, vegetal
varieties and denominations of origin; its renewal, assignment,
change of name or domicile, voluntary cancellation; and the
registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of

CONSULADO GENERAL

A la vuelta →

Over →

medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

6

unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Given and signed this/Dado y firmado hoy _____

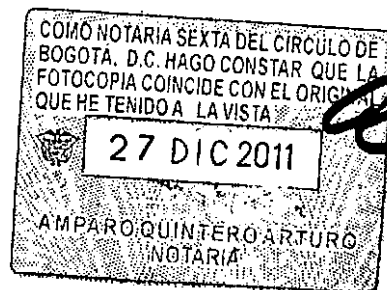
February 6, 1978

in/en Indianapolis, Indiana 46268

United States of America

Kenneth L. Loertscher
Signature _____ Firma _____

Kenneth L. Loertscher
Assistant Secretary
& General Patent Counsel



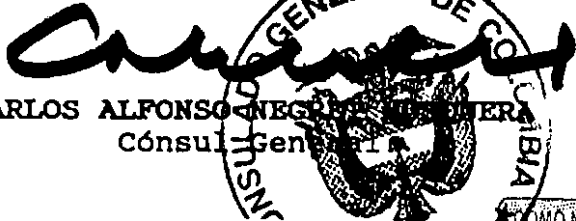
No. 254

Chicago, FEB 20 1998

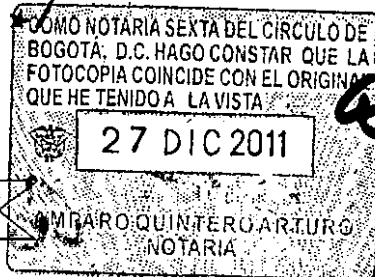
El suscrito Cónsul General de Colombia, CERTIFICA, que el señor (a) MARY REEVER, quien como SECRETARIA DELEGADA ESTADO, IN., autenticó la firma del signatario del poder precedente, ejercía en la fecha las funciones indicadas y su firma corresponde a la registrada en este Consulado; que la compañía DOW AGROSCIENCES LLC es una sociedad constituida de acuerdo con las leyes de DELAWARE y cumple su objeto conforme a las mismas; que el (a) señor (a) KENNETH L. LOERTSCHER, quien en su carácter de REPRESENTANTE LEGAL de la citada compañía confiere el poder precedente, es su representante legal en este país.

El Cónsul General no asume responsabilidad alguna por el contenido del documento.

PAGADO IMPUESTO DE TIMBRE Y DERECHOS CONSULARES
US\$56.00 (Cincuenta y seis dólares)

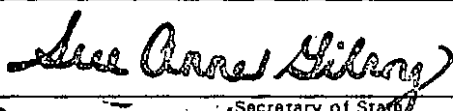

CARLOS ALFONSO NEGRETE
Cónsul General

UNITED STATES OF AMERICA
CERTIFICATE OF OFFICE
STATE OF INDIANA



I, Sue Anne Gilroy, Secretary of State of Indiana, DO HEREBY CERTIFY: That, according to records on file in my office, Lydia S. Owens was duly elected or appointed to the office of Notary Public in and for Hendricks County and that the term of said office included the date of February 6, 1998; that to all his/her official acts as said official, full faith and credit ought to be given in all Courts of Justice and elsewhere. In testimony whereof, I have here unto set my hand and affixed the Great Seal of the State of Indiana, at Indianapolis, this Tenth day of February, 1998




Secretary of State
by: 
Deputy

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

1998 MAR 11 11:55

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTÁ D.C.

Bernarda R. de Martínez
Traductora e Interprete Oficial
Resolución 683 Minjusticia 1991

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

En los
221220
Reposit

CHAMARABEC EN EL
MINISTERIO DE EMPENA
FUNCIONES INDICADAS

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE
BOGOTÁ, D.C. HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA

27 DIC 2011

AME ROQUINTERO ARTURO
NOTARIA

1.
CE
CE
RE
COM

2.1.6
es un

de ac
Es

2.2. Qu
933
462

2.3. Qu
poder
menclor

2.4. Que
SECRET

está(n) au

ludad

ado

oy 6

CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUO)

A los 6 días del mes de FEBRERO de 19 98
ante mí, Notario Público de ESTADO DE INDIANA
compareció(eron) personalmente KENNETH L. LOERTSCHER

a quien(es) doy fe de conocer y me consta que es(son) la(s)
persona(s) firmante(s) del documento que precede, y quien(es)
tiene(n) capacidad legal para otorgarlo.

Notario Público — Notary Public

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Hoy, 6 de FEBRERO de 19 98
compareció(eron) ante mí
KENNETH L. LOERTSCHER

a quien(es) conozco personalmente y que firma(n) este documen-
to en representación de la Sociedad/compañía
denominada Dow AgroSciences LLC

Certifico:

1. Que he visto los siguientes documentos:*

CERTIFICADO DE CONSTITUCION, FECHADO 1 JULIO 1997
CERTIFICADO DE MODIFICACION, FECHADO 1 OCT. 1997
RESOLUCION JUNTA DIRECTIVA, FECHADO 23 OCT, 1997
CONSENTIMIENTO ESCRITO DE LA JUNTA, 1 JULIO 1997

2. Que dichos documentos prueban lo siguiente:

Que Dow AgroSciences LLC
es una Sociedad/Compañía legalmente constituida y existente
de acuerdo con las leyes de 1 Estado de Delaware,
Estados Unidos de América

2.2. Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es
9330 Zionsville Road, Indianapolis, Indiana
46268, Estados Unidos de America.

2.3. Que el objeto u objeto para los cuales se otorga el presente
poder están comprendidos dentro del objeto social de la
mencionada Sociedad/Compañía.

2.4. Que el(los) Sr.(Sres.) KENNETH L. LOERTSCHER
SECRETARIO ASISTENTE Y ASESOR LEGAL PATENTES

está(n) autorizado(s) para otorgar el presente Poder.

Ciudad INDIANAPOLIS

Estado INDIANA

Hoy 6 FEB. de 19 98

Notario Público — Notary Public

* Los documentos deben identificarse con fecha y origen.

NOTARIAL CERTIFICATE (INDIVIDUAL)

On this 6th day of February 19 98
before me, a Notary Public of State of Indiana.
personally appeared Kenneth L. Loertscher

to me known, and known to me to be the person(s) who
executed that foregoing document, and who has(have) legal
capacity to execute it.

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 6th day of February 19 98
appeared before me
Kenneth L. Loertscher

who(m) I know personally and who(m) signed this document as
representative(s) of the ~~Company~~ Company Limited
named Dow AgroSciences LLC Liability
Company.

I Certify:

1. That I have seen the following documents:*

Certificate of formation, dated July 1, 1997
Certificate of amendment, dated October 1, 1997
Board resolution, dated October 23, 1991
Board written consent, dated July 1, 1997

2. That the above documents duly prove the following:
2.1. That Dow AgroSciences LLC
is a ~~Corporation~~ Company legally constituted and in existence
in accordance with the laws of the State of Delaware,
United States of America

2.2. That the domicile of said ~~Company~~ Company is
9330 Zionsville Road, Indianapolis, Indiana
46268, United States of America.

2.3. That the purpose of purposes for which the present Power
of Attorney is granted are comprised within the corporation
purposes set forth in the charter of the mentioned
~~Corporation/Company~~ limited liability company.

2.4. That Mr.(Messrs.) Kenneth L. Loertscher
Assistant Secretary and General Patent Counsel
is(are) authorized to grant the present Power of Attorney.

City Indianapolis

State Indiana

This 6th day of Feb. 19 98

Lydia S. Owens

Lydia S. Owens
Notary Public, State of Indiana
Hendricks County
My Commission Expires 03/05/00

* Documents must be identified with date and origin.

Don T. Deering, Jr.

- 9

9

- 9

re it como NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE
BOGOTA, D.C. HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA es una copia fiel del original
que me ha sido
of the Notary Public

27 DIC 2011

AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIO

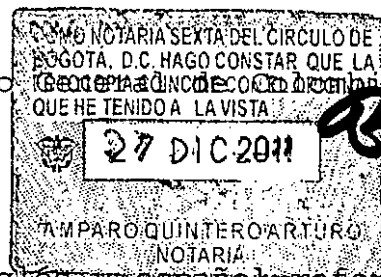
259 del C. de P.C. el Señor C6

TRADUCCION OFICIAL No.03.075.98 de un documento escrito en inglés el cual para su identificación se sella con el sello del Traductor al mismo tiempo que la presente. Esta traducción ha sido preparada por Bernarda R. de Martínez, Traductora Oficial debidamente reconocida por el Ministerio de Relaciones Exteriores y aprobada por el Ministerio de Justicia de Colombia mediante Resolución No. 683 de 1991.

(Se traducen sellos y legalizaciones que aparecen a continuación de un documento escrito en inglés y español por medio del cual Dow AgroSciences LLC, otorga Poder a favor de GERMAN CAVELIER, GONZALO PERDOMO, EMILIO FERRERO y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ.)

Dado y firmado hoy 6 de febrero de 1998, en Indianápolis, Indiana, E.E.U.U., por Kenneth L. Loertscher, Subsecretario y Asesor General de Patentes.

(Sellos parciales en tinta del Consulado de Estados Unidos en Chicago.)



CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUO), en inglés y español referente a la capacidad legal que tenía KENNETH L. LOERTSCHER para otorgar el documento antes mencionado, expedido el 6 de febrero de 1998 en el Estado de Indiana.

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD), en inglés y español referente a la existencia legal de la sociedad Dow AgroSciences LLC, expedido en la Ciudad de Indianápolis, Indiana, E.E.U.U., el 6 de febrero de 1998.

(Firmado), Lydia S. Owens, Notario Público
(Sello notarial en tinta), LYDIA S. OWENS Notario Público,
Estado de Indiana, Condado de Hendricks Mi comisión expira el
03/05/00
(Sello notarial seco), LYDIA S. OWENS NOTARIO PUBLICO INDIANA
(Sello parcial en tinta del Consulado General de Colombia en
Chicago.)

ESTADO UNIDOS DE AMERICA
CERTIFICADO DEL CARGO
ESTADO DE INDIANA

Yo, SUE ANN GILROY, Secretario de Estado de Indiana, POR EL
PRESENTE CERTIFICO: que, de acuerdo con los archivos que obran
en mi oficina, LYDIA S. OWENS fue debidamente elegido y
nombrado para el cargo de NOTARIO PUBLICO en y para el Condado
de Hendricks y que el término de dicho cargo incluía la fecha
del 6 de febrero de 1998: que a todos sus actos oficiales se
les debe dar completa fe y crédito dentro de las competencias de todas las
Corte de Justicia. EN TESTIMONIO DE LO CUAL, y
estampado el Gran Sello del Estado de Indiana, en Indianápolis,
hoy 10 de febrero de 1998.

(Firma facsimilar), Sue Ann Gilroy

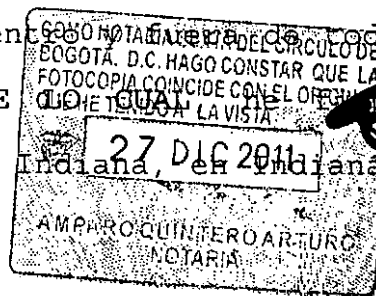
Secretario de Estado

(Firmado),

Por: Mary Reeve

Suplente

(Adherido se encuentra sello de oblea dorado con texto en
relieve), SELLO DEL ESTADO DE INDIANA 1816

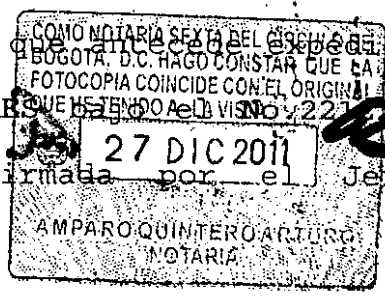


(Sello parcial en tinta del Consulado General de Colombia en Chicago.)

(En español), Certificación de la firma y cargo de MARY REEVER, de la existencia legal de la compañía DOW AGROSCIENCES LLC y de la autoridad que tenía su representante Legal, KENNETH L. LOERTSCHER, para otorgar el poder mencionado arriba. Esta certificación fue expedida por el CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA EN CHICAGO, ILLINOIS, bajo el N° 254, de fecha 20 de febrero de 1998 y firmada por Carlos Alfonso Negret Mosquera, Cónsul General. Pagados Impuesto de Timbre y Derechos Consulares por valor de veintiún dólares.

(Sello parcial en tinta del Consulado General de Colombia en Chicago.)

(al dorso), Legalización de la firma que antes se expedía en BOGOTÁ, D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE SE ENVIÓ A LA VISTA No. 221 de fecha 11 de marzo de 1998 y firmada por el Jefe de Legalizaciones.



Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en los archivos de esta oficina para su confrontación y a la cual me remito.

Bogotá, 17 de marzo de 1998

COLO 6641-801-001-3
BRM.137

Bernarda R. de Martínez
Bernarda R. de Martínez
Traductora e Interprete Oficial
Resolución 683 Minjusticia 1991

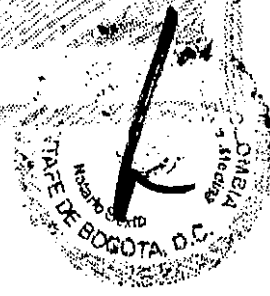
COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) ANTERIOR(ES) FIRMA(S) PUESTA(S) POR _____

_____ IDENTIFICADOS CON C.C. No.(s) _____

_____ ES(SON) AUTENTICA(S)

SANTAFE DE BOGOTA, 17 MAR 1998





NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

18 JUN 56
DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA COPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA

27 DIC 2011

AMBARO QUINTERO RAMIRO
NOTARIA

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

022680
CUYA FIRMA APARECE EN
DOCUMENTO DESEMPLEO
LAS FUNCIONES INDICADAS

CAVELIER

ABOGADOS

WEB SITE: www.cavelier.com
E-MAIL: cavelier@cavelier.com

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTA 8, COLOMBIA

TELEFONO: (57) (1) 347-3611
TELEFAX: (57) (1) 217-9211 (57) (1) 310-4995

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E. S. D.

Poderdante : DOW AGROSCIENCES LLC

Poder conferido el : 06/02/1998

Yo, EMILIO FERRERO, obrando como apoderado principal del poderdante arriba mencionado, mediante el presente escrito sustituyo el poder a mi otorgado a la doctora LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, identificada con cédula de ciudadanía No. 35.456.344 y Tarjeta Profesional N°23.555, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil.

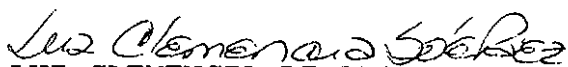


EMILIO FERRERO

T.P.A. N° 31.929

C.C. N° 438.019 de Usaquén

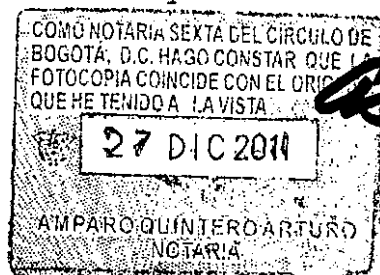
Acepto:



LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

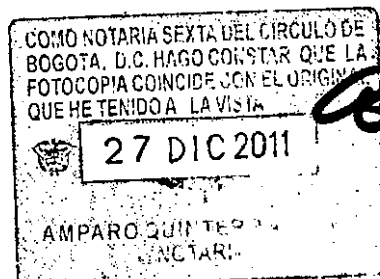
T.P.A. N° 23.555

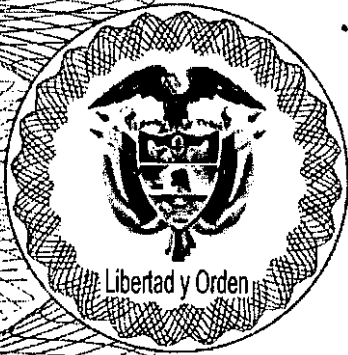
C.C. No. 35.456.344 de Usaquén



NOTARIA SEXTA DE BOGOTA
 RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL
 Bogotá, D.C.
 Ante mí AMPARO QUINTERO ARZUAGA
 NOTARIA SEXTA DEL CÍRCULO DE
 BOGOTÁ, D.C.
 Comparado(a) con *Emilio Ferrero*
Williamson y Luz Clemencia
Guarez de Paez
 Quien(es) es/son la(s) C.C.
 CC 438019 TP 31929
 CC 35456341 TP 23555
 y declaro(a) que la(s) firma(s) que acompaña(n)
 en el presente documento es/son la(s) suya(s) y
 que el contenido del mismo es cierto.
 En consecuencia se firma esta diligencia.

Emilio Ferrero
Luz Clemencia Guarez de Paez





REPÚBLICA DE COLOMBIA
MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
LEGALIZACION

País: **REPUBLICA DE COLOMBIA**
 (Country: - Pays:)

El presente documento público
 (This public document - Le présent acte public)

Ha sido firmado por: **LATORRE MENDOZA SERGIO ELEUTERIO**
 (Has been signed by: - A été signé par:)

Actuando en calidad de: **TRADUCTOR OFICIAL**
 (Acting in the capacity of: - Agissant en qualité de:)

Lleva el sello/estampilla de: **TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL**
 (Bears the seal/stamp of: - Est revêtu du sceau de / timbre de:)

Certificado
 (Certified - Attesté)

En: **BOGOTA D.C**
 (At: - À:)

El: **12/29/2011 11:55:14 AM**
 (On: - Le:)

Por: **APOSTILLA Y LEGALIZACIÓN**
 (By: The Ministry of Foreign Affairs of Colombia - Par: Ministère des Affaires Étrangères de la Colombie)

No: **LLMZD115513812**
 (Under Number: - Sous le numéro:)

Nombre del Titular: **12007490 13**
 (Name of the holder of document: - Nom du titulaire:)

Tipo de documento: **TRADUCCION APOSTILLA**
 (Type of document: - Type du document:)

Número de hojas: **6**
 (Number of pages: - Nombre de pages:)

01304100113219700546

Firmado Digitalmente por: (Digitally Signed by:)
 Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia
 AMPARO DE LA CRUZ TAMAYO RODRIGUEZ
 Reason: DOCUMENT AUTHENTICITY
 BOGOTA - COLOMBIA

La autenticidad de este documento puede ser verificada en el Registro Electrónico que se encuentra en la siguiente página
 The authenticity of this document may be verified by accessing the e-Register on the following web site:
 L'autenticité de cette document peut être vérifiée en accédant l'e-Registre sur le site web suivant:

www.cancilleria.gov.co/legalizaciones

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by M. Tarver

3. acting in the capacity of Certifying Officer

4. bears the seal/stamp of US Patent and Trademark Office

Certified

5. at Washington, D.C.

6. the first of December, 2011

7. by Assistant Authentication Officer, United States Department of State

8. No. 12007490-13

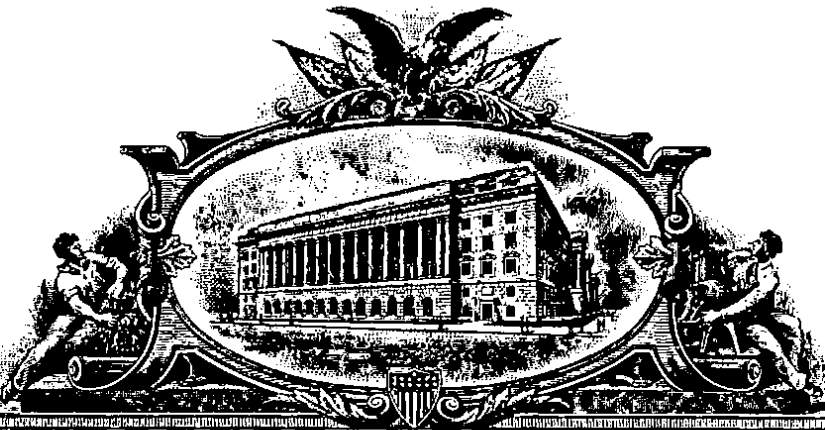
9. Seal/Stamp:

10. Signature:

Sonya N. Johnson

15774

A 7325937



THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office

November 21, 2011

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED IS A TRUE COPY FROM THE
RECORDS OF THIS OFFICE OF A DOCUMENT RECORDED ON
JULY 29, 2009.

