

Respuesta a Requerimientos

1	Datos del Solicitante / Titular			
Nombre:	MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO	Dirección Electrónica:	sic@castellanosyco.co	
Dirección:	CALLE 94A 7A 09	Domicilio/País de constitución:	COLOMBIA - BOGOTA D.C. - BOGOTA D.C.	
Identificación:				
☒ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ PASAPORTE		☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ NIT		
Número:		39779654-		
2	Dato de la Creación			
Identificación de la Creación	No. de Certificado	Vigencia	No. de Expediente	Tipo Trámite
NUEVOS GENES CON RESISTENCIA A LOS HERBICIDAS	000000		06110105	PCT-PATENTE DE INVENCION CAPITULOS I Y II
3	Texto de la Comunicación	Se anexa memorial de respuesta al oficio de fondo No. 7803, junto con un nuevo pliego reivindicatorio conformado por 49 reivindicaciones.		
4	Anexos			
☒ Anexos				

CASTELLANOS & Co. LTDA

ABOGADOS
Calle 94 A No. 7 A - 09
Bogotá, D.C., COLOMBIA

Señor

Director de la Dirección de Nuevas Creaciones

Superintendencia de Industria y Comercio

Ministerio de Comercio, Desarrollo Industria y Turismo

E. S. D.

Re.: Expediente No. **06 110105**

Solicitud de Patente PCT entrada en Fase Nacional, para:

“NUEVOS GENES CON RESISTENCIA A HERBICIDAS”

Solicitante: **DOW AGROSCIENCES LLC**

RESPUESTA A EXAMEN DE FONDO

Yo, **MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO**, mayor de edad, identificada y domiciliada como aparece al pie de mi firma, obrando en mi calidad de apoderada de la sociedad solicitante del asunto citado en la referencia, en atención a su oficio No. **7803** notificado el **14 de julio de 2015**, y para el cual solicité oportunamente prorroga de término el **2 de octubre de 2015**, atentamente me permito dar respuesta al mismo de la siguiente manera:

1. Modificación a las Reivindicaciones

De acuerdo con lo establecido en el Artículo 34 de la Decisión 486 y en vista de las observaciones realizadas por el examinador, se presenta en esta oportunidad un nuevo pliego reivindicatorio conformado por 49 reivindicaciones, en donde se han realizado las siguientes modificaciones:

- En esta oportunidad no se incluyen las antiguas reivindicaciones 8 a 12, 55 a 59 y 61 a 63.
- Siguiendo las amables recomendaciones del examinador, el nuevo pliego reivindicatorio no incluye la expresión “al menos”.
- La reivindicación 47 ha sido modificada de tal manera que ahora hace mención a los promotores utilizados, incluyendo en esta reivindicación la información contenida en las antiguas reivindicaciones 48 y 49.

CASTELLANOS & Co. LTDA

ABOGADOS
Calle 94 A No. 7 A - 09
Bogotá, D.C., COLOMBIA

- Los métodos han sido modificados de forma tal que ahora se definen a través de sus etapas, las cuales se encuentran soportadas y ejemplificadas en la descripción de la presente solicitud.
- Adicionalmente los poli-nucleótidos reclamados se han definido por sus características esenciales estructurales.

Teniendo en cuenta lo anterior, es posible determinar que el pliego reivindicatorio es claro y conciso, cumpliendo así con los requerimientos del Artículo 30 de la Decisión 486.

Respecto a objeciones realizadas por el examinador se enfatiza lo siguiente:

- El examinador ha objetado las reivindicaciones 1 a 4 como materia no patentable. En este sentido se hace notar que de conformidad con la Decisión 486 el material biológico **modificado** es patentable.

Tal como lo establece el artículo 15 de la decisión 486:

“no se consideran invenciones: b) En todo o en parte los seres vivos tal como se encuentran en la naturaleza, (...) el material biológico existente en la naturaleza (...).”

