

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES**

2020
Bogotá, D.C.

Abogada
Margarita Castellanos

ASUNTO	Radicación	08-125763
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	519
	Oficio	
	Folios	005

1 3 0 5 2

Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐

Vía Nacional ☐

Vía PCT (fase nacional) ☐ Cap. I ☐ Cap. II ☒

No. Sol. Internacional	PCT/US2007/069662
Pub. Internacional	WO 2007/140256

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

1. Documentos estudiados

<u>Descripción:</u>	Folios: 76 a 132	26/11/2008
	Folios: 171 a 214	10/02/2009
<u>Reivindicaciones:</u>	Folios: 133 a 149	26/11/2008
	Folios: 215 a 221	10/02/2009
<u>Figuras:</u>	Folio: 151	26/11/2008

Expediente 08-125763 1er Art.45

Secuencias:

Folios: 152 a 164

26/11/2008

Prioridad:

US 60/808,834

26/05/2006

2. Análisis de la Prioridad

Se acepta la reivindicación de Prioridad porque esta solicitud fue presentada dentro del plazo establecido (Art. 9 D 486) y su contenido técnico corresponde con el de las prioridades reivindicadas.

3. Objeto de la invención

Título de la solicitud: "Planta y semilla de maíz correspondientes al evento transgénico MON89034, y métodos para su detección y uso".

El objeto de la presente solicitud es suministrar una transformación genética en plantas de maíz para que adquieran resistencia a infestaciones de insectos de tipo Lepidóptera.

El problema planteado en esta solicitud es la necesidad de evitar el daño producido por diferentes especies de plagas de lepidópteros sobre los cultivos de maíz.

Para solucionar este problema técnico la solicitud en estudio suministra una planta de maíz que contiene el evento transgénico denominado MON89034, resistentes a lepidópteros. Además se suministran las secuencias de DNA que forman este evento y los métodos de transformación y detección del mismo.

El objeto de la solicitud definida anteriormente se clasificó en la IPC: A01H 5/00; C12N 15/29; C12N 15/09.

4. Excepción a la Patentabilidad (*Artículo 20 D486 literal c*)

El objeto de las reivindicaciones 4 a 10 es una planta o partes de ella, y el objeto de las reivindicaciones 12 a 16 es un proceso esencialmente biológico para la producción de plantas. De acuerdo con la Decisión 486 artículo 20 literal c) esta materia no es patentable. Estas reivindicaciones deberán retirarse del capítulo reivindicatorio.

5. De la solicitud de Patente

Descripción (artículo 28 D486)

El capítulo descriptivo no tiene información suficiente para ser reproducida por un técnico medio, en lo referente a:

- Definición 'del evento MON 89304, a lo largo del capítulo se menciona reiteradamente dicho evento. Sin embargo, en ninguna parte se define el mismo ni se indica cual es el gen o genes insertados en la planta que le confiere(n) resistencia a lepidópteros. Esta información es fundamental para que el técnico medio entienda la invención;
- La composición derivada de la planta de maíz transgénico (producto alimenticio derivado), no hay información sobre métodos de preparación de productos alimenticios preparados ni de las composiciones de los mismos.

De esta manera, la descripción no cumple con los requisitos establecidos en el artículo 28 de la D486.

Reivindicaciones (artículo 30 D 486)

El capítulo reivindicatorio presentado carece de claridad y concisión por cuánto:

- 1) El capítulo reivindicatorio en general no refleja las características técnicas fundamentales de la invención, esto es la inserción de dos genes de resistencia a lepidópteros (Cry1A y Cry2Ab) en un solo T-DNA. La definición únicamente a partir de los segmentos de inserción no hace clara ni concisa la invención;
- 2) La reivindicación 11 reclama una composición derivada de la planta de maíz transgénico, o partes de la misma, mencionando diversos productos alimenticios. Estos productos son obtenidos del uso de la planta de maíz como materia prima del alimento, y no se ven modificados por el objeto de la invención, por lo que no se consideran parte de la misma;
- 3) El par de moléculas de ADN reclamadas en la reivindicación 17 debe ser definido a partir de su secuencia, la indicación de que "las moléculas de ADN tienen una longitud de **nucleótidos contiguos** de la SEQ N°3 o SEQ N°5", no permite

establecer la identidad de las mismas. Lo mismo aplica para las reivindicaciones dependientes;

- 4) El conjunto de elementos para la detección de ADN reclamado en la reivindicación 33, tiene las mismas características técnicas del par de moléculas de ADN reclamadas en la reivindicación 17. Se recomienda eliminar algunas de estas reivindicaciones para darle concisión al capítulo reivindicatorio;

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

6. Determinación del Estado de la Técnica

Para determinar el estado de la técnica se ha tenido en cuenta la fecha de presentación de las solicitudes prioritarias reivindicadas con la solicitud: 26/05/2006.

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

Nº	Documento	Título	Fecha de publicación
D1	WO 2004/020636	"Nucleotide sequences encoding Cry1BB proteins for enhanced expression in plants"	11/03/2004
D2	Claire Halpin. Plant Biotechnology Journal (2005) vol. 3, pp. 141-155	"Gene stacking in transgenic plants – the challenge for 21st century plant biotechnology"	2005
D3	US 2002/0102582	"Corn event MON810 and compositions and methods for detection thereof"	01/08/2002

Resumen de los documentos citados:

D1: La invención describe composiciones y métodos útiles para el control de plagas de insectos lepidópteros y más particularmente describe secuencias de nucleótidos para uso en plantas que codifican toxinas insecticidas de longitud total y trunca, así como toxinas quiméricas (resumen).