By Authority of the
Under Secretary of Commerce for Intellectual Property
and Director of the United States Patent and Trademark Office



M. TARVER
Certifying Officer

PATENT ASSIGNMENT

Electron Version v1.1
 Stylesheet Version v1.1

SUBMISSION TYPE:	NEW ASSIGNMENT										
NATURE OF CONVEYANCE:	ASSIGNMENT										
CONVEYING PARTY DATA											
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 70%;">Name</th> <th style="width: 30%;">Execution Date</th> </tr> <tr> <td>Joshua A. Flook</td> <td>07/16/2009</td> </tr> <tr> <td>John R. Lawry</td> <td>07/16/2009</td> </tr> </table>	Name	Execution Date	Joshua A. Flook	07/16/2009	John R. Lawry	07/16/2009					
Name	Execution Date										
Joshua A. Flook	07/16/2009										
John R. Lawry	07/16/2009										
RECEIVING PARTY DATA											
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 20%;">Name:</td> <td>Dow AgroSciences LLC</td> </tr> <tr> <td>Street Address:</td> <td>9330 Zionsville Road</td> </tr> <tr> <td>City:</td> <td>Indianapolis</td> </tr> <tr> <td>State/Country:</td> <td>INDIANA</td> </tr> <tr> <td>Postal Code:</td> <td>46268</td> </tr> </table>	Name:	Dow AgroSciences LLC	Street Address:	9330 Zionsville Road	City:	Indianapolis	State/Country:	INDIANA	Postal Code:	46268	
Name:	Dow AgroSciences LLC										
Street Address:	9330 Zionsville Road										
City:	Indianapolis										
State/Country:	INDIANA										
Postal Code:	46268										
PROPERTY NUMBERS Total: 1											
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 35%;">Property Type</th> <th style="width: 65%;">Number</th> </tr> <tr> <td>Application Number:</td> <td>61183777</td> </tr> </table>	Property Type	Number	Application Number:	61183777							
Property Type	Number										
Application Number:	61183777										
CORRESPONDENCE DATA											
Fax Number: (317)337-4847 <i>Correspondence will be sent via US Mail when the fax attempt is unsuccessful.</i> Phone: 3173374087 Email: msbradley@dow.com Correspondent Name: Dow AgroSciences LLC Address Line 1: 9330 Zionsville Road Address Line 4: Indianapolis, INDIANA 46268											
ATTORNEY DOCKET NUMBER:	67538 US										
NAME OF SUBMITTER:	Melanie S. Bradley										
Total Attachments: 5 source=67538 Assignment#page1.tif source=67538 Assignment#page2.tif source=67538 Assignment#page3.tif											

CH \$40.00 61183777

500922451

PATENT
REEL: 023020 FRAME: 0326

source=67538 Assignment#page4.tif
source=67538 Assignment#page5.tif

PATENT
REEL: 023020 FRAME: 0327

ASSIGNMENT BY INVENTORS

THIS ASSIGNMENT, made this 3rd day of June 2009, by Joshua A. Flook and John R. Lawry (hereinafter referred to as Assignors), residing at 2434 W. Division Road, Tipton, Indiana 46072; and 15726 Wildrye Dr., Westfield, Indiana 46074, respectively;

WHEREAS, Assignors have invented certain new and useful improvements in **MULTIPLEX ANALYSIS OF STACKED TRANSGENIC PROTEIN**, set forth in a Provisional application for Letters Patent of the United States, already filed on June 3, 2009 as U.S. Application No. 61/183,777; and

WHEREAS, Dow AgroSciences LLC, a Limited Liability Company organized under and pursuant to the laws of the State of Delaware having its principal place of business at 9330 Zionsville Road, Indianapolis, Indiana 46268-1054 (hereinafter referred to as Assignee), is desirous of acquiring the entire right, title and interest in and to said inventions and said Application for Letters Patent of the United States, and in and to any Letters Patent of the United States to be obtained therefore and thereon.

NOW, for good and valuable consideration and/or the remuneration received for my/our work and/or other good and sufficient consideration, the receipt of which is hereby acknowledged, Assignors have sold, assigned, transferred and set over, and by these presents do sell, assign, transfer and set over, unto Assignee, its successors, legal representatives and assigns, the entire right, title and interest in and to the above-mentioned inventions and application for Letters Patent, and in and to any and all direct and indirect divisions, continuations and continuations-in-part of said application, and any and all Letters Patent in the United States and all foreign countries which may be granted therefore and thereon, and reissues, reexaminations and extensions of said Letters Patent, and all rights under the International Convention for the Protection of Industrial Property, the same to be held and enjoyed by Assignee, for its own use and benefit and the use and benefit of its successors, legal representatives and assigns, to the full end of the term or terms for which Letters Patent may be granted and/or extended, as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by Assignors, had this sale and assignment not been made.

AND for the same consideration, Assignors hereby represent and warrant to Assignee, its successors, legal representatives and assigns, that, at the time of execution and

67538 US

PATENT
REEL: 023020 FRAME: 0328

delivery of these presents, except for any rights, titles and/or interests that have arisen to Assignee under law or that have already been transferred to Assignee, Assignors are the sole and lawful owners of the entire right, title and interest in and to the said inventions and application for Letters Patent above-mentioned, and that the same are unencumbered and that Assignors have good and full right and lawful authority to sell and convey the same in the manner herein set forth.

AND for the same consideration, Assignors hereby covenant and agree to and with Assignee, its successors, legal representatives and assigns, that Assignors will sign all papers and documents, take all lawful oaths and do all acts necessary or required to be done for the procurement, maintenance, enforcement and defense of any Letters Patent and applications for Letters Patent for said inventions, without charge to Assignee, its successors, legal representatives and assigns, whenever counsel of Assignee, or counsel of its successors, legal representatives and assigns, shall advise: that any proceeding in connection with said inventions, or said Provisional application for Letters Patent, or any proceeding in connection with any Letters Patent or applications for Letters Patent for said inventions in any country, including but not limited to interference proceedings, is lawful and desirable; or, that any division, continuation or continuation-in-part of any application for Letters Patent, or any reissue, reexamination or extension of any Letters Patent, to be obtained thereon, is lawful and desirable.

AND Assignors hereby request the Commissioner of Patent and Trademarks to issue said Letters Patent of the United States to Assignee, as Assignee of said inventions and the Letters Patent to be issued thereon, for the sole use and benefit of Assignee, its successors, legal representatives and assigns.

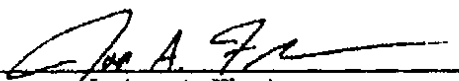
AND Assignors hereby grant the following individuals the power to insert on this Assignment any further identification which may be necessary or desirable in order to comply with the rules of the United States Patent and Trademark Office for recordation of this document:

DOW AGROSCIENCES LLC

All practitioners at Customer Number 25212

AND Assignors acknowledge an obligation of assignment of this invention to Assignee at the time the invention was made.

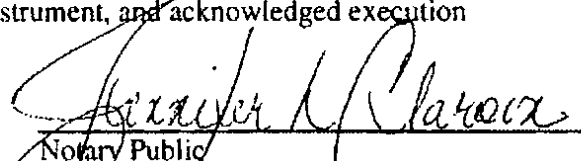
Application No.: 61/183,777
Docket No.: 67,538 US

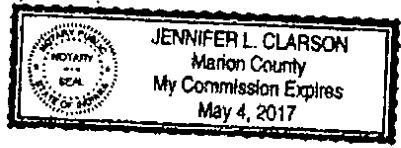

Joshua A. Flook

Date: 07/16/09

United States of America)
State of Indiana) ss.:
County of Marion)

On this 16th day of July, 2009, before me
personally came Joshua A. Flook, to me known to be the individual
described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged execution
of the same.


Notary Public



Application No.: 61/183,777
Docket No.: 67,538 US

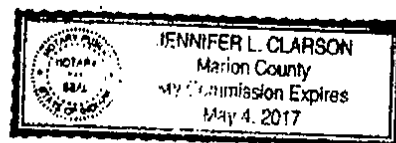
John R. Lawry
John R. Lawry

Date: 7/16/09

United States of America)
State of Indiana) ss.:
County of Marion)

On this 16th day of July, 2009, before me
personally came John R. Lawry, to me known to be the individual
described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged execution
of the same.

Jennifer L. Clarson
Notary Public



RECORDED: 07/29/2009

PATENT
REEL: 023020 FRAME: 0332

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 15774/2011 AL IDIOMA ESPAÑOL DE UN TEXTO ESCRITO EN INGLÉS, REALIZADA POR SERGIO ELEUTERIO LATORRE MENDOZA, TRADUCTOR OFICIAL AUTORIZADO POR RESOLUCIÓN No. 2839 DEL 30 DE DICIEMBRE DE 1991 EXPEDIDA POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEBIDAMENTE REGISTRADO ANTE EL MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES DE COLOMBIA.

APOSTILLA

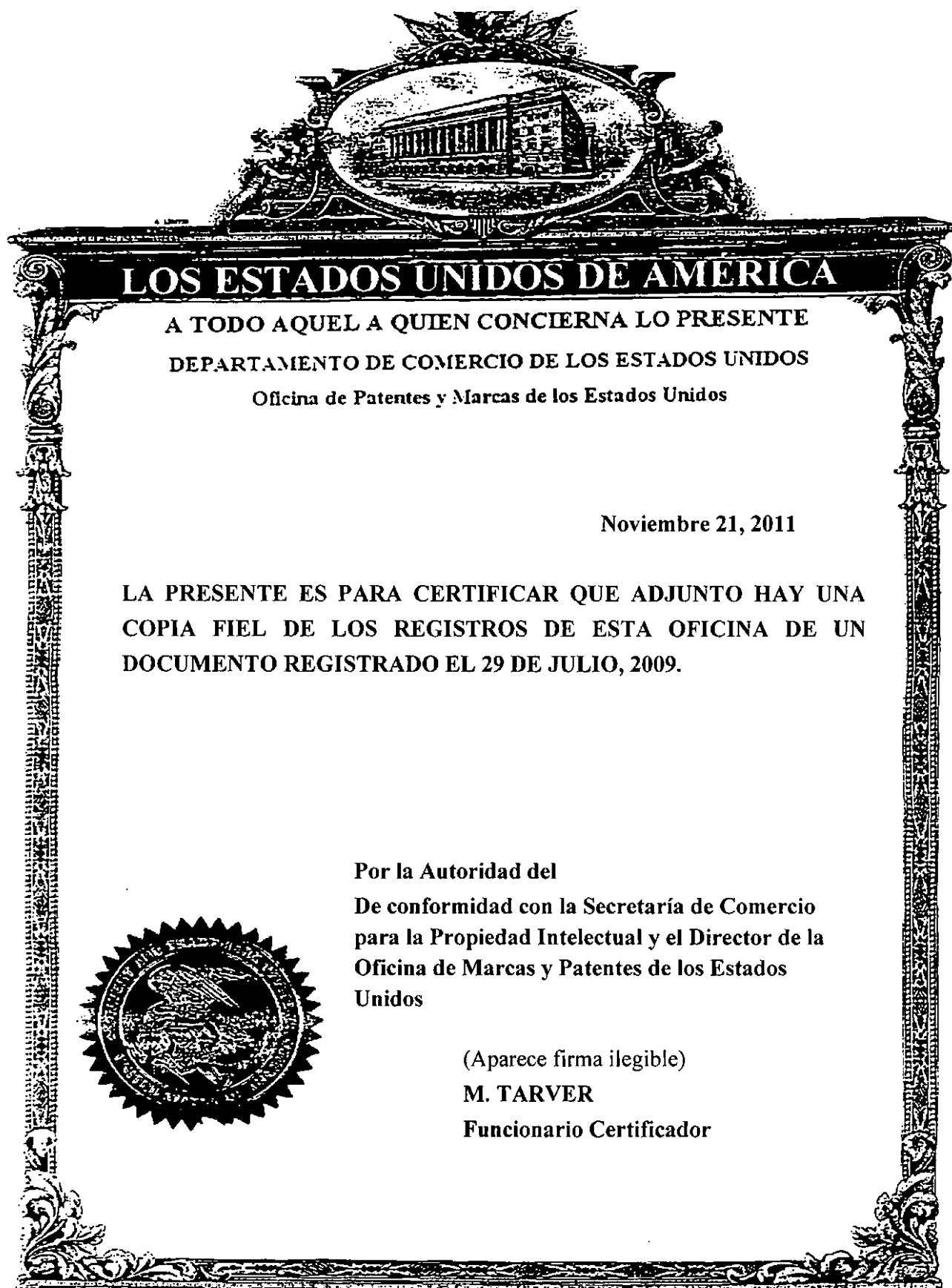
(Convención de La Haya de Octubre 5 de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
2. Este documento público
ha sido firmado por M. Tarver
3. actuando en calidad de Funcionario Certificador
4. y lleva el sello/timbre de Oficina de Marcas y Patentes de EE.UU.

CERTIFICA

5. en Washington, D.C.
6. el primero de diciembre, 2011
7. por *El Funcionario Adjunto de Autenticaciones, Departamento de Estado
de los Estados Unidos*
8. No. 12007490-13
9. Sello/Timbre
10. Firma
(aparece firma)
Sonya N Johnson

Sergio Eleuterio Latorre Mendoza
Traductor e Interpreté Oficial
Resol. No. 2839 Minjusticia



LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

A TODO AQUEL A QUIEN CONCIERNA LO PRESENTE
DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS
Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos

Noviembre 21, 2011

LA PRESENTE ES PARA CERTIFICAR QUE ADJUNTO HAY UNA
COPIA FIEL DE LOS REGISTROS DE ESTA OFICINA DE UN
DOCUMENTO REGISTRADO EL 29 DE JULIO, 2009.



Por la Autoridad del
De conformidad con la Secretaría de Comercio
para la Propiedad Intelectual y el Director de la
Oficina de Marcas y Patentes de los Estados
Unidos

(Aparece firma ilegible)

M. TARVER

Funcionario Certificador

Sergio Eleuterio Labrador Mendoza
Traductor e Interpreté Oficial
Resol. No. 2839 Minjusticia 1991

CESIÓN DE PATENTE

Versión Electrónica v1.1
Versión de Hoja de Estilo v1.1

TIPO DE PRESENTACIÓN:		NUEVA CESIÓN
NATURALEZA DE LA TRANSMISIÓN		CESIÓN
DATOS DE LAS PARTES QUE TRANSMITEN		
NOMBRE		FECHA DE LEGALIZACIÓN
Joshua A Flook		07/16/2009
John R Lawry		07/16/2009
DATOS DE LAS PARTES QUE RECIBEN		
Nombre:	Dow AgroSciences LLC	
Dirección:	9330 Zionsville Road	
Ciudad:	Indianápolis	
Estado/País	INDIANA	
Código Postal:	46268	
NÚMERO TOTAL DE PROPIEDAD: 1		
Tipo de Propiedad	Número	
Número de Solicitud:	61183777	
DATOS DE CORRESPONDENCIA		
Número de Fax	(317) 337- 4847	
<i>Se enviará correspondencia a través del correo EE.UU. cuando el intento de envío por fax no sea exitoso</i>		
Teléfono:	3173374087	
Correo electrónico:	msbradley@dow.com	
Nombre del Corresponsal:	Dow AgroSciences LLC	
Dirección Línea 1:	9330 Zionsville Road	
Dirección Línea 4:	Indianapolis, INDIANA 46268	
NÚMERO DE EXPEDIENTE DE ABOGADO	67538 US	
NOMBRE DEL REMITENTE	Melanie S. Bradley	
Total de anexos : 5		
source=67538 Assignment#page1.tif		
source=67538 Assignment#page2.tif		
source=67538 Assignment#page3.tif		

500922451

PATENTE
CARRETE: 023020 CUADRO 0326

source=67538 Assignment#page4.tif
source=67538 Assignment#page5.tif

PATENTE
CARRETE: 023020 CUADRO 0327

Sergio Eleuterio Latorre Mendoza
Traductor e Interpreté Oficial
Resol. No. 2839 Minjusticia 1999

CESIÓN POR INVENTORES

ESTA CESIÓN, se celebra el día 3 de junio de 2009, por Joshua A. Flook y John R. Lawry (en lo sucesivo denominados como los Cedentes), con domicilio en 2434 W. Division Road, Tipton, Indiana 46072; y 15726 Wildrye Dr., Westfield, Indiana 46074, respectivamente.

CONSIDERANDO QUE, los Cedentes han inventado ciertas mejoras nuevas y útiles en ANÁLISIS MÚLTIPLEX DE PROTEÍNA TRANSGÉNICA APILADA, establecidas en una solicitud de Provisional de Títulos de Patente de los Estados Unidos, ya presentada el 3 de junio, 2009 como la solicitud EE.UU. 61/183,777; y

CONSIDERANDO QUE, Dow AgroSciences LLC una Compañía de Responsabilidad Limitada constituida de conformidad con las leyes de Delaware que tiene su domicilio comercial principal en 9330 Zionsville Road, Indianápolis, Indiana 46268- 1054 (en lo sucesivo denominada como el Cesionario), tiene el deseo de adquirir el derecho completo, título e interés en y para dichas invenciones y dicha Solicitud de Títulos de Patente de los Estados Unidos, y en y para cualesquier Títulos de Patente de los Estados Unidos, que por lo tanto se vayan a obtener de la misma.

AHORA, a título oneroso y/o la remuneración recibida por mi/nuestro trabajo y/u otro título oneroso, cuya recepción se reconoce por este medio, los Cedentes han vendido, cedido, transferido y enajenado, y por la presente venden, ceden, transfieren y enajenan, al Cesionario, sus sucesores, representantes legales y cesionarios, el derecho completo, título e interés en y para las invenciones y Solicitud de Títulos de patente mencionadas anteriormente, y en y para todas y cualesquier divisiones directas e indirectas, continuaciones, y continuaciones en parte de dicha solicitud, y todos y cualesquier Títulos de Patente en los Estados Unidos y todos los otros países que se puedan otorgar para esta y con respecto a la misma, y reemisiones, reexaminaciones y extensiones de dichos Títulos de patente, y todos los derechos en virtud de la Convención Internacional para la Protección de la Propiedad Industrial, las mismas que se van a poseer y disfrutar por el Cesionario, para su propio uso y beneficio y el uso y beneficio de sus sucesores, representantes legales y cesionarios, hasta el final completo del término o términos para los cuales los Títulos de Patente se pueden otorgar y/o extender, tan plena y completamente como si los mismos hubieran sido poseídos y disfrutados por los Cedentes, si no se hubiera realizado esta venta y cesión.

Y por la misma contraprestación, los Cedentes por este medio declaran y garantizan al Cesionario, sus sucesores, representantes legales y cesionarios, que, al momento de la legalización y entrega de los mismos, excepto para cualesquier derechos, títulos y/o intereses que hayan surgido al Cesionario de

PATENTE
CARRETE: 023020 CUERPO *Carro Mendon*
Traductor e Interprete Oficial
Resol. No. 2839 Minjusticia 199

conformidad con la ley o que ya se hayan transferido al Cesionario, los Cedentes son los propietarios únicos y legales del derecho completo, título e interés en y para dichas invenciones y Solicitud de Títulos de Patente mencionadas anteriormente, y que las mismas están libres de gravámenes y que los Cedentes tienen el derecho vigente y completo y la autoridad legal para vender y transferir el mismo en la manera aquí establecida.

Y por la misma contraprestación, los Cedentes por este medio pactan y acuerdan para y con el Cesionario, sus sucesores, representantes legales y cesionarios, que los Cedentes firmarán todos los papeles y documentos, tomarán todos los juramentos legales y harán todos los actos necesarios o que se solicita que se hagan para la obtención, mantenimiento, aplicación y defensa de cualesquier Títulos de Patente y solicitudes de Títulos de Patente para dichas invenciones, sin cargo al Cesionario, sus sucesores, representantes legales y cesionarios, cada vez que un abogado del Cesionario, o Abogado de sus sucesores, representantes legales y cesionarios comunique: que cualquier procedimiento en relación con dichas invenciones o dicha solicitud Provisional de Títulos de Patente, o cualquier procedimiento en relación con cualesquier Títulos de Patente o solicitudes de Títulos de Patente para dichas invenciones en cualquier país, que incluyen pero no se limitan a procedimientos de interferencia sea legal y deseable, o, que cualquier división, continuación o continuación en parte de cualquier Solicitud de Títulos de Patente o cualquier republicación, reexaminación o extensión de cualesquier Títulos de Patente que se vayan a obtener de las mismas, sea legal y deseable.