- De otro lado, es necesario enfatizar que la presente solicitud intenta buscar protección para una invención que no es de carácter natural. La invención reivindicada hace mención a células de planta modificadas genéticamente por el hombre; es decir estas células no existirían en la naturaleza por si solas si no fuese por la intervención del hombre tanto en su planeamiento como ejecución.
- De otra parte, siendo que las células de planta transgénica que se reivindican no existen en la naturaleza sin la intervención del hombre, la presente invención es susceptible de protección.

Se solicita atentamente tener en cuenta este nuevo pliego reivindicatorio para el análisis de patentabilidad, toda vez que no implica una ampliación de la materia inicialmente solicitada y además permite superar las objeciones comunicadas por el examinador.

2. **Análisis de patentabilidad**

Para la evaluación de la patentabilidad de la invención se citó el documento D1: WO 2003034813, así como el documento D2: GeneBank:GI:44903448, y el documento D3: WO 1998020144.

2.1 Nivel inventivo

En vista de las modificaciones introducidas al pliego reivindicatorio, es posible establecer que el nuevo objeto reivindicado es inventivo sobre el estado de la técnica.

En primer lugar, se destaca que el documento D1 divulga un gen y la proteína correspondiente que son distintos a la proteína y gen AAD-1 de la presente solicitud. Por su parte, el documento D2 divulga una proteína bacterial, la expresión de genes bacterianos tolerantes a herbicida en plantas es impredecible.

De acuerdo al ejemplo 17 de la presente solicitud, se puede evidenciar un gen bacteriano llamado AAD-2 era activo en bacterias pero fue esencialmente inactivo en plantas. AAD-2 mostró más actividad en bacterias que AAD-1.

La tabla 1 (tabla 34 de la descripción) muestra los resultados de la cinética enzimática de AAD-1 (v1) y AAD-2 (v1) parcialmente purificadas se comparó usando 2,4-D como sustrato. Los valores de K_m para 2,4-D fueron de 97 y 423 μM para AAD-1 (v1) y AAD-2 (v1) respectivamente y los valores de V_{max} aparentes fueron 0,11 y 0,86 unidades de A_{510} , respectivamente. Dado que se usaron cantidades equivalentes de enzima en los ensayos (según la determinación realizada por análisis SDS-PAGE), puede concluirse que la k_{cat} de AAD-2 (v1) para 2,4-D es casi 8 veces mayor que AAD-1 (v1) y la relación k_{cat}/K_m es 2 veces mayor. De este modo AAD-2 (v1) es significativamente más eficiente en la ruptura del 2,4-D *in vitro* que AAD-1 (v1). Esto contrasta en forma sorprendente con los hallazgos *in planta* informados a continuación, donde las plantas que expresan AAD-1 (v1) son significativamente mejores al conferir resistencia contra 2,4-D con relación a AAD-2 (v1).

Tabla 1. Comparación de los valores de K_m y “ V_{max} ” para las ariloxialcanoato dioxigenasas (AADs) de pDAB3202 (AAD-2) y pDAB3203 [AAD-1 (v1)] con diferentes sustratos herbicidas:

Enzima	Compuesto	K_m (μM) $\pm SE$	V_{max} (unidades A_{510})	K_m/V_{max} (unidades arbitrarias)
AAD-2	2,4-D	423 (± 1)	0,86	2,03
AAD-1 (v1)	2,4-D	97 (± 21)	0,11	1,16

Notas: Los ensayos se realizaron en MOPS pH 6,75 + α -cetoglutarato 1 mM + ascorbato de Na 0,1 mM + Fe^{2+} 0,1 mM y los fenoles coloriméticamente liberados detectados usando 4-aminoantipirina/ferricianuro.

Igualmente, mediante la evaluación de *Arabidopsis* transformada, fue posible determinar resultados en relación a las plantas transformadas.

En primer lugar, de manera sorprendente, las transformaciones de *Arabidopsis* usando el gen *AAD-2(v1)* nativo suministraron una muy baja frecuencia de transformación cuando se evaluaron para determinar la tolerancia al glufosinato (función del marcador seleccionable *PAT*). Aproximadamente se han evaluado 1,3 millones de semillas y sólo 228 transformantes de glufosinato se recuperaron, lo que equivale a una frecuencia de transformación/selección del 0,018%, tal como se evidencia en la tabla 2 (tabla 15 de la descripción).