Y los Cedentes por la presente solicitan al Comisionado de Marcas y Patentes emitir dichos Títulos de Patente de los Estados Unidos al Cesionario, como el Cesionario de dichas invenciones y los Títulos de Patente que se van a emitir de la misma, para el uso y beneficio único del Cesionario, sus sucesores, representantes legales y cesionarios.

Y los Cedentes por la presente otorgan a los siguientes individuos la facultad para insertar en esta Cesión cualquier identificación adicional que pueda ser necesaria o deseable con el fin de cumplir con las reglas de la Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos para inscripción de este documento:

DOW AGROSCIENCES LLC

Todos los profesionales con el Número de Cliente 25212

Y los Cedentes reconocen una obligación de cesión de esta invención al Cesionario en el momento en que se hace la invención.

PATENTE
CARRETE: 023020 CUADRO 0330

Sergio Eleuterio Laborde Mendoza
Traductor e Interpreté Oficial
Resol. No. 2639 Minjusticia: 2009

Solicitud No.: 61/183,777
Expediente No.67,538 US

(Aparece firma)
Joshua A. Flook

Fecha: 07/16/09
Estados Unidos de América)
Estado de Indiana)ss:
Condado de Marion)

El día 16 de julio, 2009, compareció ante mí, Joshua A. Flook, a quien conozco por ser el individuo descrito en y quien legaliza el anterior instrumento y reconoce la legalización del mismo.

SELLO

(aparece firma)
Notario Público

(Aparece sello:
JENNIFER L. CLARSON
Condado de Marion
Mi Comisión Expira
4 de mayo, 2017

PATENTE
CARRETE: 023020 CUADRO 0331

Solicitud No.: 61/183,777
Expediente No.67,538 US

(Aparece firma)
John R. Lawry

Fecha: 7/16/09
Estados Unidos de América)
Estado de Indiana)ss:
Condado de Marion)

El día 16 de julio, 2009, compareció ante mí, John R. Lawry, a quien conozco por ser el individuo descrito en y quien legaliza el anterior instrumento y reconoce la legalización del mismo.

(aparece firma)
SELLO Notario Público

(Aparece sello:
JENNIFER L. CLARSON
Condado de Marion
Mi Comisión Expira
4 de mayo, 2017

REGISTRADO 07/29/2009

PATENTE
CARRETE: 023020 CUADRO 0332
Sergio Eleuterio Patorre Mendoza
Traductor e Interprete Oficial
Resol. No 2839 Minjusticia 1997

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
9 December 2010 (09.12.2010)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2010/141674 A3

- (51) International Patent Classification:
B01D 59/44 (2006.01) *C07K 1/36* (2006.01)
C12P 21/06 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/US2010/037192
- (22) International Filing Date:
3 June 2010 (03.06.2010)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
61/183,777 3 June 2009 (03.06.2009) US
- (71) Applicant (*for all designated States except US*): **DOW AGROSCIENCES LLC** [US/US]; 9330 Zionsville Road, Indianapolis, IN 46268-1054 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (*for US only*): **LAWRY, John** [US/US]; 15726 Wildrye Dr., Westfield, IN 46074 (US). **FLOOK, Joshua** [US/US]; 2434 W. Division Road, Tip-ton, IN 46072 (US).
- (74) Agent: **CATAXINOS, Edgar, R.**; Law Offices of Trask Britt, 230 South 500 East, Suite 300, Salt Lake City, UT 84102 (US).
- (81) Designated States (*unless otherwise indicated, for every kind of national protection available*): AE, AG, AL, AM,

- AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (*unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Declarations under Rule 4.17:**
- *as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))*
- Published:**
- *with international search report (Art. 21(3))*
- (88) Date of publication of the international search report:
17 March 2011



WO 2010/141674 A3

(54) Title: MULTIPLEX ANALYSIS OF STACKED TRANSGENIC PROTEIN

(57) Abstract: The invention relates to methods for multiplex analysis of complex protein samples from plants using mass spectroscopy. In some embodiments, the disclosure concerns methods for maintaining a transgenic plant variety, for example by analyzing generations of a transgenic plant variety for presence and concentration of multiplexed transgenic proteins.

ANÁLISIS MÚLTIPLEX DE PROTEÍNA TRANSGÉNICA APILADA

[0001] Esta solicitud reclama prioridad con base en la solicitud provisional 61/183,777 que se presentó en la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos el 3 de junio de 2009, cuya completa divulgación se incorpora por el presente por referencia.

CAMPO TÉCNICO

[0002] La invención se refiere generalmente a análisis de alta productividad de rasgos de plantas. En ciertas modalidades, la invención se refiere a métodos de análisis de alta productividad y cuantificación de proteínas de plantas, determinadas por espectrometría de masas con una sola inyección de muestras de proteína compleja, derivada de plantas y tejido vegetal. Ciertas modalidades se refieren además a métodos de analizar genotipos de plantas transgénicas y mantener la expresión en esas plantas de rasgos deseables de plantas.

ARTE PREVIO

[0003] El empleo cada vez mayor de la tecnología de ADN recombinante para producir plantas transgénicas para uso industrial y comercial requiere el desarrollo de métodos de alta productividad para analizar líneas de plantas transgénicas. Tales métodos se necesitan para mantener variedades de plantas transgénicas a través de generaciones sucesivas, evitar el escape transgenes al ambiente y contribuir al rápido desarrollo de plantas transgénicas con fenotipos óptimos y deseables. Más aún, directivas actuales para la evaluación de seguridad de plantas genéticamente modificadas (*GM plants*) propuestas para consumo humano exigen la caracterización en el nivel de ADN y proteínas entre el cultivo progenitor y el transformado. Sesikeran y Vasanthi (2008) *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 17 Suppl. 1:241-44. Las nuevas variedades de plantas que se han desarrollado consisten en modificaciones genéticas crecientemente complejas incluyendo, *inter alia*, genes y rasgos apilados.

[0004] Los métodos actuales para análisis de plantas transgénicas que se prefieren en el arte son: técnicas a base de ADN (v.g., PCR); RT-PCR; el uso de genes reporteros; transferencia Southern; e inmunquímica. Todas estas metodologías adolecen de varias desventajas, y se desea un método superior que

sea ampliamente capaz de identificar y cuantificar, en forma rápida y económica, múltiples productos de genes transgénicos en una manera de alta productividad a partir de una muestra limitada de una planta transgénica.

[0005] Técnicas basadas en ADN para análisis de plantas transgénicas adolecen de varias deficiencias notables. A pesar del hecho que la transformación mediada por *Agrobacterium* es el método más preferido de transformación genética de plantas, los genotipos de plantas transformadas con *Agrobacterium* son difíciles de analizar por metodologías basadas en PCR. Véase Nain *et al.* (2005) *Plant Mol. Biol. Rep.* 23:59-65. La presencia incluso de cantidades trazadoras de *Agrobacterium* en tejidos transformados produce rendimientos PCR engañosos. *Id.* Los formatos de amplificación de ADN requieren igualmente experimentación empírica de cebadores específicos del gen y condiciones del termociclador. Muy significativamente, metodologías a base de ADN para detectar sistemáticamente (*screening*) plantas transgénicas no determinan actualmente la expresión de la proteína de producto génico. De manera semejante, RT-PCR o análisis con membrana de Northern (*Northern blot*) pueden utilizarse para confirmar la presencia de transcritos de transgenes en material de plantas transgénicas. Alwine *et al.* (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 74:5350-54; Toplak *et al.* (2004) *Plant Mol. Biol. Rep.* 22:237-50. Ninguno de estos métodos confirma la presencia de expresión de proteínas actuales en el material de la planta fuente. Estas técnicas requieren asimismo el uso de materiales radioactivos y/o grandes cantidades de tejido y tiempo de procesamiento.

[0006] Los genes reporteros, tales como los genes que codifican proteínas fluorescentes, pueden co-transformarse igualmente en plantas transgénicas para proporcionar una herramienta para identificar transformantes. No obstante, los genes reporteros son únicamente reporteros indirectos de recombinación genética. La expresión del constructo del gen reportero no confirma la expresión del transgén acompañante. Además, el gen reportero o el transgén pueden perderse en generaciones sucesivas de la planta hospedera, desacoplando así la presencia del reportero del transgén de interés. Análogamente, los transgenes pueden escapar de la planta hospedera a las plantas vecinas, por ejemplo, mediante polinización cruzada, sin escape concurrente del gen reportero. Cuando múltiples genes se apilan en una planta transgénica, tendría que introducirse un número igual de genes reporteros para analizar el proteoma transgénico y, puesto que la función del gen reportero es únicamente un reportero indirecto de la función del

transgén, no se detectarían cambios en la expresión de un transgén en respuesta a la presencia de un transgén adicional.

[0007] A diferencia de los métodos descritos anteriormente, puede utilizarse inmunoquímica para identificar productos de expresión transgénica en una planta transgénica. Aunque la inmunoquímica es útil para este propósito, el método requiere muestras de proteína altamente purificada para producción de anticuerpos. Los anticuerpos resultantes tienen que analizarse con respecto a su especificidad, y tienen que desarrollarse condiciones de análisis específicas del reactivo. Los altos niveles de expresión y purificación requeridos para conducir inmunoquímica, así como el problema relacionado de eliminar contaminantes del tejido de la planta, son limitaciones a la utilidad de este método.

[0008] Puede usarse asimismo espectrometría de masas para analizar el proteoma de una planta transgénica. Sin embargo, las técnicas espectrométricas reconocidas por el arte requieren que mezclas complejas de proteínas de plantas se separen primero mediante electroforesis en gel 2-D. Rajagopal y Ahern (2001) *Science* 294(5551):2571-73; véase también Domon y Aebersold (2006) *Science* 312(5771):212-17, 214. Bandas individuales de la muestra de proteína separada en el gel pueden digerirse entonces con una proteasa y someterse a espectrometría de masas para identificar la proteína única originalmente presente en la banda no digerida. Véase, v.g., Chang *et al.* (2000) *Plant Physiol.* 122(2):295-317. El paso de separación en gel en este método es un proceso intensivo en tiempo que impide el uso de espectrometría de masas en aplicaciones de alta productividad.

[0009] Existe una necesidad en el arte de un método de alta productividad para detectar y cuantificar la presencia de productos de expresión transgénica en plantas que no requiera proteína purificada o altamente expresada, o reactivos específicos del método. Este método será útil en ayudar a los cultivadores y agricultores de plantas transgénicas a mantener el fenotipo de la variedad de planta transgénica diana a través de generaciones sucesivas de reproducción sexual y/o asexual. El método será igualmente útil en analizar rápidamente plantas producidas de un procedimiento de transformación para identificar aquellas plantas producidas que son plantas transgénicas y expresan la proteína introducida en tejidos deseados. Además, el método puede utilizarse para detectar selectivamente en forma rápida plantas en riesgo de ser contaminadas con

transgenes de una planta transgénica, con el fin de realizar el bioconfinamiento de la planta transgénica.

RESUMEN DE LA DIVULGACIÓN

[0010] Una modalidad particular de la invención incluye un método de alta productividad para detectar y cuantificar la presencia de dos o más proteínas de interés con secuencias de aminoácidos conocidas en una muestra basada en una planta. El método incluye proveer una primera inyección de una muestra compleja basada en una planta, que contiene proteínas, y digerir las proteínas de la muestra compleja basada en una planta en péptidos. Alternativamente, el método incluye un paso preliminar de digerir las proteínas de la muestra compleja basada en una planta en péptidos, paso seguido por proporcionar una primera inyección de los péptidos. A continuación, los péptidos se separan y ionizan. Se obtienen datos simultáneos de espectros de masas para los péptidos y se determina la presencia o ausencia de las dos o más proteínas de interés.

[0011] Otra modalidad de la invención incluye un método de alta productividad de detectar la presencia de dos o más proteínas de interés con secuencias de aminoácidos conocidas en una muestra basada en una planta. El método incluye proveer datos de espectros de masas para dos o más proteínas de interés y proporcionar una primera inyección de una muestra compleja basada en una planta, que contiene proteínas. Las proteínas de la muestra compleja basada en una planta se digieren en péptidos y los péptidos se separan entonces y se ionizan. Se obtienen datos simultáneos de espectros de masas para los péptidos. Los datos simultáneos de espectros de masas se comparan con los datos de espectros de masas provistos para las dos o más proteínas de interés, determinando en esa forma la presencia o ausencia de las dos o más proteínas de interés.

[0012] Todavía otra modalidad de la invención incluye un método para mantener el genotipo de una variedad de planta transgénica. El método incluye: (i) proveer datos de espectros de masas para uno o más producto(s) esperado(s) de expresión transgénica en la variedad de planta transgénica; (ii) proporcionar una primera inyección de una muestra compleja que contiene proteínas de una primera generación de la variedad de planta transgénica; (iii) digerir las proteínas de muestra compleja basada en una planta en péptidos; (iv) separar los péptidos; (v)

ionizar los péptidos; (vi) obtener datos simultáneos de espectros de masas para los péptidos, y comparar los datos simultáneos de espectros de masas con los datos de espectros de masas provistos para los productos esperados de expresión transgénica, determinando en esa forma la presencia o ausencia de los productos esperados de expresión transgénica en la primera generación de la variedad de planta transgénica; (vii) proporcionar una primera inyección de una muestra compleja que contiene proteínas de una segunda generación de la variedad de planta transgénica; (viii) repetir los pasos (iii)-(vi) con la muestra compleja que contiene proteínas de la segunda generación de la variedad de planta transgénica; y (ix) no propagar la segunda generación de la variedad de planta transgénica si no puede confirmarse la presencia del (de los) producto(s) de expresión transgénica en los datos de espectros de masas para los péptidos de la muestra de proteína compleja de la segunda generación de la variedad de planta transgénica, manteniendo en esa forma el genotipo de la variedad de planta transgénica.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0013] FIG. 1 muestra detección múltiplex LC\MS\MS de AAD-1.

[0014] FIG. 2 muestra detección múltiplex LC\MS\MS de AAD-12.

[0015] FIG. 3 muestra detección múltiplex LC\MS\MS de Cry1F.

[0016] FIG. 4 muestra detección múltiplex LC\MS\MS de Cry34.

[0017] FIG. 5 muestra detección múltiplex LC\MS\MS de Cry35.

[0018] FIG. 6 muestra detección múltiplex LC\MS\MS de PAT.

[0019] FIG. 7 muestra detección múltiplex LC\MS\MS de Cry1F, expresada en tejido de maíz endógamo.

[0020] FIG. 8 muestra detección múltiplex LC\MS\MS de Cry34, expresada en tejido de maíz endógamo.

[0021] FIG. 9 muestra detección múltiplex LC\MS\MS de Cry35, expresada

en tejido de maíz endógamo.

[0022] FIG. 10 muestra detección múltiplex LC\MS\MS de PAT, expresada en tejido de maíz endógamo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0023] La especificidad permitida en una metodología de espectrometría de masas para identificar una proteína individual de una muestra compleja es única en que sólo se requiere la secuencia de la proteína de interés, con el fin de identificar la proteína de interés. Comparada con otros formatos de multiplexado, la espectrometría de masas es única en ser capaz de aprovechar la longitud total de una secuencia de aminoácidos primaria de una proteína para reconocer (to *target*) porciones individuales, tipo identificadores, de una secuencia de aminoácidos primaria de una proteína para eliminar virtualmente la detección no específica. En algunas modalidades de la presente invención, un fragmento proteolítico o conjunto de fragmentos proteolíticos, que identifica(n) únicamente una proteína(s) de interés, se utilizan para detectar las proteína(s) de interés en una muestra de proteína compleja.

[0024] En términos amplios, métodos particulares de la invención permiten monitorear cualquier proteína(s) directamente y cuantificarla a partir del tejido de interés requiriendo únicamente el conocimiento previo de la secuencia de aminoácidos de la proteína(s). El método puede realizarse en una manera de alta productividad, sin la necesidad de desarrollar/analizar un reactivo de detección específico del método. Tener una proteína purificada como un reactivo para el desarrollo de un método es siempre benéfico, pero para este análisis una proteína que puede purificarse únicamente hasta, por ejemplo, 60%, puede ser aún apropiada para el desarrollo del método. Métodos de acuerdo con la presente divulgación pueden eliminar la necesidad para un experto en el arte de desarrollar métodos a menudo desafiantes para preparar muestras de proteína altamente purificada para producción de anticuerpos. Por consiguiente, métodos de la presente divulgación pueden ahorrar tiempo y recursos. Más aún, los métodos ofrecen más variedad de reactivos de proteína apropiados para análisis múltiplex, puesto que pueden no requerirse los esfuerzos para eliminar, por ejemplo, el 30-40% final de los contaminantes. Los métodos divulgados representan además una mejora necesaria sobre las metodologías múltiplex a base de amplificación de

ADN, que requieren experimentación empírica de cebadores específicos del gen y condiciones del termociclador, y que crean, por lo demás, situaciones en las que cualquier falta de especificidad de la diana puede disminuir significativamente la exactitud del método debido a la amplificación exponencial requerida para la detección de ADN.

[0025] En modalidades particulares, métodos de la presente invención permiten la ingeniería inversa de la proteína para determinar por qué una proteína particular posee propiedades únicas, sin necesidad de requerir la proteína actual para iniciar un estudio. Por ejemplo, modificaciones de secuencia y/o modificaciones post-traduccionales de proteínas diana que están asociadas con rasgos de plantas deseables o indeseables pueden identificarse a partir de datos de espectros de masas de una muestra de proteína compleja de una planta, que expresa el rasgo deseable o indeseable.

[0026] En algunas modalidades, los métodos divulgados permiten la cuantificación o determinación de relaciones de múltiples proteínas en una muestra de proteína compleja mediante un análisis individual de espectrometría de masas, por oposición a medir cada proteína de interés individualmente muchas veces y compilar los resultados individuales en un resultado de muestra.

[0027] En todavía otras modalidades, la presente divulgación provee también métodos útiles para el desarrollo y uso de tecnología de plantas transgénicas. Específicamente, los métodos divulgados pueden utilizarse para mantener el genotipo de plantas transgénicas a través de generaciones sucesivas. Además, algunas modalidades de los métodos divulgados en esta especificación pueden utilizarse para facilitar análisis de alta productividad de plantas no-transgénicas que están en riesgo de ser contaminadas con transgenes de plantas vecinas, por ejemplo, mediante polinización cruzada. Mediante estas modalidades, puede facilitarse y/o realizarse el bioconfinamiento de transgenes. En otras modalidades, los métodos divulgados en esta especificación pueden emplearse para detectar selectivamente (*to screen*) los resultados de un procedimiento de transformación de una planta en una manera de alta productividad para identificar transformantes, que exhiban características de expresión deseables.

I. Abreviaturas

[0028] La presente invención se describirá con referencia a las siguientes abreviaturas:

[0029] AAD-1 (R)-2,4-diclorofenoxipropionato dioxigenasa

[0030] AAD-12 (S)-2,4-diclorofenoxipropionato/alfa-ketoglutarato dioxigenasa

[0031] CID Disociación inducida por colisión

[0032] Cry1F Proteína de cristal plaguicida cry1Fa (delta-endotoxina insecticida Cry1F(a))

[0033] Cry34 Proteína de cristal ET79 (*Bacillus thuringiensis*)

[0034] Cry35 Tipo Cry35Ab (*Bacillus thuringiensis*)

[0035] CE Electroforesis capilar

[0036] ADN Ácido desoxirribonucleico

[0037] ELISA Enzimoimmunoanálisis de adsorción

[0038] EPI Producción mejorada de iones

[0039] GM Modificado genéticamente

[0040] IDA Adquisición dependiente de la información

[0041] LC\MS\MS Espectrometría de masas en tándem con cromatografía líquida

[0042] MRM Monitoreo de reacciones múltiples

[0043] MS Espectrometría de masas

[0044] MSMS Espectrometría de masas en tándem

[0045] PAT Fosfinotricina N-acetiltransferasa (PPT N-acetiltransferasa)

[0046] PCR Reacción en cadena de la polimerasa

[0047] RT-PCR Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa

II. Términos

[0048] Con el fin de facilitar la revisión de las diferentes modalidades de la divulgación, se provee la siguiente explicación de términos específicos:

[0049] Bioconfinamiento: Tal como se emplea en esta especificación, el término "bioconfinamiento" se refiere a la restricción del movimiento de plantas genéticamente modificadas o su material genético a áreas designadas. El término incluye confinamiento físico, físico-químico, biológico, así como otras formas de confinamiento que impidan la supervivencia, difusión o reproducción de una planta genéticamente modificada en el ambiente natural o en condiciones de crecimiento artificial.