Tabla 2: Selección de AAD-1 (v3) (planta optimizada) o AAD-1 (v2) (nativa), AAD-2 (v1) nativa), o plantas individuales T ₁ transformadas con AAD-2 (v2) que utilizan glufosinato y 2,4-D.							
Agente de selección	Gen	Sesgo de Codones	Semillas totales sembradas y clasificadas	Cantidad de T ₁ resistente	Proporción de selección	Rango de proporción de selección	% de plantas seleccionadas que expresan PAT ³
Glufosinato ¹	AAD-1 (v2)	n	84.000	278	0,33%	0,33%	nd ⁴
Glufosinato ¹	AAD-1 (v3)	p	400.500	493	0,12%	0,05 a 0,23%	97%
2,4-D ²	AAD-1(v3)	p	70.000	53	0,08%	0,07 a 0,08%	96%
Glufosinato ¹	AAD-2 (v1)	n	1.301.500	228	0,018%	0,007 a 0,021%	100%
Glufosinato ¹	AAD-2(v2)	p	200.000	224	0,11%	0,11%	nd ⁴

¹ Esquema de selección de Glufosinato: 280g ia/ha de glufosinato aplicado 5-6 + 10 DAP
² Esquema de selección de 2,4-D: 50 g ia/ha de 2,4-D aplicado 5-7 + 10-14 DAP
³ Expresión de proteína PAT determinada por cintas de PAT ELISA
⁴nd, no determinado
⁵ Sesgo de codones, n=gen microbiano nativo, p=planta optimizada

Tal como se puede evidenciar en la tabla anterior, la frecuencia de transformación para *AAD-2 (v1)* nativo fue sólo del 6% de la del *AAD-1 (v2)* nativo. De otro lado, el gen *AAD2 (v1)* nativo se optimizó posteriormente en forma sintética, se clonó y se transformó como pDAB3705, en *Arabidopsis*. El *AAD2 (v2)* optimizado en la planta (SEC ID NO: 29, que codifica la SEC ID NO: 30) produjo una frecuencia de selección de *Arabidopsis* de T₁ normal usando herbicida Liberty de aproximadamente 0,11%.

De otra parte, la tabla 16 de la descripción compara la respuesta de los genes *AAD-1 (v2)*, *AAD-1 (v3)*, *AAD-2 (v1)* y *AAD-1(v2)* al impartir resistencia al 2,4-D a los transformantes T₁ de *Arabidopsis*. Se encontró que todos los genes proporcionaron realmente cierta resistencia significativa al 2,4-D versus las líneas de control transformadas y no transformadas; sin embargo, las construcciones individuales fueron altamente variables en su capacidad de impartir resistencia al 2,4-D a plantas T₁ de *Arabidopsis* individuales. Dentro de un tratamiento determinado, el nivel de respuesta de la planta varió ampliamente y puede atribuirse al hecho de que cada planta representa un evento de transformación independiente. Por otra parte, la tolerancia mejoró levemente para *AAD2 (v2)* optimizado en la planta versus el gen nativo; sin embargo, la

CASTELLANOS & Co. LTDA

ABOGADOS
Calle 94 A No. 7 A - 09
Bogotá, D.C., COLOMBIA

comparación de ambos genes *AAD-1* y *-2* optimizados en la planta indica un promedio significativo para *AAD-1 (v3) in planta*.