[0050] Muestra de proteína compleja: Tal como se emplea en esta especificación, el término "muestra de proteína compleja" se utiliza para distinguir una muestra de una muestra de proteína purificada. Una muestra de proteína compleja contiene múltiples proteínas, y puede contener adicionalmente otros contaminantes.

[0051] Espectrometría de masas: Tal como se emplea en esta especificación, el término general "espectrometría de masas" se refiere a cualquier método apropiado de espectrometría de masas, equipo o configuración incluyendo, v.g., ionización por electrospray (ESI), desabsorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI - *matrix-assisted laser desorption/ionization*) MS, MALDI-tiempo de vuelo (TOF - *time of flight*) MS, MALDI MS a presión atmosférica (AP - *atmospheric pressure*), MALDI MS en vacío, MS en tándem, o cualquier combinación de las anteriores. Los equipos de espectrometría de masas miden la masa molecular de una molécula (como una función de la relación masa-a-carga de la molécula) cuantificando la trayectoria de vuelo de la molécula a través de un

conjunto de campos magnéticos y eléctricos. La relación masa-a-carga es una magnitud física que se utiliza ampliamente en la electrodinámica de partículas cargadas. La relación masa-a-carga de un péptido particular puede calcularse, *a priori*, por una persona experta en el arte. Dos partículas con diferente relación masa-a-carga no se moverán en la misma trayectoria en un vacío cuando se someten a los mismos campos eléctricos y magnéticos. La presente invención incluye, *inter alia*, el uso de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC - *high performance liquid chromatography*) seguida por análisis MS en tándem de los péptidos.

[0052] Los instrumentos de espectrometría de masas constan de tres módulos: una fuente iónica, que divide las moléculas de la muestra en iones; un analizador de masas, que clasifica los iones por sus masas aplicando campos electromagnéticos; y un detector, que mide el valor de una cantidad indicadora y, en esa forma, proporciona datos para calcular las abundancias de cada ión presente. La técnica tiene aplicaciones cualitativas y cuantitativas. Éstas incluyen identificar compuestos desconocidos, determinar la composición isotópica de elementos en una molécula, determinar la estructura de un compuesto observando su fragmentación, y cuantificar la cantidad de un compuesto en una muestra.

[0053] Un vistazo general detallado de las metodologías y equipos de espectrometría de masas puede encontrarse en las siguientes referencias, las cuales se incorporan por el presente por referencia: Carr y Annan (1997) Overview of peptide and protein analysis by mass spectrometry. En: Current Protocols in Molecular Biology, editado por Ausubel, *et al.*, New York: Wiley, páginas 10.21.1-10.21.27; Paterson y Aebersold (1995) *Electrophoresis* 16: 1791-1814; Patterson (1998) Protein identification and characterization by mass spectrometry. En: Current Protocols in Molecular Biology, editado por Ausubel, *et al.*, New York: Wiley, páginas 10.22.1-10.22.24; y Domon y Aebersold (2006) *Science* 312(5771):212-17.

[0054] Múltiplex: Tal como el término se emplea en esta especificación, las proteínas y/o péptidos son "multiplexados" cuando dos o más proteínas y/o péptidos de interés están presentes en la misma muestra.

[0055] Rasgo de una planta: Tal como se emplea en esta especificación, un "rasgo de una planta" puede referirse a cualquier característica individual o

medición cuantificable de una planta.

[0056] Péptido: Los péptidos son polímeros cortos formados de la conexión, en un orden definido, de α -aminoácidos. Los péptidos pueden generarse igualmente por la digestión de polipéptidos, por ejemplo proteínas, con una proteasa.

[0057] Proteína: Las proteínas son compuestos orgánicos compuestos de aminoácidos dispuestos en una cadena lineal y unidos entre sí por enlaces peptídicos entre los grupos carboxilo y amino de residuos de aminoácido adyacentes. La secuencia de aminoácidos en una proteína se define por la secuencia de un gen, que se codifica en el código genético. En general, el código genético especifica 20 aminoácidos estándar; no obstante, en ciertos organismos el código genético puede incluir selenocisteína – y en ciertos arqueas - pirrolisina. A menudo se observa que los residuos en una proteína se modifican químicamente por modificación post-traducciona, la cual puede ocurrir o bien antes de que la proteína se use en la célula, o bien como parte de mecanismos de control. Los residuos de proteína pueden modificarse asimismo mediante diseño, de acuerdo con técnicas familiares a las personas expertas en el arte. Tal como se emplea en esta especificación, el término "proteína" engloba cadenas lineales que contienen aminoácidos de ocurrencia natural, aminoácidos sintéticos, aminoácidos modificados, o combinaciones de cualquiera o todos los anteriores.

[0058] Inyección única: Tal como se emplea en esta especificación, el término "inyección única" se refiere al paso inicial en la operación de un equipo MS o LC-MS. Cuando una muestra de proteína se introduce en el equipo en una inyección única, toda la muestra se introduce en un paso único.

[0059] Apilado/apilamiento: Tal como se emplea en esta especificación, el término "apilado" se refiere a la presencia de múltiples polinucleótidos heterólogos incorporados en el genoma de una planta.

[0060] Espectrometría de masas en tándem: En la espectrometría de masas en tándem, un ión progenitor, generado de una molécula de interés, puede filtrarse en un instrumento MS, y el ión progenitor puede fragmentarse posteriormente para producir uno o más iones hijos, que se analizan entonces (se detectan y/o cuantifican) en un segundo procedimiento MS.

[0061] Plantas transgénicas: Tal como se emplea en esta especificación, el término "planta transgénica" incluye la referencia a una planta que contiene en su genoma un polinucleótido heterólogo. Generalmente, el polinucleótido heterólogo se integra establemente dentro del genoma, de tal manera que el polinucleótido se pasa a sucesivas generaciones. El polinucleótido heterólogo puede integrarse en el genoma solo o como parte de una casete de expresión recombinante. "Transgénico" se utiliza en esta especificación para incluir cualquier célula, estirpe celular, callo, tejido, parte de una planta o planta, cuyo genotipo ha sido alterado por la presencia de ácido nucleico heterólogo, incluyendo aquellas plantas transgénicas inicialmente alteradas de tal manera, así como las creadas por cruces sexuales o propagación asexual a partir de las plantas transgénicas iniciales.

III. ***Selección de Proteína Transgénica Para Análisis Múltiplex***

[0062] Cualquier proteína introducida en una planta *mediante* tecnología de expresión transgénica puede analizarse utilizando métodos de la invención. Proteínas apropiadas para análisis múltiplex de acuerdo con la invención pueden conferir un rasgo de salida (*an output trait*) que hace a la planta transgénica superior a su contraparte no transgénica. Ejemplos no limitantes de rasgos deseables, que pueden conferirse, incluyen resistencia a los herbicidas, resistencia al impacto ambiental negativo, mayor rendimiento, valor nutricional mejorado, vida útil mejorada, contenido alterado de aceite, composición alterada de aceite, contenido alterado de azúcar, contenido alterado de almidón, producción de productos farmacéuticos a base de plantas, producción de productos industriales (v.g., polihidroxialcanoatos: poliésteres de macromoléculas considerados ideales para reemplazar plásticos derivados del petróleo) y potencial de biorremediación. Más aún, la expresión de una o más proteínas transgénicas dentro de una sola especie de plantas puede analizarse empleando métodos de la presente divulgación. La adición o modulación de dos o más genes o rasgos deseados en una especie individual de interés es conocida como apilamiento de genes (*gene stacking*). Más aún, la expresión de una o más proteínas transgénicas puede analizarse concurrentemente en los análisis múltiplex actualmente divulgados con una o más proteínas vegetales endógenas.

[0063] La preferencia por las proteínas particulares a analizar está a

discreción del artesano experto. Tales proteínas pueden ser, pero no se limitan a, las de plantas, animales, levadura, y similares, y pueden ser proteínas o bien no encontradas en una célula no transformada o bien encontradas en una célula transformada. Proteínas particularmente apropiadas que se expresan en plantas transgénicas son aquellas que confieren tolerancia a herbicidas, insectos, o virus, y genes que proporcionan valor nutricional mejorado, mayores rendimientos, tolerancia a la sequía, utilización del nitrógeno, producción de compuestos industriales útiles, características de procesamiento de la planta, o potencial de biorremediación. Ejemplos de proteínas útiles incluyen el gen insecticida de *Bacillus thuringiensis* para conferir resistencia a los insectos, y el gen de la 5'-enolpiruvil-3'-fosfoshikimato sintasa (EPSPS) y cualquier variante del mismo para conferir tolerancia a herbicidas de glifosato. Como se entiende fácilmente por los expertos en el arte, cualquier proteína que confiera un rasgo deseado puede expresarse en una célula de una planta utilizando tecnología de ADN recombinante.

IV. Selección de Fragmentos Peptídicos

[0064] Proteínas diana pueden identificarse de acuerdo con la presente divulgación determinando la presencia fragmentos peptídicos proteolíticos de las proteínas diana en espectros MS de una muestra compleja de proteínas de una planta. Las enzimas proteasas escinden proteínas en secuencias específicas de aminoácidos que pueden verificarse fácilmente dentro de la secuencia completa de una proteína diana. Por consiguiente, el conjunto de fragmentos peptídicos a producirse por una digestión con una o más proteasas puede deducirse *a priori*. Una relación de carga a masa única de un péptido deducido particular puede determinarse entonces por su secuencia primaria de aminoácidos.

[0065] Fragmentos peptídicos pueden verificarse asimismo empíricamente a partir de espectros MS de proteínas diana digeridas. Una modalidad particular de la invención podría ser la selección de un péptido, cuya secuencia es interna, de sitios de escisión proteolítica predichos. Para selección empírica de fragmentos peptídicos para identificación de proteínas diana, muestras de proteínas digeridas pueden someterse a espectrometría de masas para determinar fragmentos peptídicos que proveen la sensibilidad y especificidad de detección requeridas para identificación de proteínas múltiplex. Generalmente, se prefieren para selección los péptidos ionizados más abundantes. La abundancia de un péptido

ionizado particular es una función de la abundancia del péptido y la eficiencia de ionización del péptido.

[0066] Las proteínas de interés en un producto apilado se expresarán en diferentes niveles relativos entre sí. Los péptidos detectados se derivarán de las proteínas individuales que se están expresando en concentraciones variables y a veces desconocidas. La detección de péptidos y proteínas variará desde las concentraciones attomolares a micromolares. La pureza de las muestras a analizarse variará desde las proteínas estándar purificadas en soluciones amortiguadoras de pH (*buffer solutions*) a una matriz de planta cruda extraída de varios tejidos de interés. Los fragmentos peptídicos se identificarán en una matriz de una planta cruda, así como en una matriz de muestra de tejido parcialmente purificada, si la detección diana requiere reducir la complejidad de la matriz de la muestra antes de la detección.

V. *Análisis MRM Dirigido*

[0067] Una vez se identifican uno o más fragmentos peptídicos de una proteína diana a determinarse durante análisis múltiplex, se desarrolla un análisis MRM dirigido (*a targeted MRM analysis*) para la proteína diana. Preferiblemente, el análisis MRM dirigido para una proteína diana dada identificará aquellos péptidos seleccionados previamente que son los iones de fragmento más abundantes. Por consiguiente, cada péptido diana a determinarse en un análisis múltiplex puede tener un análisis MRM orientado que se desarrolla para identificar iones de fragmento únicos de ese péptido diana. El análisis múltiplex ocurre mediante un análisis MRM concurrente, que incluye fragmentos peptídicos únicos, tipo identificador, específicos para dos o más proteínas diana en la muestra de tejido de una planta. Preferiblemente, el análisis multiplexado identificará concurrentemente aquellos péptidos específicos de una proteína diana que demuestren ionización y fragmentación eficientes luego del análisis tanto en la presencia como la ausencia de una matriz compleja. Una proteína diana incluida en el análisis múltiplex puede identificarse con uno o más pares de transiciones de iones hijos/progenitores específicos.

[0068] Un análisis múltiplex MS/MS único puede realizarse entonces para múltiples proteínas diana en una mezcla de proteína compleja. Debido a la sensibilidad y la selectividad de la espectrometría de masas, una muestra de

proteína compleja a someterse a análisis múltiplex MS/MS no necesita ser tan pura o abundante como una muestra a analizarse por técnicas convencionales, tales como inmunoquímica o PCR. No obstante, una muestra de proteína compleja a someterse a análisis múltiplex MS/MS puede prepararse de acuerdo con condiciones de extracción optimizadas para desempeño analítico robusto del método múltiplex. Muestras de proteína pueden prepararse de acuerdo con técnicas tales como, *inter alia*, extracción de sal (por ejemplo, bicarbonato de amonio), extracción de sal en la presencia de urea, y extracción de detergente (por ejemplo, CHAPS), u otras metodologías tipo enriquecimiento.

[0069] El material de la planta del cual puede prepararse una muestra de proteína multiplexada está a discreción del artesano experto. Material apropiado puede incluir, por ejemplo, tejido o células de una planta transgénica, tejido de una planta o células resultantes de un procedimiento de transformación genética, tejido o células de plantas no transgénicas, que se están analizando para detectar la presencia de un transgén contaminante, o materiales derivados de una planta de origen de planta transgénica sospechosa.

[0070] El análisis múltiplex MS se realiza en la muestra de proteína compleja. La muestra de proteína compleja se inyecta en una cámara de ionización de la MS en la cual se produce un primer ión (progenitor). El ión progenitor puede detectarse directamente en una primera MS, o puede aislarse por la primera MS, fragmentarse en iones hijos característicos, y detectarse uno o más de los iones hijos en una segunda MS (MS/MS).

[0071] Los iones pueden detectarse utilizando varios modos de detección. Por ejemplo, iones seleccionados pueden detectarse empleando un modo de monitoreo selectivo de iones (SIM - *selective ion monitoring*), que incluye monitoreo de reacción múltiple (MRM - *multiple reaction monitoring*), o monitoreo de reacción seleccionado (SRM - *selected reaction monitoring*). Alternativamente, los iones pueden detectarse empleando un método de escaneo.

[0072] La relación masa-a-carga puede determinarse utilizando un analizador cuadrupolar (*quadrupole analyzer*). Por ejemplo, en un "cuadrupolar" o instrumento de "trampa de iones cuadrupolar", los iones en un campo de frecuencia de radio oscilante experimentan una fuerza proporcional al potencial DC aplicado entre los electrodos, la amplitud de la señal RF y la m/z . El voltaje y la

amplitud pueden seleccionarse de manera que únicamente los iones que tienen una m/z recorran la longitud del cuadrupolar, mientras que todos los demás iones se deflectan. Por consiguiente, instrumentos cuadrupolares pueden actuar como un "filtro de masas" y "un detector de masas" para los iones inyectados en el instrumento.

[0073] Disociación inducida por colisión ("CID - *collision-induced dissociation*") se emplea a menudo para generar los iones hijos para detección posterior. En la CID, los iones progenitores ganan energía a través de colisiones con un gas inerte, tal como argón y posteriormente se fragmentan por un proceso denominado "descomposición unimolecular." Suficiente energía tiene que depositarse en el ión progenitor, de manera que ciertos enlaces dentro del ión puedan romperse debido a una energía vibratoria aumentada.

[0074] En MS/MS, los iones progenitores se seleccionan en el primer análisis MS. Estos iones progenitores seleccionados se pasan entonces a la celda de colisión para generar los iones progenitores específicos del péptido para identificación y cuantificación. Bajo un conjunto dado de condiciones de ionización/fragmentación, se producen iones hijos y progenitores en una forma reproducible dándole a la técnica MS/MS una capacidad analítica extremadamente poderosa.

[0075] El espectrómetro de masas proporciona normalmente al usuario un barrido de iones (*ion scan*); es decir, la abundancia relativa de cada m/z sobre un rango dado (v.g., 10 a 1200 amu). Los resultados de un análisis de analito, es decir, un espectro de masas, pueden relacionarse con la cantidad del analito en la muestra original por numerosos métodos conocidos en el arte. Por ejemplo, dado que los parámetros de muestreo y análisis están cuidadosamente controlados, la abundancia relativa de un ión dado puede compararse con una tabla que convierte esa abundancia relativa en una cantidad absoluta de la molécula original. Alternativamente, estándares moleculares (v.g., estándares internos y estándares externos) pueden correrse con las muestras y construirse una curva estándar basándose en iones generados de esos estándares. Utilizando tal curva de estándares, la abundancia relativa de un ión dado puede convertirse en una cantidad absoluta de la molécula original. Numerosos otros métodos para relacionar la presencia o cantidad de un ión con la presencia o cantidad de la molécula original son bien conocidos por las personas expertas en el arte.

[0076] La elección del método de ionización puede determinarse basándose en el analito que se va a medir, el tipo de muestra, el tipo de detector, la elección del modo positivo versus el modo negativo, etc. Los iones pueden producirse empleando una variedad de métodos incluyendo, pero no limitados a, ionización de electrones, ionización química, bombardeo rápido de átomos, desabsorción de campo, y desabsorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI), desabsorción-ionización por láser de superficie (SELDI - *surface enhanced laser desorption ionization*), desabsorción de ionización por electrospray (DESI - *desorption electrospray ionization*), ionización de fotones, ionización por electrospray, y plasma inductivamente acoplado. La ionización por electrospray se refiere a métodos en los cuales una solución se pasa a lo largo de una corta longitud de un tubo capilar, al extremo del cual se aplica un alto potencial eléctrico positivo o negativo. La solución que llega al extremo del tubo se vaporiza (nebuliza) en un chorro o rociado de gotitas muy pequeñas de solución en un vapor de disolvente. Esta niebla de gotitas fluye a través de una cámara de evaporación que se calienta para impedir la condensación y para evaporar el disolvente. A medida que las gotitas se vuelven más pequeñas, aumenta la densidad de carga superficial eléctrica hasta el momento en que la repulsión natural entre cargas similares hace que se liberen los iones así como las moléculas neutras.

[0077] El efluente de una LC puede inyectarse directa y automáticamente (*es decir*, "en línea") en el equipo electrospray. En algunas modalidades, las proteínas contenidas en un efluente LC se ionizan primeramente mediante electrospray en un ión progenitor. El primer cuadrupolar de la MSMS se ajusta (*is tuned*) para que sea un filtro de masas de los iones progenitores de las proteínas diana multiplexadas.

[0078] El(los) ión (iones) progenitor(es) que pasa(n) el primer cuadrupolar se ioniza(n) y/o fragmenta(n) entonces antes de pasar al segundo cuadrupolar. En algunas modalidades, los iones se hacen colisionar con una molécula de gas inerte en un proceso de disociación inducida por colisión (CID). Gases inertes apropiados incluyen, por ejemplo, argón, helio, nitrógeno, etc. Deseablemente, los iones progenitores de las proteínas diana multiplexadas se fragmentan en iones hijos que se detectan posteriormente.

VI. Mantener una Variedad de Planta Transgénica

[0079] Los métodos de la presente divulgación pueden usarse para mantener el genotipo de una variedad de planta transgénica. Muestras de proteína compleja preparadas de una próxima generación de una planta transgénica pueden someterse a análisis múltiplex MSMS para determinar la presencia o ausencia de una proteína de interés. Las muestras de proteína compleja pueden contener proteínas transgénicas expresadas en la planta transgénica. Propagando aquellas plantas donde se confirma la presencia de una proteína transgénica de interés, se garantiza la expresión de la proteína transgénica de interés en generaciones sucesivas. En forma semejante, pueden no propagarse aquellas plantas de una próxima generación en las que no puede confirmarse la presencia de una proteína transgénica de interés.

VII. Resultados de Detección Selectiva de un Procedimiento de Transformación de Plantas

[0080] Los métodos de la presente divulgación pueden utilizarse asimismo para tamizar rápidamente los resultados de un procedimiento de transformación de plantas en una manera altamente productiva. Debido a la variabilidad en el genotipo y las características de expresión en plantas transgénicas (*GE plants*) y células de plantas producidas mediante recombinación de ADN, las plantas y células de plantas producidas por un procedimiento de transformación de plantas no incluirán necesariamente los mismos perfiles o perfiles similares de expresión de proteínas transgénicas introducidas, por ejemplo, proteínas heterólogas. Por lo demás, proteínas endógenas pueden exhibir perfiles de expresión alterados diferencialmente. En algunas modalidades de la presente divulgación, muestras de proteína compleja se preparan de plantas, tejidos de plantas, o células de plantas producidas por un procedimiento de transformación de plantas. Las muestras preparadas de proteína compleja pueden someterse entonces a un análisis MS/MS múltiplex. Los espectros MS de las diferentes muestras se analizan entonces para identificar aquellas muestras que exhiben características deseables de expresión. La planta fuente, tejido de planta, o células de planta de las muestras identificadas puede propagarse entonces para seleccionar las características de expresión deseables.