Es importante tener en cuenta que, en cada dosis de 2,4-D evaluado, hubo individuos que no se vieron afectados mientras que algunos se afectaron en forma severa. De manera sorprendente, los transformantes de *AAD-2 (v1)* fueron mucho menos resistentes al 2,4-D que los genes *AAD-1 (v2)* o *AAD-1 (v3)* tanto a partir de la frecuencia de plantas altamente tolerantes como también del promedio global de lesiones. Ninguna planta transformada con *AAD-2 (v1)* sobrevivió a 200 g de ea/ha de 2,4-D relativamente sin lesiones (<20% de lesiones visuales), y el daño general de la población fue de aproximadamente el 83%. Por el contrario, 56% (45 de 80) de plantas T₁ transformadas con *AAD-1 (v2)* sobrevivieron a 200 g de ea/ha de 2,4-D sin lesiones (promedio de lesiones de la población = 34%), y >73% (11 de 15) de plantas T₁ de *AAD-1 (v3)* no tuvieron lesiones (promedio de lesiones de la población = 14%) (Ver Figura 20 de la presente solicitud)

Estos resultados son inesperados dado que la comparación *in vitro* de *AAD-1 (v2)* y *AAD-2 (v1)* nativos indicó que el 2,4-D se degradaba mejor por *AAD-2 (v1)*. *AAD-2 (v1)* se expresa en plantas T₁ individuales hasta niveles variables con el tamaño anticipado; sin embargo, se produce poca protección frente al 2,4-D por esta proteína expresada. Existe poca correlación entre el nivel de expresión observado en la transferencia Western y el nivel de lesión por 2,4-D en las mismas plantas (ver Figura 20 de la presente solicitud). No hubo ninguna diferencia significativa evidente en el nivel de expresión de las proteínas (*in planta*) para los genes *AAD-2* nativos y optimizados en la planta. Estos datos corroboran hallazgos anteriores que hacen que la expresión funcional de *AAD-1 (v3) in planta* para impartir resistencia a los herbicidas 2,4-D y AOPP sea inesperada

Con base en lo anteriormente expuesto, es posible afirmar que para una persona normalmente versada en la materia no es posible predecir que genes bacterianos para tolerancia a herbicida podría funcionar en plantas. El hallazgo que *AAD-1* posee una excelente actividad en plantas fue sorprendente y ampliamente ventajoso por sobre lo divulgado.

Finalmente, se hace notar que el documento D3 ha sido citado por el examinador con el fin de demostrar el uso de dos genes. El uso de dos genes era conocido, lo inventivo es que el gen reivindicado posee una excelente actividad en plantas.

En conclusión, la presente invención provee un efecto inesperado sobre el arte previo y por lo tanto, tiene nivel inventivo.

CASTELLANOS & Co. LTDA

ABOGADOS
Calle 94 A No. 7 A - 09
Bogotá, D.C., COLOMBIA

3. Anexos

- Nuevo pliego reivindicatorio conformado por cuarenta y nueve (49) reivindicaciones.

Señor Director,


Margarita Castellanos Abondano
C.C. No. **39.779.654** de Bogotá
T.P.A. No. **70.819** del C.S.J.
Calle 94A No. 7A-09 - Bogotá, D.C.
Teléfono: 7560770

Bogotá, D.C.
MCA/lt
P1408
RESPUESTA EXAMEN DE FONDO

REIVINDICACIONES MODIFICADAS CON LA RESPUESTA AL EXAMEN DE
FONDO OFICIO No. 7803 – EXPEDIENTE 06 110105

1. Una célula de planta transgénica que comprende un polinucleótido que codifica una proteína AAD-1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9.
2. La célula de la reivindicación 1, donde dicha célula de planta se selecciona del grupo que consiste en células dicotiledóneas y células monocotiledóneas.
3. La célula de la reivindicación 2, donde dicha célula de planta es dicotiledónea y se selecciona del grupo formado por una célula de algodón, una célula de tabaco, una célula de canola, una célula de soja y una célula de *Arabidopsis*.
4. La célula de la reivindicación 2, donde dicha célula de planta es una célula monocotiledónea seleccionada del grupo formado por una célula de arroz y una célula de maíz.
5. Un método para seleccionar una planta en un campo con malezas, en el cual dicho campo contiene una planta que comprende al polinucleótido seleccionado del grupo de SEQ ID NO: 4, y SEQ ID NO: 5, donde dicho método comprende aplicar a una porción de dicho campo un primer herbicida seleccionado del grupo formado por un herbicida fenoxi auxínico y un herbicida tipo ariloxialcanoato y seleccionar la planta que sea resistente a dicho herbicida.
6. El método de la reivindicación 5, en el cual dicho herbicida es un enantiómero R de una fenoxi auxina quiral.
7. El método de la reivindicación 6, en el cual dicho herbicida se selecciona del grupo que consiste en R-diclorprop y mecoprop.
8. El método de la reivindicación 5, en el cual dicho herbicida es una fenoxi auxina aquiral.
9. El método de la reivindicación 8, en el cual dicho herbicida se selecciona del grupo que consiste en 2,4-D y MCPA.

- 10.** El método de la reivindicación 5, en el cual dicho primer herbicida es un ariloxifenoxipropionato y dicha planta es una monocotiledónea.
- 11.** El método de la reivindicación 10, en el cual dicha monocotiledónea se selecciona del grupo que consiste en maíz, arroz, trigo, cebada, centeno, césped, avena, sorgo y pastos.
- 12.** El método de la reivindicación 5, en el cual dicho primer herbicida es una fenoxi auxina y dicha planta es una dicotiledónea.
- 13.** El método de la reivindicación 12, en el cual dicha dicotiledónea se selecciona del grupo que consiste en algodón, tabaco, canola y soja.
- 14.** El método de la reivindicación 5, en el cual dicho método comprende aplicar un segundo herbicida.
- 15.** El método de la reivindicación 14, en el cual dicho primer herbicida y dicho segundo herbicida se aplican en forma secuencial.
- 16.** El método de la reivindicación 14, en el cual dicho primer herbicida y dicho segundo herbicida se aplican en forma simultánea.
- 17.** El método de la reivindicación 14, en el cual dicho primer herbicida es una fenoxi auxina y el segundo herbicida es un ariloxifenoxipropionato.
- 18.** El método de la reivindicación 5, en el cual dicha planta es resistente al glifosato.
- 19.** El método de la reivindicación 6, en el cual dicho enantiómero R es un componente de una mezcla racémica.
- 20.** El método de la reivindicación 14, en el cual dicha planta comprende además un segundo gen de resistencia a los herbicidas que torna dicha planta resistente a dicho segundo herbicida.
- 21.** El método de la reivindicación 20, en el cual dicho segundo gen herbicida se selecciona del grupo que consiste en una AHAS (acetoxihidroxiácido sintasa)

modificada, SurA, SurB, Csr1, Csr1-1, Csr1-2, una EPSPS (5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa) modificada, GOX, GAT, PAT (fosfinotricin-N-acetiltransferasa), bar y una enzima que degrada un dicamba.

22. El método de la reivindicación 20, en el cual dicho segundo herbicida se selecciona del grupo que consiste en glifosato, glufosinato, dicamba, inhibidores de acetolactato sintasa, inhibidores de protoporfirinógeno oxidasa e inhibidores de hidroxifenil-piruvato-dioxigenasa.

23. El método de la reivindicación 22, en el cual dicho segundo herbicida es un inhibidor de acetolactato sintasa seleccionado del grupo que consiste en herbicidas de tipo imidazilinas, sulfonil ureas y triazolopirimidinas.

24. El método de la reivindicación 23, en el cual dicho segundo herbicida es una imidazilina seleccionada del grupo que consiste en imazamox, imazetapir, imazaquin e imazapic.

25. El método de la reivindicación 20, en el cual dicho primer herbicida es una fenoxi auxina y dicho segundo herbicida se selecciona del grupo que consiste en glifosato y glufosinato.

26. El método de la reivindicación 25, en el cual dicha fenoxi auxina es 2,4-D y dicho segundo herbicida es glifosato.

27. El método de la reivindicación 20, en el cual dicho primer herbicida es un ariloxifenoxipropionato y dicho segundo herbicida es glifosato.

28. El método de la reivindicación 27, en el cual dicho primer herbicida se selecciona del grupo que consiste en quizalofop, haloxifop y cihalofop.