VIII. Obtener Bioconfinamiento de Transgenes

[0081] Los transgenes pueden escapar de una planta transgénica e integrarse en el genoma de plantas circundantes no transgénicas en el ambiente, por ejemplo, mediante polinización cruzada. En la mayoría de los casos, esto es indeseable. En algunas modalidades, métodos de la presente divulgación se utilizan para obtener el bioconfinamiento de transgenes en una planta transgénica. En estas y otras modalidades, muestras de proteína compleja pueden prepararse a partir de una planta(s), tejido(s) de una planta, o células de una planta que están en riesgo de contaminarse por material genético proveniente de una planta transgénica. Las muestras preparadas de proteína compleja pueden someterse entonces a análisis MS/MS múltiplex. Espectros MS de las diferentes muestras se analizan entonces para determinar aquellas muestras que contienen una proteína transgénica diana, por ejemplo, una proteína transgénica expresada en la planta transgénica. La presencia de la proteína diana en una muestra se correlaciona con el escape del transgén en la planta(s) fuente, tejido(s) de la planta, o células de la planta. Destruyendo, confinando, o limitando en otra forma el crecimiento de la planta(s) contaminada(s), tejido(s) de la planta, o células de la planta, puede conseguirse el bioconfinamiento.

[0082] Las modalidades son susceptibles de varias modificaciones y formas alternativas, además de los Ejemplos específicos descritos en detalle en esta especificación. Por consiguiente, las modalidades no se limitan a las formas particulares divulgadas. Más bien, el ámbito de la divulgación engloba todas las modificaciones, equivalentes y alternativas enumeradas en las reivindicaciones anexas.

EJEMPLOS

Ejemplo I

[0083] Seis proteínas transgénicas separadas (Cry1F, Cry34, Cry35, AAD-1, AAD-12 y PAT) se seleccionaron para desarrollo de un análisis LC\MS\MS múltiplex. Las proteínas individuales se detectaron e identificaron por espectrometría de masas en una sola inyección de una mezcla de proteína compleja.

[0084] La primera versión del análisis múltiplex se llevó a cabo digiriendo proteolíticamente las seis proteínas individualmente, y luego fortificando los péptidos de la proteína resultantes en extractos de tejidos de planta digeridos

proteolíticamente y utilizando LC\MS\MS para detección de iones de fragmento/precursor específico para cada una de las seis proteínas en una sola inyección. La metodología desarrollada durante esta primera versión múltiplex se aplicó entonces para la detección múltiplex de cuatro proteínas expresadas en material de propagación de maíz endógamo corriente.

Ejemplo II

Detección múltiplex LC\MS\MS en una planta.

[0085] Tabla 1 enumera concentraciones de cada proteína patrón individual (*individual stock protein*) recibida, y las diluciones resultantes de cada proteína luego de la digestión con tripsina. Antes de la digestión con la proteasa tripsina, todas las proteínas se separaron en gel con cambio de sales amortiguadoras (*were buffer exchanged*) en 25 mM de bicarbonato de amonio, pH 7.9 (SIGMA), para garantizar condiciones de digestión eficientes. Una alícuota de cada una de las proteínas patrón (véase Tabla 1) se transfirió a un tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL y se llevó a 100 µL usando 25 mM bicarbonato de amonio, pH 7.9. Se utilizaron columna Zeba Desalt Spin (Pierce # 89882) para el reemplazo de cada proteína según recomendaciones del fabricante. Se realizaron tres lavados (*spin washes*) de la columna Zeba, empleando cada lavado 300 µL de 25 mM bicarbonato de amonio, pH 7.9, y centrifugando a 1.500 g durante 1 minuto. La alícuota de 100 µL para cada proteína de muestra se aplicó entonces a la superficie de la resina de la columna Zeba y se centrifugó a 1.500 g durante 2 minutos. Este material separado en gel con cambio de sales amortiguadoras se utilizó entonces directamente para digestión de tripsina para la generación de fragmentos peptídicos de proteína. La digestión inicial con tripsina de las seis proteínas no incluyó un paso de protocolo para alquilar los residuos de aminoácido cisteína. Este paso de alquilación puede incorporarse más tarde, pero con análisis de alta productividad como meta, omitir el paso de alquilación podría ahorrar tiempo y esfuerzos significativos para el análisis final. Cada 100 µL de muestra de proteína separada en gel con cambio de sales amortiguadoras se llevó a 5 mM DTT con la adición de 1 µL de 0.5 M DTT, luego se desnaturalizó por calor a 95 °C durante 20 minutos y se enfrió a temperatura ambiente (25 °C). Tripsina modificada por secuenciamiento (*sequencing grade modified trypsin*) se re-suspendió en 25 mM bicarbonato de amonio, pH7.9, a una concentración de 0.4 µg/µL. La enzima tripsina se agregó a cada muestra de proteína para un rango final de relación enzima a sustrato de 1:20 a 1:50. La digestión con la tripsina se

llevó a cabo en un termociclador utilizando un perfil de temperatura de 37 °C durante 16 horas, luego se enfrió a 4 °C. Después de la digestión con tripsina, se agregaron 3 µL de ácido fórmico al 10% a cada digesto de proteína.

[0086] **Tabla 1:** Concentraciones de proteína y diluciones para cada digesto con tripsina de las 6 proteínas - LC\MS\MS Múltiplex.

			Digesto con tripsina	100ul volumen del digesto final	[Digesto con tripsina]
Nombre	[Patrón] ug/ml	Volumen patrón digerido (ml)	Cantidad proteína digerida (ug's)	Factor de dilución del digesto	[Proteína] del digesto (ug/ml)
Cry1F	160	0.01	1.6	1:10	16
Cry34	500	0.025	12.5	1:4	125
Cry35	187	0.045	8.415	1:2.2	85.0
AAD-1	4200	0.005	21	1:20	210
AAD-12	1000	0.02	20	1:5	200
PAT	300	0.033	9.9	1:3	100

[0087] Inicialmente, cada una de las seis muestras de proteína digeridas con tripsina se analizó individualmente *mediante* ESI-LC\MS\MS para determinar fragmentos peptídicos tripsínicos que proporcionarían la sensibilidad y especificidad de detección para identificación múltiple simultánea de todas las seis proteínas en un análisis único. El espectrómetro de masas utilizado para el desarrollo del método fue un Applied Biosystems MDS Sciex 4000 Q Trap hybrid triple quad, (Foster City, CA modelo # 1004229-V) que empleaba una carcasa fuente Turbo V ESI equipada con una sonda TSI. Las muestras se introdujeron en el espectrómetro de masas *mediante* un sistema HPLC Agilent 1100. Tabla 2 incluye información sobre el número de modelo específico y la versión Firmware para los diferentes componentes de instrumentación.

[0088] **Tabla 2:** Información sobre el Modelo/Versión de Firmware para los Componentes de Instrumentación.

Espectrómetro de Masas	4000 Q TRAP
Versión Firmware	M401402 B4T0301 M3L1412 B3T0300
Nombre Componente	Linear Ion Trap Quadrupole LC/MS/MS Mass
ID Componente	4000 Q TRAP
Fabricante	AB Sciex Instruments
Modelo	1004229-V
 inyector Automático	
(AutoSampler)	Agilent 1100 G1367A
Versión Firmware	A.05.04
Bomba Conectada	G1312A
Horno Columna	Agilent 1100 G1316A
Versión Firmware	A.05.05
Válvula Conmutación	Instalada
Bomba	Agilent 1100 G1312A
Versión Firmware	A.05.04

[0089] Se llevó a cabo cromatografía de fase inversa utilizando un sistema HPLC Agilent 1100 equipado con una columna Phenomenex Jupiter Proteo 50 X 2.0 mm 4 μ M con una condición de carga de 95% A (H_2O / 0.1% ácido fórmico) / 5% B (acetonitrilo / 0.1% ácido fórmico) durante 1 minuto, y con un gradiente a 90% B en 20 minutos. La columna se regeneró con una retención de 2 minutos a 90% B, y luego se re-equilibró a 5% B durante 5 minutos. Para el tamizaje inicial de péptidos de la proteína individual, se cargaron aproximadamente 10-50 fmol de cada proteína en la columna para análisis.

[0090] Un método de adquisición IDA que incorporaba dos barridos EPI a realizarse en los dos iones más abundantes detectados de un listado de transiciones MRM, específicas para cada proteína, se llevó a cabo en cada una de las seis proteínas a multiplexarse. Estos datos de fragmentación fueron informativos en seleccionar los iones del fragmento que demostraron la máxima abundancia de cada péptido detectado. Generalmente, los tres iones principales de fragmento de un péptido precursor detectado se seleccionaron para desarrollo posterior del método. Para esta adquisición IDA, la Sciex 4000 Q TRAP incorporó las siguientes condiciones: voltaje IS 5500, DP 75, EP 10, CXP 12, CUR 10, CAD HIGH, TEM 450, GS1 35, GS2 35, unidad RES Q1, y unidad RES Q3. Los valores

CE para cada péptido se analizaron empíricamente con un valor óptimo usado para cada péptido. Empleando los datos de fragmentación de péptidos acumulados del análisis IDA individual en cada una de las seis proteínas, se condujo entonces un análisis MRM en cada proteína individual para identificar los iones precursores de cada proteína con excelentes eficiencias de ionización. Para cada proteína múltiplex se utilizó un listado MRM de todos los péptidos tripsínicos para crear un método de análisis MRM individual. Usando los datos del análisis MRM de proteína individual como una medida de la eficiencia de ionización, se seleccionaron péptidos para cada proteína para que sirvieran como iones precursores en un formato múltiplex. Los péptidos multiplex se relacionan en Tabla 3.

[0091] Tabla 3: Péptidos seleccionados para el método LC\MS\MS múltiplex – 6 inicial.

Proteína / Péptidos Multiplexados	
AAD-1 (R)-2,4-diclorofenoxipropionato dioxigenasa)	
T6	FGPVDPVPLLK
T7	SIEGYPEVQMIR
T12	VFGSLYQAQNR

AAD-12 ((S)-2,4-diclorofenoxipionato/alfa-ketoglutarato dioxigenasa)

T4 IGGGDIVAISNVK
 T9 AAYDALDEATR
 T19 AEPWDFK

Cry1F (Proteína de cristal plaguicida cry1Fa (delta-endotoxina insecticida Cry1F(a)))

T22 TYPIQTSSQLTR
 T46 IFAGQFNK

Cry34 (Proteína de cristal ET79 [*Bacillus thuringiensis*])

T7 TSPTNVANDQIK

Cry35 (tipo Cry35Ab [*Bacillus thuringiensis*])

T9 VLTAGTGQALGLIR
 T17 YQYWQR

PAT (Fosfinotricina N-acetiltransferasa (PPT N-acetiltransferasa))

T2 TEPQTPQEWIDDLER
 T8 LGLGSTLYTHLLK
 T10 SVVAVIGLPNDPSVR

Ejemplo III

[0092] Se creó entonces un análisis MRM orientado múltiplex LC\MS\MS único para todas las seis proteínas DAS, empleando los datos de iones de fragmento/precursor generados del análisis de proteínas individuales. Estos péptidos se detectaron primeramente mediante LC\MS\MS múltiplex fortificando amortiguador de bicarbonato de amonio (25 mM, pH7.9) con material digerido con tripsina de cada una de las seis proteínas. Aproximadamente 5-20 fmol de cada proteína se inyectó en la columna para análisis múltiplex – 6 inicial del amortiguador fortificado.

[0093] FIGs. 1-6 muestran cromatogramas de iones extraídos para cada una de las seis proteínas detectadas en una sola inyección. Específicamente, FIG. 1 muestra la detección múltiplex LC\MS\MS de AAD-1. Los datos son un cromatograma de iones LC\MS\MS extraídos para AAD-1 ((R)-2,4-

diclorofenoxipropionato dioxigenasa), detectada en una sola inyección con AAD-12, Cry1F, Cry34, Cry35, y PAT en extracto de semilla de maíz.

[0094] FIG. 2 muestra detección múltiplex LC\MS\MS de AAD-12. Los datos son un cromatograma de iones LC\MS\MS extraídos para AAD-12 ((S)-2,4-diclorofenoxipropionato/alfa-ketoglutarato dioxigenasa), detectada en una sola inyección con AAD-1, Cry1F, Cry34, Cry35, y PAT en extracto de semilla de maíz.

[0095] FIG. 3 muestra detección múltiplex LC\MS\MS de Cry1F. Los datos son un cromatograma de iones LC\MS\MS extraídos para Cry1F (proteína de cristal plaguicida cry1Fa (delta-endotoxina insecticida Cry1F(a))), detectada en una sola inyección con AAD-1, AAD-12, Cry34, Cry35, y PAT en extracto de semilla de maíz.

[0096] FIG. 4 muestra detección múltiplex LC\MS\MS de Cry34. Los datos son un cromatograma de iones LC\MS\MS extraídos para Cry34 (proteína de cristal ET79 [*Bacillus thuringiensis*]), detectada en una sola inyección con AAD-1, AAD-12, Cry1F, Cry35, y PAT en extracto de semilla de maíz.

[0097] FIG. 5 muestra detección múltiplex LC\MS\MS de Cry35. Los datos son un cromatograma de iones LC\MS\MS extraídos para Cry35 (tipo Cry35Ab [*Bacillus thuringiensis*]), detectada en una sola inyección con AAD-1, AAD-12, Cry1F, Cry34, y PAT en extracto de semilla de maíz.

[0098] FIG. 6 muestra detección múltiplex LC\MS\MS de PAT. Los datos son un cromatograma de iones LC\MS\MS extraídos para Cry35 (fosfinotricina N-acetiltransferasa (PPT N-acetiltransferasa)), detectada en una sola inyección con AAD-1, AAD-12, Cry1F, Cry34, y Cry35 en extracto de semilla de maíz.

[0099] Luego de confirmar la detección múltiplex LC\MS\MS de todas las seis proteínas, la mezcla de péptido y bicarbonato de amonio se diluyó en un extracto digerido con proteasa de tejido de semilla de maíz para detección en la matriz de la semilla. El tejido de la semilla usado provenía del material endógamo corriente. La muestra fortificada se diluyó 1:10 en bicarbonato de amonio y luego 1:2 en extracto de semilla de maíz con aproximadamente 0.2 a 1 fmol de cada proteína que se estaba inyectando en la columna y se detectó empleando el método múltiplex LC\MS\MS.

Ejemplo IV

[00100] Cuatro proteínas transgénicas separadas (Cry1, Cry34, Cry35 y PAT) se detectaron e identificaron mediante espectroscopia de masas en una sola inyección de una muestra de proteína compleja de materiales de una planta endógama (5XH751XT). Se detectó la proteína tanto en el tejido de las hojas como de la semilla.

[00101] La metodología múltiplex - 6 enumerada anteriormente se utilizó para detectar la presencia de cuatro proteínas transgénicas separadas (Cry1F, Cry34, Cry35, y PAT) en una sola inyección de una muestra de proteína compleja de material de una planta de línea congénita (5XH751XT). En esta labor, se desarrolló un método múltiplex - 4 de una sola inyección para cuantificar la presencia de las cuatro proteínas en tejido de semilla de maíz y de hoja de maíz. Los controles experimentales implicaron la comparación con extracto 5XH751 nulo enriquecido (*null 5XH751 extract spiked*) con proteínas transgénicas enteras antes de la digestión, y comparación con el extracto 5XH751 nulo digerido.

[00102] Para este experimento, se otorgó también consideración a la metodología de extracción requerida para un desempeño analítico robusto del método múltiplex. Puesto que la detección múltiplex consiste en medir simultáneamente múltiples proteínas de cada muestra individual, el método de extracción de proteínas utilizado necesita ser eficiente para todas las proteínas, si se desea una medición precisa. Como se muestra en FIG. 11, las condiciones de extracción se analizaron en tejido de semillas y de hojas de maíz. Se examinaron tres condiciones de extracción separadas, en un intento por comenzar a entender cómo estas cuatro diferentes proteínas se comportarían en lo que respecta a hallar un método de extracción único para acomodar factores tales como estabilidad, solubilidad e hidrofobicidad de las proteínas.

[00103] El atractivo de una extracción de proteína en bicarbonato de amonio es la capacidad de ir directamente del paso de extracción a la digestión con proteasa sin preocuparse por la supresión de la señal debida a un componente amortiguador durante el análisis MS. Esto podría reducir el costo, pero, aún más importante, disminuir el tiempo de preparación y la posible variabilidad incurrida durante el reemplazo de sales amortiguadoras (*buffer*

exchange). El amortiguador de urea 8M se examinó para determinar si se requería un método de solubilización enojoso para detectar todas las cuatro proteínas en tejidos de planta. Se utilizó el PBS-T como es convencional a los métodos de detección ELISA.

[00104] Tejido de hojas 5XH751XT: Se recogió tejido de hojas de una planta de invernadero V6-V7 y se trituró bajo nitrógeno líquido. El peso de prueba de cada muestra de hojas era 1.5 g. Cada amortiguador de extracción (FIG. 11) se examinó con una relación 2:1 amortiguador / muestra (3 mL). Las muestras se sometieron a flujo turbulento (*were vortexed*) durante 2 minutos, luego se centrifugaron durante 2 minutos, y se recogieron los sobrenadantes.

[00105] Tejido de semillas 5XH751XT: Se obtuvo tejido de semillas maduras y se pulverizó en un triturador de bolas. El peso de prueba de cada muestra de hojas era 1.5 g. Cada amortiguador de extracción (FIG. 11) se examinó con una relación 2:1 amortiguador / muestra (3 mL). Las muestras se sometieron a flujo turbulento (*were vortexed*) durante 2 minutos, luego se centrifugaron durante 2 minutos, y se recogieron los sobrenadantes.

[00106] Las muestras extraídas en 8M urea o PBS-T se separaron en gel con intercambio de sales amortiguadoras en 25 mM bicarbonato de amonio utilizando filtros de centrifugación Pierce Zeba. Para todas las muestras, 50 µL de extracto de tejido se digirieron con 10 µg de tripsina (extracción) en 110 µL de volumen total de bicarbonato de amonio. La digestión de las proteínas se realizó a 37°C durante 16 horas, luego se enfrió a 4°C. Para hacer las veces de control positivo para cada una de las cuatro proteínas a detectarse multiplexadamente, se elaboró un cóctel que contenía aproximadamente 50 µg/mL de cada proteína entera individual, utilizando estándares de proteína purificada. Se hizo una dilución final 1:10 del cóctel en una muestra de extracto de hoja nulo y una muestra de extracto de semilla nulo para una concentración de control positivo de la matriz de aproximadamente 5 µg/mL. Estos nulos fortificados (*fortified nulls*) sirvieron como controles positivos produciendo tiempos exactos de retención LC de péptidos y datos de fragmentación de secuencia MS/MS, comparados con controles de tejido nulos (control negativo) y las extracciones de tejido de maíz 5XH751XT. Puesto que todas las cuatro proteínas a detectarse multiplexadamente en 5XH751XT eran proteínas utilizadas asimismo para desarrollar el método LC/MS/MS múltiplex – 6 ya mencionado, no se requirió desarrollo adicional para determinar qué péptidos

específicos de las proteínas / iones de fragmento detectar y bajo cuáles condiciones de instrumentación.

[00107] El método múltiplex-6 descrito anteriormente se empleó para analizar los extractos de tejido de hojas y semillas 5XH751XT. FIGs 7-10 son un subconjunto de los datos adquiridos utilizando análisis de inyección única LC/MS/MS múltiplex - 4 para detectar proteínas Cry1F, Cry34, Cry35 y PAT expresadas en tejido de hojas y semillas de maíz endógamo.

[00108] Específicamente, FIG. 7 muestra detección múltiplex LC-MS/MS de Cry1F, expresada en tejido de maíz endógamo. Los datos son espectros MS/MS específicos para Cry1F múltiplex identificada en tejido de hoja de maíz 5XH751 extraído con 25mM de bicarbonato de amonio. Se detectaron tres iones de fragmento T22 específicos de Cry1F, mostrándose aquí tan sólo un fragmento. Se muestran asimismo controles positivos y negativos para la transición MS/MS.

[00109] FIG. 8 muestra la detección múltiplex LC-MS/MS de Cry34, expresada en tejido de maíz endógamo. Los datos son espectros MS/MS específicos para Cry34, identificados multiplexadamente en tejido de hoja de maíz 5XH751 extraído con 25mM bicarbonato de amonio. Se muestran igualmente controles positivos y negativos para la transición MS/MS. Se detectaron cinco iones de fragmento específicos de T7 Cry34, mostrándose aquí tan sólo uno. La ligera variación en el tiempo de retención entre la muestra 5XH751XT y el control positivo fortificado con Cry34 no es inesperada para una proteína que se eluye en la región temprana, más hidrófila, del gradiente de fase inversa. El pico mostrado en el panel de control de hoja nulo es un pico no específico, como se determinó por la gran variación (~7 min.) en tiempo de retención de la columna. Ninguno de los otros cuatro iones de fragmento de Cry34 tuvo picos no específicos.

[00110] FIG. 9 muestra detección múltiplex LC-MS/MS de Cry35, expresada en tejido de maíz endógamo. Los datos son espectros MS/MS específicos para Cry35, identificada multiplexadamente (*multiplex identified*) en tejido de hoja de maíz. Se muestran también controles positivos y negativos para la transición MS/MS. Los datos mostrados son de tejido de hoja 5XH751 extraído con 25 mM de bicarbonato de amonio. Se detectaron tres iones de fragmento específicos de Cry35 T9, mostrándose tan sólo uno aquí.

[00111] FIG. 10 muestra detección múltiplex LC/MS/MS de PAT, expresada en tejido de maíz endógamo. Los datos son espectros MS/MS específicos para PAT, identificada multiplexadamente en tejido de hoja de maíz. Se muestran asimismo controles positivos y negativos para la transición MS/MS.

[00112] Para cada proteína, se detectó y fragmentó un péptido precursor específico, con tres a cinco iones de fragmento correspondientes para garantizar la confirmación de la secuencia de proteína. Figuras 7, 8, 9 y 10 demuestran cada una espectros MS/MS específicos para una de las cuatro proteínas identificadas multiplexadamente en tejido de maíz. Cada figura demuestra asimismo el control apropiado positivo y negativo para la transición MS/MS particular. Dos de las cuatro proteínas se detectaron en el tejido de semillas. La incapacidad de detectar dos de las cuatro proteínas se debió probablemente a una expresión baja, ya que los datos históricos demuestran una baja expresión de estas cuatro proteínas en semillas, comparada con tejido de hojas.

Ejemplo V

[00113] Una variedad de planta transgénica se mantiene confirmando la presencia de dos proteínas de interés en una próxima generación de la variedad de la planta. Se selecciona una planta transgénica donde la planta transgénica incluye dos proteínas transgénicas de interés (A y B). Se preparan muestras de proteínas A y B, y se someten a análisis LC/MS/MS. De los espectros MS resultantes, se seleccionan iones de péptidos de fragmento de las proteínas progenitoras para análisis MS/MS dirigido.

[00114] Se prepara una muestra de proteína compleja de una primera generación de la planta transgénica, y la muestra de proteína compleja se somete a análisis LC/MS/MS múltiplex, donde los iones seleccionados del péptido de fragmento de las proteínas A y B se identifican determinando la presencia de los iones seleccionados del péptido de fragmento en los espectros MS. Muestras de proteína compleja se preparan entonces de plantas de una próxima generación de la planta transgénica. Las muestras de proteína compleja de estas plantas de próxima generación se someten a análisis LC/MS/MS múltiplex. Aquellas plantas de próxima generación, cuyas muestras preparadas de proteína compleja produjeron espectros MS donde se identificó la presencia de las dos proteínas A y B a partir de la presencia de los iones seleccionados del péptido de fragmento, se

propagan para mantener la variedad de planta transgénica. Aquellas plantas de próxima generación, cuyas muestras preparadas de proteína compleja produjeron espectros MS donde no se identificó la presencia de las dos proteínas A y B, no se propagan para mantener la variedad de planta transgénica.

Ejemplo VI

[00115] Transformantes resultantes de un procedimiento de transformación de una planta se detectan selectivamente (*are screened*) para determinar la presencia de dos proteínas diana de interés. Dos proteínas diana (A y B) se someten a análisis LC/MS/MS. De los espectros MS resultantes, iones de péptidos de fragmento de las proteínas diana se seleccionan para análisis MS/MS dirigido.

[00116] Se obtienen transformantes putativos mediante un procedimiento de transformación de plantas. Se preparan muestras de proteína compleja de cada uno de los transformantes putativos. Las muestras de proteína compleja de estos transformantes putativos se someten a un análisis LC/MS/MS múltiplex, donde la expresión de las proteínas diana se determina verificando la presencia de los iones de péptidos de fragmento seleccionados. Se propagan aquellos transformantes, cuyas muestras preparadas de proteína compleja produjeron espectros MS, donde características de expresión deseables de proteínas A y B se determinaron a partir de la presencia de los iones de péptidos de fragmento seleccionados.

Ejemplo VII

[00117] Se obtiene el bioconfinamiento de transgenes en una planta transgénica. Dos proteínas diana (A y B), expresadas por una planta transgénica, se someten a análisis LC/MS/MS. De los espectros MS resultantes, iones de péptidos fragmentados de las proteínas progenitoras diana se seleccionan para análisis MS/MS dirigido.

[00118] Se recolecta material vegetal de plantas que crecen en el ambiente que circunda la planta transgénica. Se preparan muestras de proteína compleja de este material de la planta. Las muestras de proteína compleja de estos materiales de la planta se someten a análisis LC/MS/MS múltiplex, donde la presencia de un transgén contaminante se determina verificando la presencia de los iones de

péptidos de fragmento seleccionados de la proteína. Se destruyen las plantas de las cuales se recolectó material y cuyo análisis LC/MS/MS múltiplex demostró que contenían la proteína transgénica contaminante.

[00119] Las siguientes referencias se incorporan todas por el presente por referencia en su totalidad:

Alwine *et al.* (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 74:5350-54; Baldwin (2004) *Mol. Cell. Proteomics* 3(1):1-9; Carr and Annan (1997) Overview of peptide and protein analysis by mass spectrometry. In: Current Protocols in Molecular Biology, edited by Ausubel, *et al.* New York: Wiley, p. 10.21.1-10.21.27; Chang *et al.* (2000) *Plant Physiol.* 122(2):295-317; Domon and Aebersold (2006) *Science* 312(5771):212-17; Nain *et al.* (2005) *Plant Mol. Biol. Rep.* 23:59-65; Patterson (1998) Protein identification and characterization by mass spectrometry. In: Current Protocols in Molecular Biology, edited by Ausubel, *et al.* New York: Wiley, p. 10.22.1-10.22.24; Paterson and Aebersold (1995) *Electrophoresis* 16: 1791-1814; Rajagopal and Ahern (2001) *Science* 294(5551):2571-73; Sesikeran and Vasanthi (2008) *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 17 Suppl. 1:241-44; and Toplak *et al.* (2004) *Plant Mol. Biol. Rep.* 22:237-50.

REIVINDICACIONES

Lo que se reivindica es:

1. Un método de alta productividad para detectar la presencia de dos o más proteínas de interés con secuencias de aminoácidos conocidas en una muestra basada en una planta, método que incluye:

(i) proveer péptidos obtenidos digiriendo las proteínas de la muestra basada en una planta;

(ii) separar los péptidos;

(iii) ionizar los péptidos; y

(iv) obtener datos simultáneos de espectrometría de masas para los péptidos y determinar la presencia o ausencia de las dos o más proteínas de interés.

2. El método de la reivindicación 1, en donde los péptidos separados en paso (ii) se separan por cromatografía de columna.

3. El método de la reivindicación 1, en donde la cromatografía de columna es una cromatografía de columna líquida.

4. El método de la reivindicación 1, en donde las proteínas digeridas en paso (i) se digieren en un paso único antes de la inyección.

5. El método de la reivindicación 1, en donde los péptidos separados en el paso (ii) se separan en un paso único.

6. El método de la reivindicación 1, en donde los péptidos ionizados en el paso (iii) se ionizan en un paso único.

7. El método de la reivindicación 1, en donde los datos simultáneos de la relación masa-a-carga para los péptidos correspondientes a las dos o más proteínas de interés se obtienen en un paso único.

8. El método de la reivindicación 1, en donde las dos o más proteínas de

interés son dos proteínas de interés.

9. El método de la reivindicación 1, en donde las dos o más proteínas de interés son cuatro proteínas de interés.

10. El método de la reivindicación 1, en donde la muestra basada en una planta es de una planta transgénica.

11. El método de la reivindicación 1, en donde la muestra basada en una planta es de una planta transgénica, y las dos o más proteínas de interés son productos esperados de expresión transgénica en la planta transgénica.

12. Un método de alta productividad para detectar la presencia de dos o más proteínas de interés con secuencias de aminoácidos conocidas en una muestra basada en una planta, método que incluye:

(i) proveer datos de espectros para dos o más proteínas de interés;

(ii) proveer una primera inyección de una muestra compleja basada en una planta que contiene proteínas;

(iii) digerir las proteínas de una muestra compleja basada en una planta en péptidos;

(iv) separar los péptidos;

(v) ionizar los péptidos;

(vi) obtener datos simultáneos de espectrometría de masas para los péptidos; y

(vii) comparar los datos simultáneos de espectrometría de masas con los datos de espectros de masas provistos para las dos o más proteínas de interés, determinando en esa forma la presencia o ausencia de las dos o más proteínas de interés.

13. El método de la reivindicación 12, donde las proteínas digeridas en paso (iii) se digieren en un paso único.

14. El método de la reivindicación 12, donde los péptidos separados en paso (iv) se separan en un paso único.

15. El método de la reivindicación 12, donde los péptidos ionizados en paso (v) se ionizan en un paso único.

16. El método de la reivindicación 12, donde la muestra basada en una planta es de una planta transgénica.

17. Un método para mantener el genotipo de una variedad de planta transgénica, método que incluye:

(i) proveer datos de espectros de masas para uno o más producto(s) esperado(s) de expresión transgénica en la variedad de planta transgénica;

(ii) proveer una primera inyección de una muestra compleja que contiene proteínas de una primera generación de la variedad de planta transgénica;

(iii) digerir la muestra compleja de proteínas basada en una planta en péptidos;

(iv) separar los péptidos;

(v) ionizar los péptidos;

(vi) obtener datos simultáneos de espectrometría de masas para los péptidos y comparar los datos simultáneos de espectrometría de masas con los datos de espectros de masas provistos para los productos esperados de expresión transgénica, determinando en esa forma la presencia o ausencia de los productos esperados de expresión transgénica en la primera generación de la variedad de planta transgénica;

(vii) proveer una primera inyección de una muestra compleja que contiene proteínas de una segunda generación de la variedad de planta transgénica;

(viii) repetir los pasos (iii)-(vi) con la muestra compleja que contiene proteínas de la segunda generación de la variedad de planta transgénica; y

(ix) no propagar la segunda generación de la variedad de planta transgénica si la presencia del producto(s) esperado(s) de expresión transgénica no puede confirmarse en los datos de espectros de masas para los péptidos de la muestra de proteína compleja de la segunda generación de la variedad de planta transgénica, manteniendo en esa forma el genotipo de la variedad de planta transgénica.

18. El método de la reivindicación 17, donde las proteínas digeridas en el paso (iii) se digieren en un paso único.

19. El método de la reivindicación 17, donde los péptidos separados en el paso (iv) se separan en un paso único.

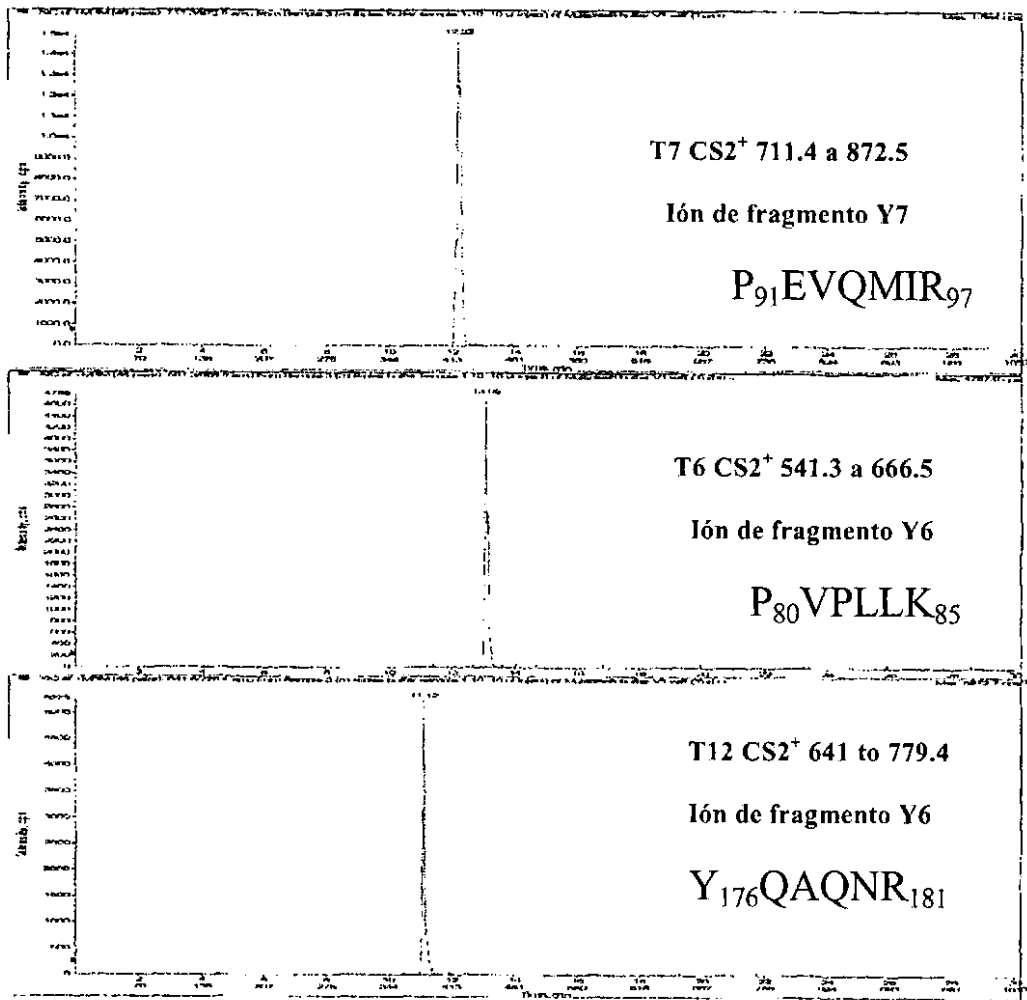
20. El método de la reivindicación 17, donde los péptidos ionizados en el paso (v) se ionizan en un paso único.

RESUMEN

La invención se refiere a métodos para análisis múltiplex de muestras de proteína compleja de plantas utilizando espectrometría de masa. En algunas incorporaciones, la divulgación concierne a métodos para mantener una variedad de planta transgénica, por ejemplo, analizando generaciones de una variedad de planta transgénica con respecto a la presencia y concentración de proteínas transgenica multiplexadas.

FIG. 1

Detección de PAT en 5XH751XT endógamo



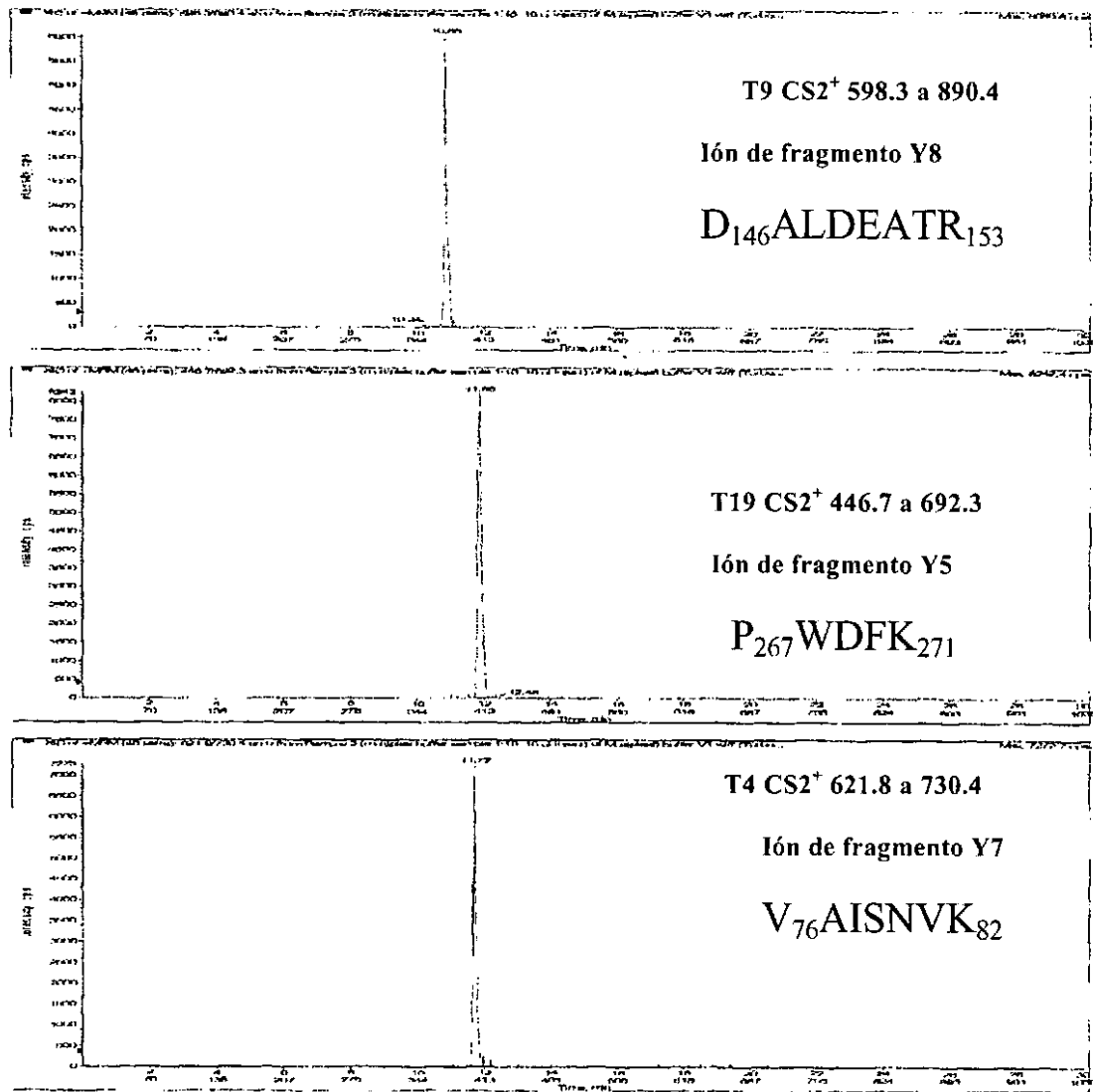
Proteína / Péptidos Multiplexados

AAD-1 (YR)-2,4-diclorofenoxipropionato dioxigenasa)