29. El método de la reivindicación 23, en el cual dicho segundo herbicida es una sulfonil urea seleccionada del grupo que consiste en amidosulfuron, bensulfuron, clorimuron, clorsulfuron, cinosulfuron, flupirsulfuron, foramsulfuron, halosulfuron, nicosulfuron, primisulfuron, prosulfuron, rimsulfuron, sulfometuron, sulfosulfuron, tifensulfuron, triasulfuron, trifloxisulfuron y triflusulfuron.

- 30.** El método de la reivindicación 20, donde dicho método comprende además aplicar un tercer herbicida.
- 31.** El método de la reivindicación 30, en el cual dichos herbicidas son 2,4-D, quizalofop y glufosinato.
- 32.** Un método para controlar malezas en un campo, donde dicho método comprende aplicar un primer herbicida a dicho campo y plantar una semilla en dicho campo dentro de los 14 días de aplicar dicho primer herbicida, donde dicha semilla comprende una célula de la reivindicación 1, y donde dicho primer herbicida se selecciona del grupo que consiste en una fenoxi auxina y un ariloxifenoxipropionato.
- 33.** El método de la reivindicación 32, en el cual dicho primer herbicida es un ácido, una sal inorgánica, una sal orgánica, un éster, un isómero enantio-específico R o un componente de una mezcla racémica.
- 34.** El método de la reivindicación 32, en el cual dicha semilla comprende un segundo gen que torna dicha planta resistente a un segundo herbicida, y dicho método comprende además aplicar dicho segundo herbicida a dicho campo antes de dicha plantación.
- 35.** El método de la reivindicación 34, en el cual dicho segundo herbicida se selecciona del grupo que consiste en glifosato, gramoxona y glufosinato.
- 36.** Un polinucleótido optimizado para la expresión en una planta, donde dicho polinucleótido codifica una proteína que tiene actividad de ariloxialcanoato dioxigenasa y comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.
- 37.** El polinucleótido de la reivindicación 36, donde dicho polinucleótido comprende la SEQ ID NO: 5.
- 38.** El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 36 donde dicho polinucleótido está operativamente unido a un promotor que es seleccionado del

grupo que consiste en el promotor AtUbi10, el promotor ZmUbi1, y el promotor del virus de mosaico de la mandioca.

39. Un método para seleccionar una célula de planta transformada, donde dicho método comprende someter a una pluralidad de células de planta a transformación con un polinucleótido de la reivindicación 36 o 38 y cultivar dichas células en una concentración de un herbicida que permita que las células transformadas que expresan dicho polinucleótido crezcan mientras matan o inhiben el crecimiento de células no transformadas, donde dicho herbicida se selecciona del grupo que consiste en una fenoxi auxina y un ariloxifenoxialcanoato.

40. El método de la reivindicación 39, en el cual dichas células son células de una planta y dicho método se usa para seleccionar una planta transformada.

41. Un polinucleótido de la reivindicación 38 o 39, donde dicho polinucleótido se usa como marcador seleccionable.

42. Un método para detectar si una planta comprende un polinucleótido de la reivindicación 38 o 39, donde dicho método comprende recolectar una muestra de dicha planta y analizar dicha muestra para determinar la presencia de dicho polinucleótido.

43. El método de la reivindicación 42, donde dicho método comprende analizar dicha muestra para determinar la presencia de una proteína codificada por dicho polinucleótido.

44. El método de la reivindicación 5, donde dicho método se usa para tratar o prevenir malezas resistentes a los herbicidas.

45. Un método para controlar malezas resistentes al glifosato en un campo de plantas de cultivo tolerantes al glifosato, donde dichas plantas comprenden un polinucleótido seleccionado del grupo de SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, y dicho método comprende aplicar un herbicida ariloxialcanoato a una porción de dicho campo, y seleccionar la planta que tiene resistencia a dicho herbicida ariloxialcanoato.

46. El método de la reivindicación 45, donde dicho herbicida es una fenoxi auxina.

47. El método de la reivindicación 45, donde dicho herbicida es un ariloxi fenoxipropionato.

48. El método de la reivindicación 45, donde dichas plantas son dicotiledóneas.

49. El método de la reivindicación 45, donde dichas plantas son monocotiledóneas.