- T6 FGPVDPVPLLK
- T7 SIEGYPEVQMIR
- T12 VFGLSYQAQNR

FIG. 2

Detección de péptidos multiplexados de la proteína AAD-12 / iones de fragmento

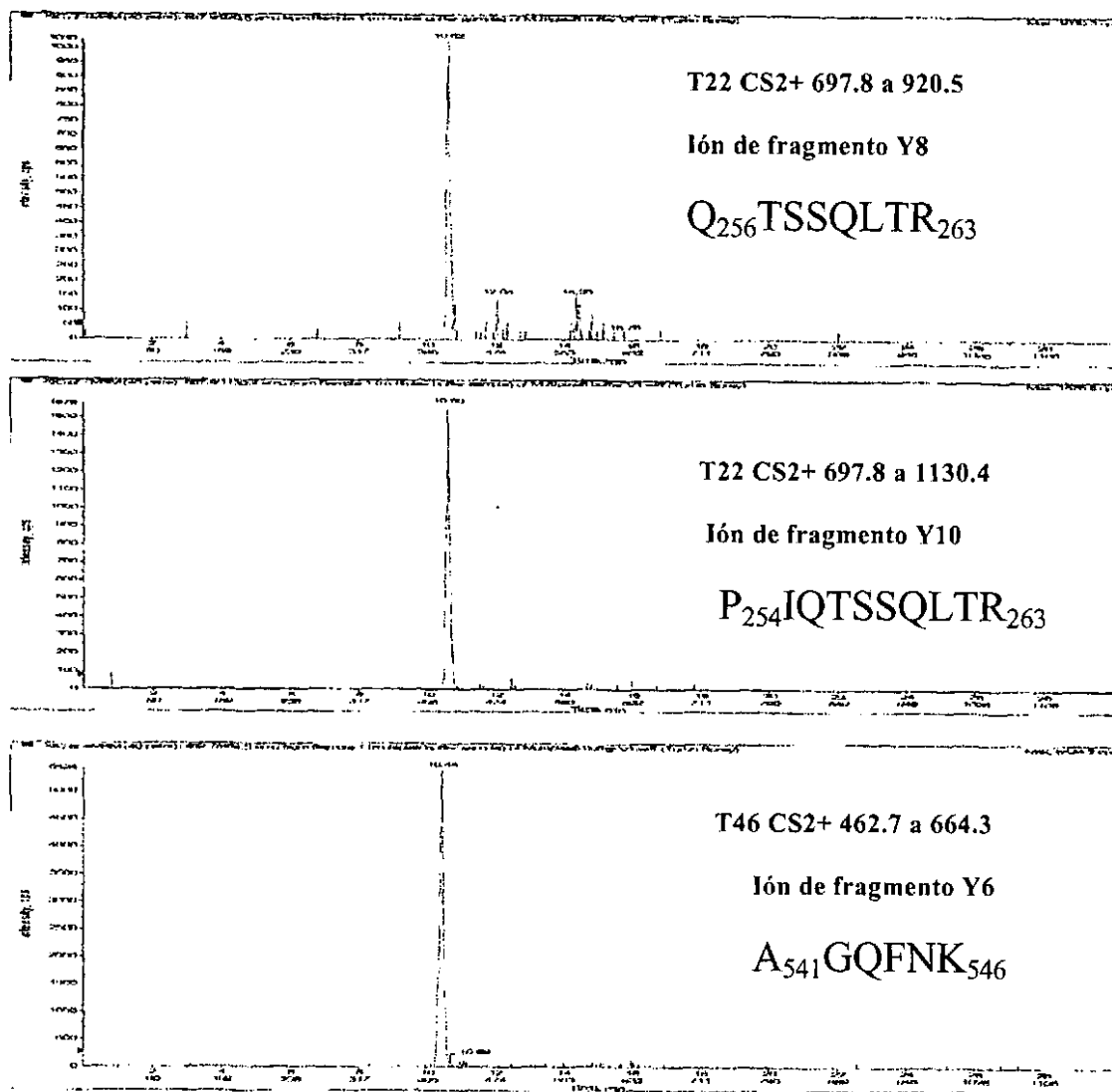


AAD-12 (S-2,4-diclorofenoxipropionato/alfa-ketoglutarato dioxigenasa)

- T4 IGGGDIVAISNVK
- T9 AAYDALDEATR
- T19 AEPWDFK

FIG. 3

Detección de péptidos multiplexados de la proteína Cry1F / iones de fragmento



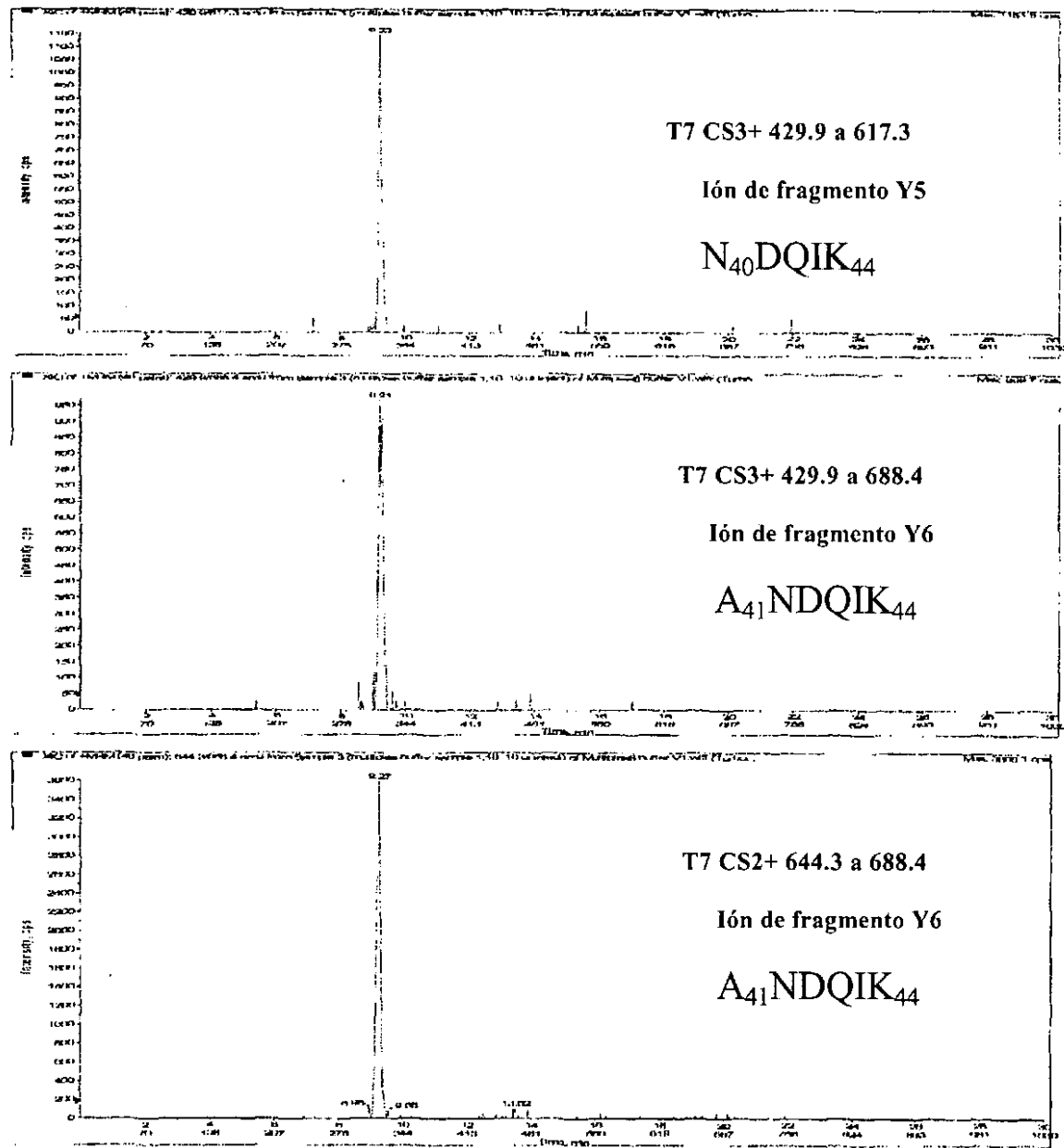
Cry1F (Proteína de cristal plaguicida Cry1Fa (delta-endotoxina insecticida Cry1F(a)))

T22 TYPIQTSSQLTR

T46 IFAGQFNK

FIG. 4

Detección de péptidos multiplexados de proteína Cry34 y iones de fragmento

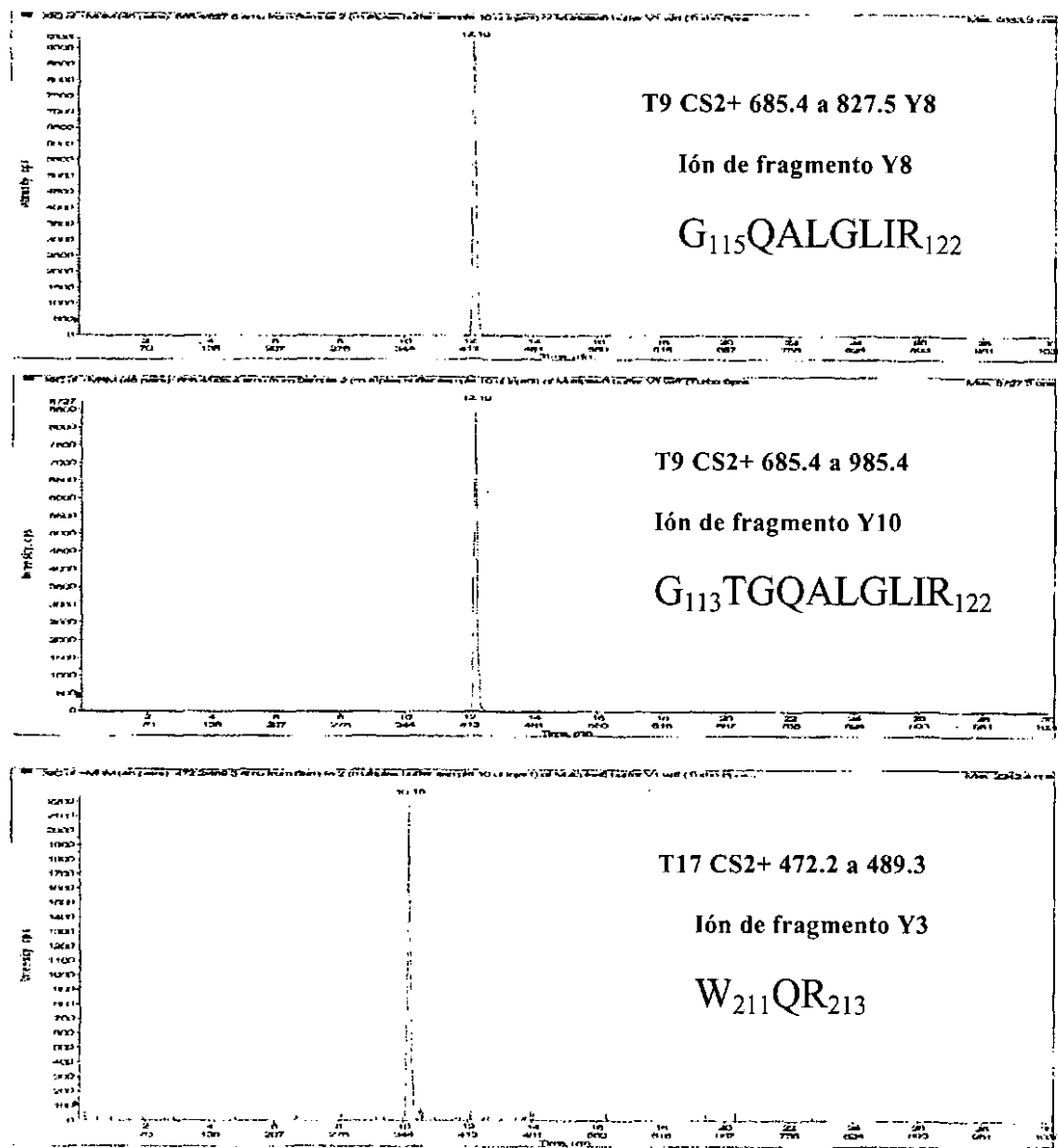


Cry34 (Proteína de cristal ET79 [*Bacillus thuringiensis*])

T7 TSPTNVANDQIK

FIG. 5

Detección de péptidos multiplexados de la proteína Cry35 / iones de fragmento



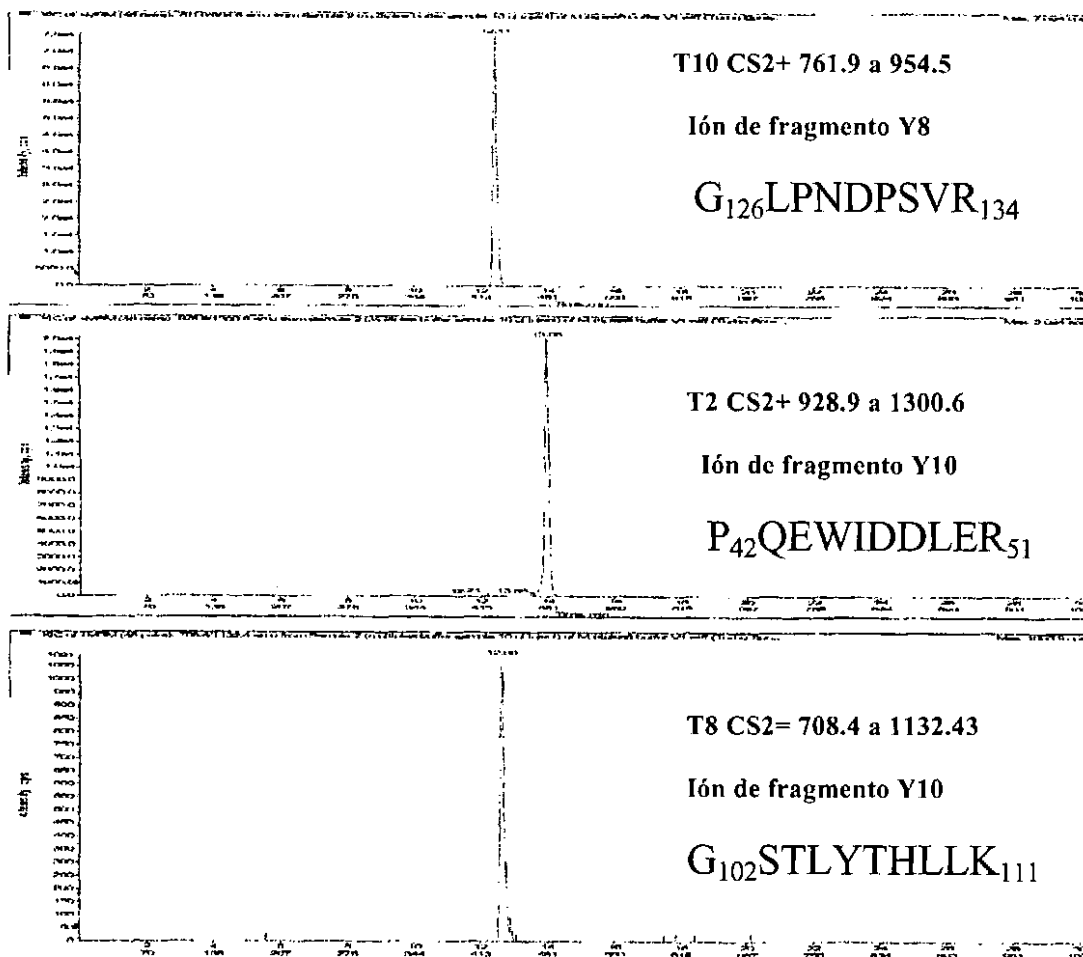
Cry35 (tipo Cry35Ab [*Bacillus thuringiensis*])

T9 VLTAGTGQALGLIR

T17 YQYWQR

FIG. 6

Detección de péptidos multiplexados de la proteína PAT / iones de fragmento



PAT (Fosfinotricina N-acetiltransferasa (PPT N-acetiltransferasa))

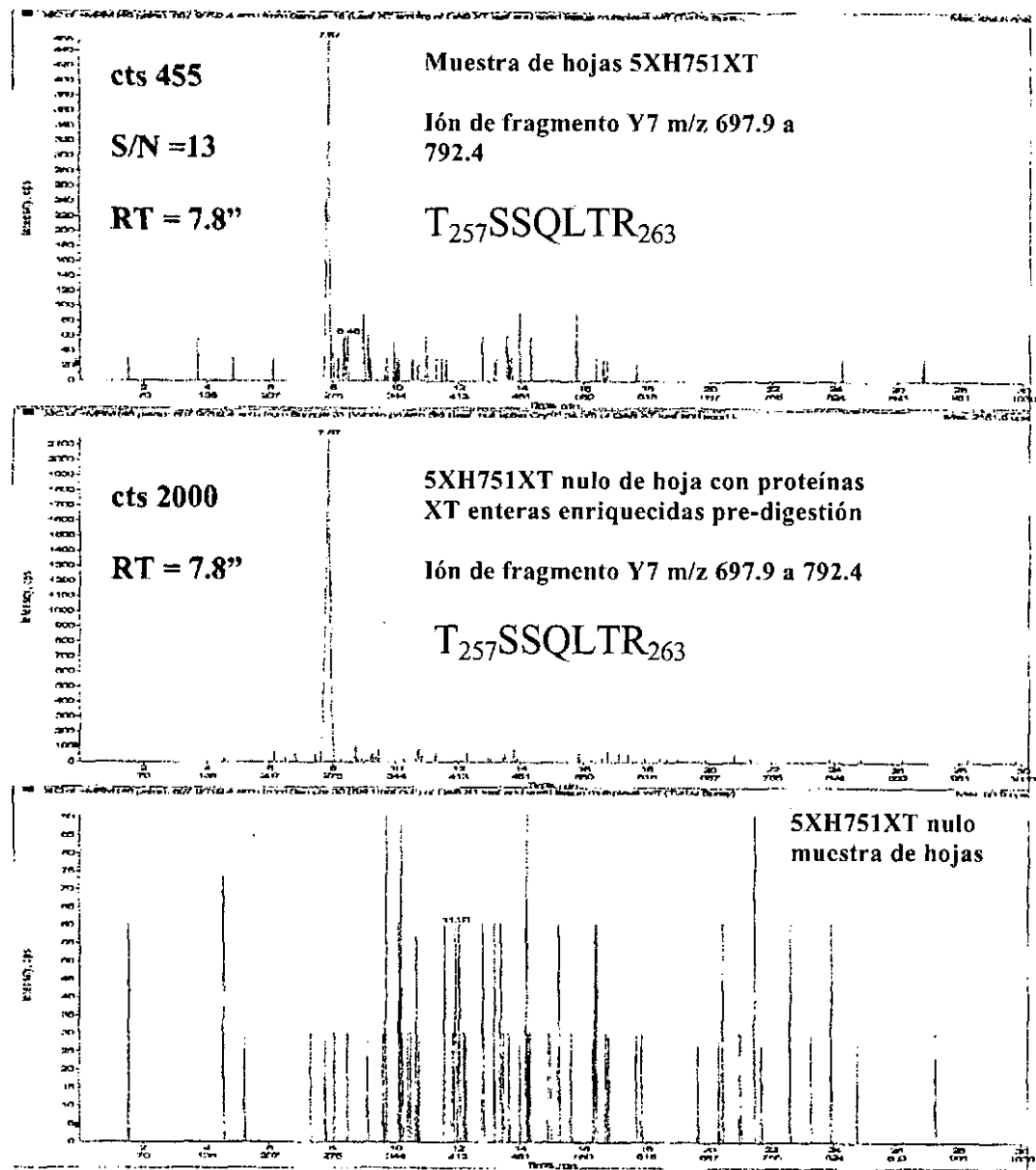
T2 TEPQTPQEWIDDLER

T8 LGLGSTLYTHLLK

T10 SVVAVIGLPNDPSVR

FIG. 7

Detección de Cry1F en 5XH751XT endógamo

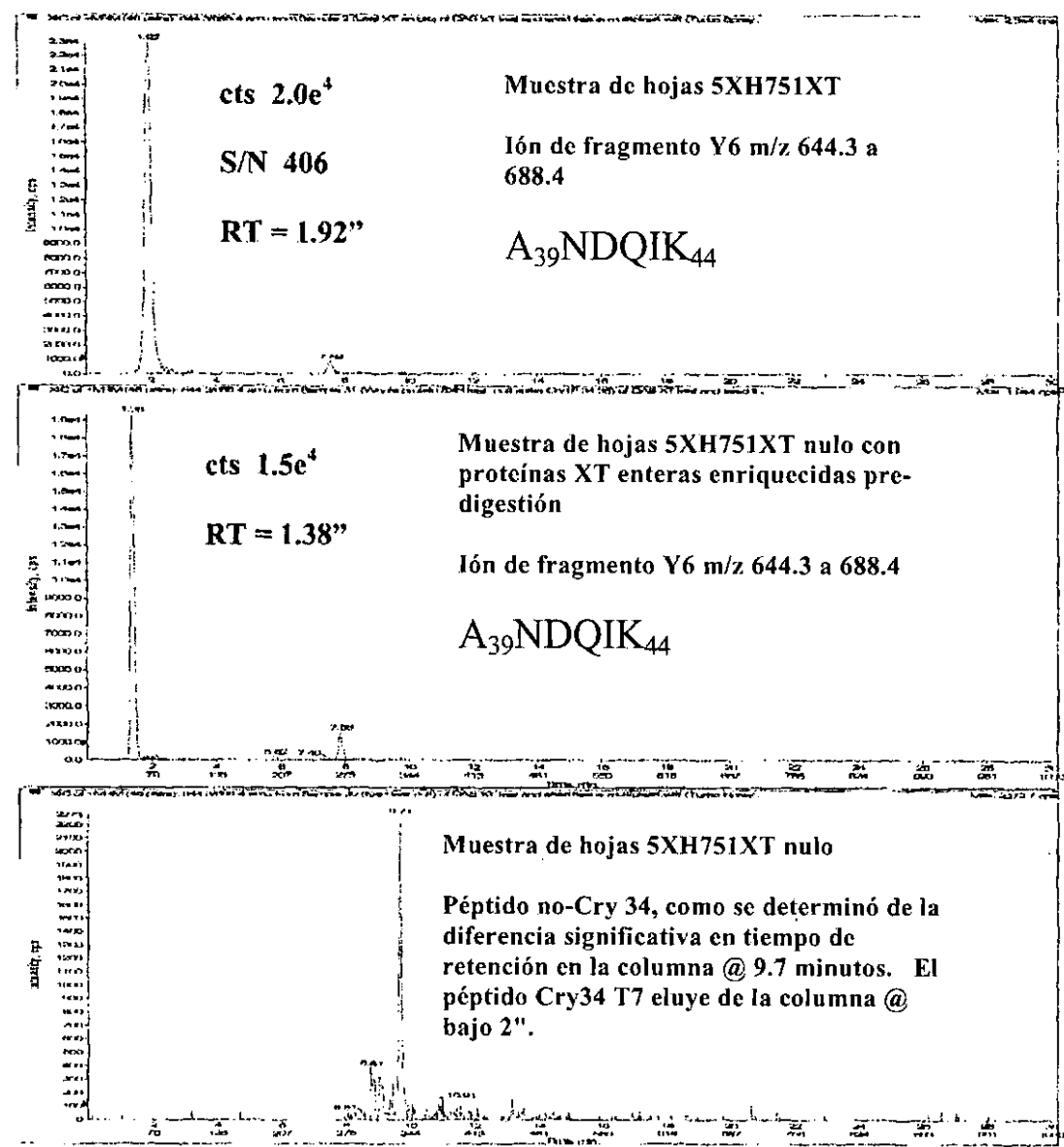


Cry1F (Proteína de cristal plaguicida cry1Fa (delta-endotoxina insecticida Cry1F(a)))

T22 TYPIQTSSQLTR

FIG. 8

Detección de Cry34 en 5XH751XT endógamo

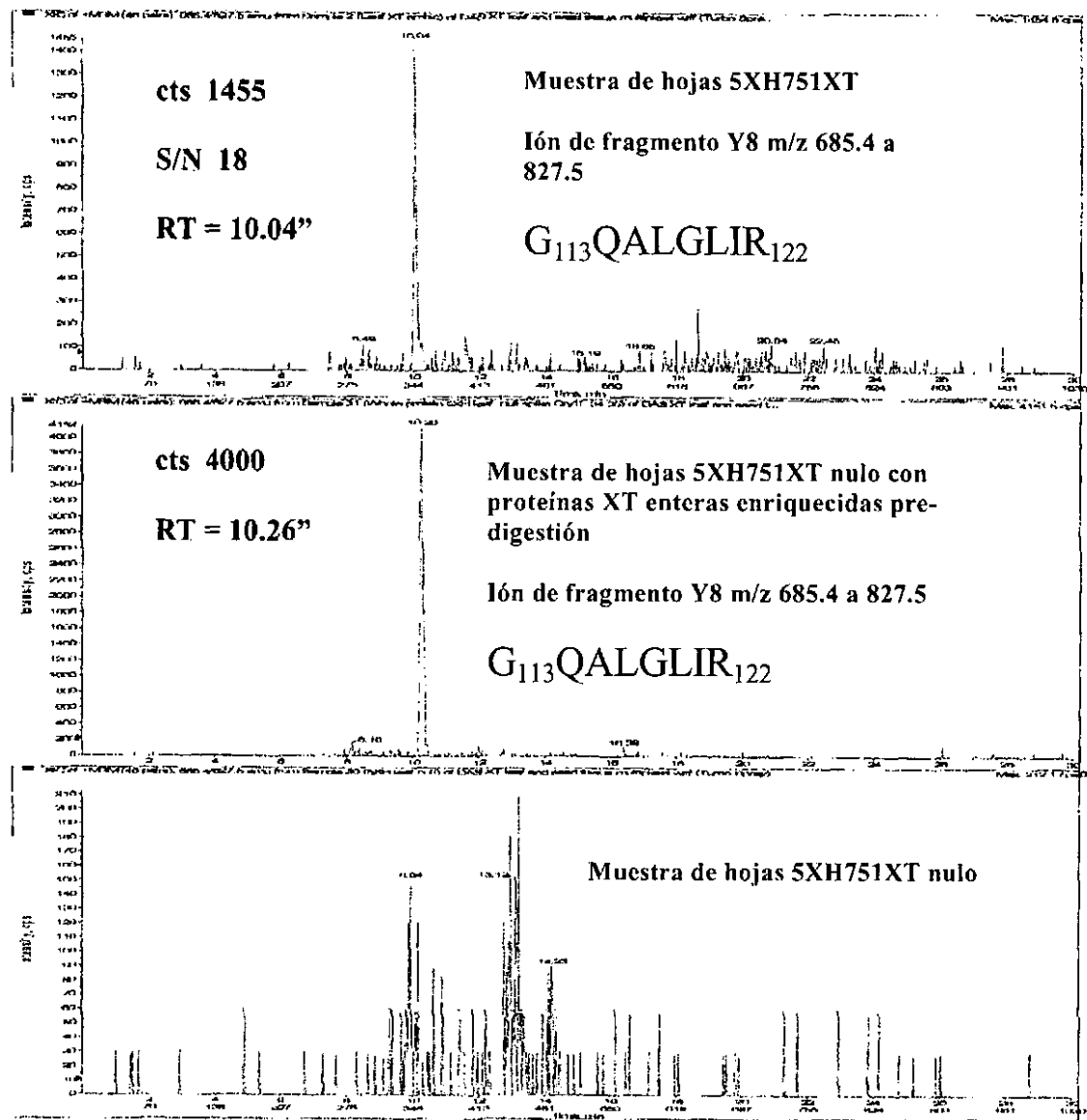


Cry34 (Proteína de cristal ET79 [Bacillus thuringiensis])

T7 TSPTNVANDQIK

FIG. 9

Detección de Cry35 en 5XH751XT endógamo

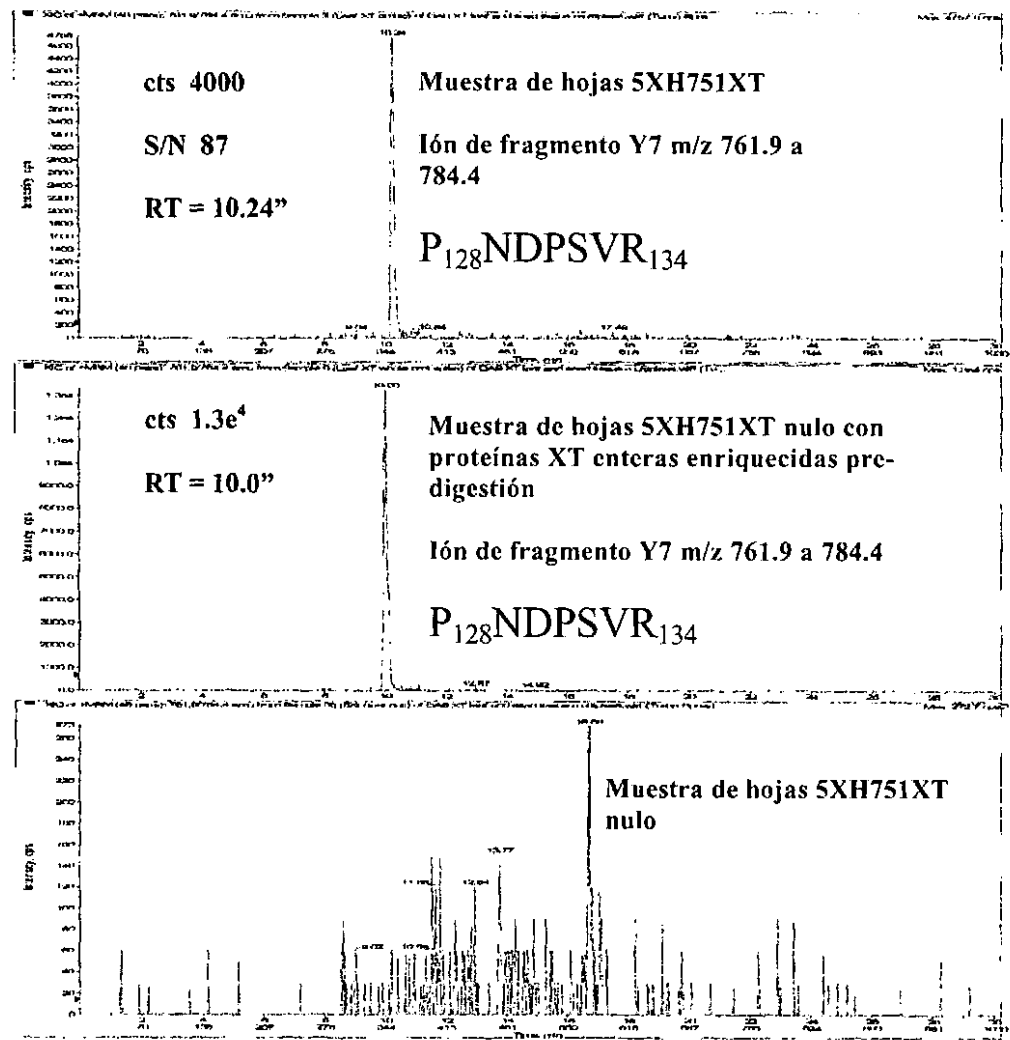


Cry35 (tipo Cry35Ab (*Bacillus thuringiensis*))

T9 VLTAGTGQALGLIR

FIG. 10

Detección de PAT en 5XH751XT endógamo



PAT (Fosfinotricina N-acetiltransferasa (PPT N-acetiltransferasa))

T10 SVVAVIGLPNDPSVR

PIQ111 Seq Listing ST25.txt
LISTA DE SECUENCIAS

<110> Dow Agrosciences LLC
Lawry, John R
Flook, Joshua A

<120> ANÁLISIS MÚLTIPLEX DE PROTEÍNA TRANSGÉNICA APILADA

<130> 2971-10111

<150> PCT/US2010/037192
<151> 2010-06-03

<160> 32

<170> Patentin version 3.4

<210> 1
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido T6 de AAD-1

<400> 1

Phe Gly Pro Val Asp Pro Val Pro Leu Leu Lys
1 5 10

<210> 2
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido T7 de AAD-1

<400> 2

Ser Ile Glu Gly Tyr Pro Glu Val Gln Met Ile Arg
1 5 10

<210> 3
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido T12 de AAD-1

<400> 3

Val Phe Gly Ser Leu Tyr Gln Ala Gln Asn Arg
1 5 10

<210> 4
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

P10111 seq Listing_ST25.txt

<220>

<223> Péptido T4 de AAD-12

<400> 4

Ile Gly Gly Gly Asp Ile Val Ala Ile Ser Asn Val Lys
 1 5 10

<210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido T9 de AAD-12

<400> 5

Ala Ala Tyr Asp Ala Leu Asp Glu Ala Thr Arg
 1 5 10

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido T19 de AAD-12

<400> 5

Ala Glu Pro Trp Asp Phe Lys
 1 5

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido T22 de Cry1F

<400> 7

Thr Tyr Pro Ile Gln Thr Ser Ser Gln Leu Thr Arg
 1 5 10

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido T46 de Cry1F

<400> 8

Ile Phe Ala Gly Gln Phe Asn Lys

P10111 seq Listing_ST25.txt

1

5

<210> 9
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido T7 de Cry34

<400> 9

Thr Ser Pro Thr Asn Val Ala Asn Asp Gln Ile Lys
 1 5 10

<210> 10
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido T9 de Cry35

<400> 10

Val Leu Thr Ala Gly Thr Gly Gln Ala Leu Gly Leu Ile Arg
 1 5 10

<210> 11
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido T17 de Cry35

<400> 11

Tyr Gln Tyr Trp Gln Arg
 1 5

<210> 12
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido T2 de PAT

<400> 12

Thr Glu Pro Gln Thr Pro Gln Glu Trp Ile Asp Asp Leu Glu Arg
 1 5 10 15

<210> 13
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial

P10111 Seq Listing_5725.txt

<220>

<223> Péptido T8 de PAT

<400> 13

Leu Gly Leu Gly Ser Thr Leu Tyr Thr His Leu Leu Lys
 1 5 10

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido T10 de PAT

<400> 14

Ser Val Val Ala Val Ile Gly Leu Pro Asn Asp Pro Ser Val Arg
 1 5 10 15

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Fragmento Y7 de péptido T6 de AAD-1

<400> 15

Pro Glu Val Gln Met Ile Arg
 1 5

<210> 16

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Fragmento Y6 de péptido T6 de AAD-1

<400> 16

Pro Val Pro Leu Leu Lys
 1 5

<210> 17

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Fragmento Y6 de péptido T12 de AAD-1

<400> 17

Tyr Gln Ala Gln Asn Arg

P10111 Seq Listing_ST25.txt

1 5

<210> 18
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Fragmento Y8 de péptido T9 de AAD-12

<400> 18

Asp Ala Leu Asp Glu Ala Thr Arg
 1 5

<210> 19
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Fragmento Y5 de péptido T19 de AAD-12

<400> 19

Ala Glu Pro Trp Asp Phe Lys
 1 5

<210> 20
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Fragmento Y7 de péptido T4 de AAD-12

<400> 20

Val Ala Ile Ser Asn Val Lys
 1 5

<210> 21
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Fragmento Y8 de péptido T22 de Cry1F

<400> 21

Gln Thr Ser Ser Gln Leu Thr Arg
 1 5

<210> 22
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

P10111 seq Listing_ST25.txt

<220>
 <223> Fragmento Y10 de péptido T22 de Cry1F

<400> 22

Pro Ile Gln Thr Ser Ser Gln Leu Thr Arg
 1 5 10

<210> 23
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Fragmento Y6 de péptido T7 de Cry1F

<400> 23

Ala Gly Gln Phe Asn Lys
 1 5

<210> 24
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Fragmento Y5 de péptido T7 de Cry34

<400> 24

Asn Asp Gln Ile Lys
 1 5

<210> 25
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Fragmento Y6 de péptido T7 de Cry34

<400> 25

Ala Asn Asp Gln Ile Lys
 1 5

<210> 26
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Fragmento Y8 de péptido T9 de Cry35

<400> 26

Gly Gln Ala Leu Gly Leu Ile Arg

P10111 Seq Listing_ST25.txt

1

5

<210> 27
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Fragmento Y10 de péptido T9 de PAT
 <400> 27

Gly Thr Gly Gln Ala Leu Gly Leu Ile Arg
 1 5 10

<210> 28
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Fragmento Y9 de péptido T10 de PAT
 <400> 28

Gly Leu Pro Asn Asp Pro Ser Val Arg
 1 5

<210> 29
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Fragmento Y10 de péptido T2 de PAT
 <400> 29

Pro Gln Glu Trp Ile Asp Asp Leu Glu Arg
 1 5 10

<210> 30
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Fragmento Y10 de péptido T8 de PAT
 <400> 30

Gly Ser Thr Leu Tyr Thr His Leu Leu Lys
 1 5 10

<210> 31
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

P10111 Seq Listing_ST25.txt

<220>

<223> Fragmento Y7 de Cry1F

<400> 31

Thr Ser Ser Gln Leu Thr Arg
1 5

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Fragmento Y7 de PAT

<400> 32

Pro Asn Asp Pro Ser Val Arg
1 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 10/37182

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(B) - B01D 59/44, C12P 21/08, C07K 1/36 (2010.01)
USPC - 250/282, 435/88.1, 530/344

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)
USPC - 250/282, 435/88.1, 530/344, 250/281, 530/300, 930/10

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 practicable, search terms used)
WEST - PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB; Dialog Classic Files - 654, 652, 351, 349, 6, 35, 85, 155; USPTO Web Page; Google Scholar; Search terms - high throughput detection, protein digest, peptide separation, ionization, transgenic plant sample, mass spectroscopy, transgenic expression, transgenic progeny

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X -- Y	US 2005/0153380 A1 (EVERETT et al.) 14 July 2005 (14.07.2005) para [0002], [0003], [0010], [0012], [0014], [0015], [0019]-[0024], [0044]-[0047], [0058], [0062], [0075], [0076], [0081], [0091]	1-16 ----- 17-20
Y	US 2005/0228273 A1 (HUANG et al.) 13 October 2005 (13.10.2005) para [0151], [0241]	17-20

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* 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 application or patent 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

24 August 2010 (24.08.2010)

Date of mailing of the international search report

07 SEP 2010

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 671-272-4300
PCT OSP: 671-272-7774

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: B01D 059/044	
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) DOW AGROSCIENCES LLC	
(30) Prioridad	(31) Prioridad 61/183,777	(32) Fecha 03/06/2009	(33) País US
		(72) Inventor(es) JOHN LAWRY JOSHUA FLOOK	
		(74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 03/01/2012		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 09/12/2010	
Fecha de presentación de la solicitud: 03/06/2010		N° publicación: WO 2010/141674 A3	
No. de solicitud PCT/US2010/037192			
(54) Título: ANÁLISIS MÚLTIPLE DE PROTEÍNA TRANSGÉNICA APILADA			

Resumen:

La invención se refiere a métodos para análisis múltiple de muestras de proteína compleja de plantas utilizando espectrometría de masa. En algunas incorporaciones, la divulgación concierne a métodos para mantener una variedad de planta transgénica, por ejemplo, analizando generaciones de una variedad de planta transgénica con respecto a la presencia y concentración de proteínas transgenica multiplexadas.

89

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 000101
		Bogotá D.C., Enero 02 de 2012 - 11:36:31

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS	NI 860.041.367
---------------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427470842	02/01/2012	17.045.000.00

*** Conceptos Pagados ***				
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	590.000.00	590.000.00
				<u>\$590.000.00</u>
=====				

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-000507- -00000-0000
Fecha: 2012-01-03 10:42:09 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 90

Edo: 10975-841-071-5

90

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
-/-

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 122624
		Bogotá D.C., Diciembre 16 de 2011 - 18:38:37

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427470886	16/12/2011	36.506.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	BENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO Vr. CONCEPTO
1	50005-01-04	PRESENTACION DE OBSERVACIONES A SOLICITUDES	12 MARCAS Y LEMAS COMERCIALES
			304.000.00 304.000.00
			\$304.000.00

SON: **TRESCIENTOS CUATRO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-000507-00000-0000
Fecha: 2012-01-03 10:42:09 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 90

Co/o = 10955-841-071-5
10955-841-071-5



No. 12-000507- -00000-0000

Fecha: 2012-01-03 10:42:09 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 90

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐

Indicación que se solicita una patente.

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Descripción de la invención

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐

Indicación que se solicita una PCT

☐

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita 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 ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita un esquema de trazado

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica de un esquema de trazado

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PLANILLA DE RADICACION - DIGITALIZACION DIARIA RELACION DE ANEXOS

Dependencia:	Fecha:	Recibido:
Tipo de Radicación: Entrada: Salida: Traslado:	Convenio:	
Radicator:	Plantilla:	

ID	No Radicación	Cana	Item
	112-507-0		
2			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			
21			
22			

Item	Unidad de Conservación
1	CD
2	Disquetes
3	OVD
4	Fotos
5	Libro
6	Muestra Física
7	Otros
8	Pianos
9	Periodico
10	Publicación Periodica
11	Sobre blanco tamaño carta
12	Sobre blanco tamaño oficio
13	Sobre de manila

Observaciones
los folios 14 y 25 forman la portada del documento.