<http://patentscope.wipo.int/search/en/search.jsf> ingresar WO2004020636

D2: El documento divulga las técnicas novedosas empleadas para lograr la transformación de plantas con múltiples genes y las ventajas y desventajas de cada técnica (resumen, folio 268).

D3: La invención provee maíz que incluye el evento MON810, el cual confiere resistencia a daño por insectos Lepidóptera. También se proveen ensayos para la detección de este evento basado en las secuencias del constructo recombinante insertado en el genoma de maíz y las secuencias flanqueantes del sitio de inserción (resumen, pág 1).

<http://www.google.com/patents> introducir N° aplicación 2002/0102582

7. Análisis de patentabilidad (artículo 14 D486)

Nivel inventivo (artículo 18 D486)

La reivindicación 1 reclama una molécula de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°1, SEQ N°2, o un complemento de la misma;

El documento D1 divulga plantas de maíz transgénico resistentes a plagas de insectos lepidópteros que son susceptibles a proteínas insecticidas en cristal Cry1Bb o variantes insecticidas de esta (Pág. 6 líneas 25-28). D1 realiza una transformación combinada co-expresando las proteínas insecticidas Cry1A y Cry2Ab (ejemplo 6), que mostraba una actividad mejorada respecto a las transformaciones con una sola proteína insecticida Cry (tabla 7). Estas plantas eran generadas al combinar las características del evento MON810 (Cry1A) y MON840 (Cry2Ab).

D1 también establece que esta invención puede ser empleada en diversas plantas cultivables, incluido el maíz (Pág. 10 línea 13). Este documento también divulga las células transformadas, las plantas transformadas y los métodos de transformación (ver ejemplos y reivindicaciones).

La diferencia entre la materia reclamada en la solicitud y D1 es que en la presente solicitud se integran los dos genes Cry en un solo T-DNA, mientras que en D1 están en dos insertos diferentes.

El efecto que produce esta diferencia no resulta aparente pues en ambos casos se logra la co-expresión de los genes y un incremento en el control de los insectos plaga.

El problema técnico objetivo resuelto por la invención es mejorar la expresión en plantas de maíz de los genes heterólogos *Cry1A* y *Cry2Ab* que confieren resistencia a lepidópteros por el uso de un solo plásmido.

Sin embargo, el uso de genes en un solo T-DNA que contiene múltiples genes de interés es conocido en el arte, tal como se evidencia en D5. Este documento menciona que esta técnica de genes apilados en un solo T-DNA permite incrementar la eficiencia de reproducción de múltiples caracteres de híbridos de maíz, por tanto proveer plantas con más de un carácter (tal como *Cry1A* y *Cry2Ab*), de una forma mejorada a como se logra por métodos de mejoramiento convencional. El uso de un único T-DNA con genes apilados permite evitar la segregación de los caracteres (Pág 146 col. izq).

Este documento divulga que se han realizado productos usando co-transformación biolística como medio para introducir tolerancia a herbicidas y resistencia a insectos en maíz, usando diferentes combinaciones de genes (Pág 146 col. izq; Tabla 1). También se divulga que se ha realizado un arroz transgénico co-transfectados con varios genes insecticidas tipo *Cry* (Pág 146 col. der).

Así, a partir de la información divulgada en D1 la persona del oficio normalmente versada en la materia podía obtener los insertos de dos genes *cry* en una planta de maíz y el efecto que la expresión de estos dos genes producía y a partir de D2 la persona del oficio conocía las ventajas de usar un único T-DNA para realizar la co-transfección.

La reivindicación 17 reclama un par de moléculas de ADN que comprende: una primera molécula de ADN y una segunda molécula de ADN, donde las moléculas de ADN tienen una longitud de nucleótidos contiguos de la SEQ N°3 o SEQ N°5 o su complemento, que es suficiente como para que funcionen como ADN cebadores o sondas diagnóstico del ADN que se extrae de la planta de maíz MON89034 o progenie de la misma.

También se reclama el método para detectar la presencia de una molécula de ADN usando técnica de PCR (reivindicación 26) ó técnica de hibridización (reivindicación 28)

El documento D3, divulga el método de detección a partir del uso de la secuencia flanqueante de la región del DNA insertado, en este caso el evento MON810, y el DNA del maíz (ver párrafo 8 D3). Igualmente, cada una de las etapas del método de

identificación coincide con las de la invención en estudio (párrafo 13, ejemplos pág 5-7). Este método se basa en los mismas etapas que el método de la solicitud, indicando que los cebadores o sondas se colocan con la muestra, se realiza una PCR y se obtiene un amplicon, se detecta el amplicón (Págs. 5-7).

Para este documento, aún cuando las secuencias particulares empleadas como cebadores sean diferentes, esta diferencia no confiere ningún efecto sobre el método, puesto que en ambos se logra el mismo objetivo y los cebadores, identificados a partir de un segmento particular con características comparables entre los dos eventos podían ser diseñados por la persona del oficio normalmente versada en la materia.

De esta manera, a partir de la información divulgada en D3 la persona del oficio normalmente versada en la materia podía identificar los segmentos de DNA usados como primer, y realizar métodos de detección de eventos de transformación.

Las reivindicaciones dependientes no aportan características inventivas por lo que no superan la objeción de nivel inventivo realizada.

Así a partir de D3 la invención en estudio reclamada en las reivindicaciones 17 a 38 resulta obvia e incumple el artículo 18 de la D486.

8. Conclusión

Los requisitos de patentabilidad de la presente solicitud están afectados así:

Ítem	Documento	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D1	WO 2004/020636	1-3, 13	Nivel inventivo
D2	Claire Halpin, Plant Biotechnology Journal (2005) vol. 3, pp. 141–155	1-3, 13	Nivel inventivo
D3	US 2002/0102582	17-38	Nivel inventivo

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de 60 días contados a partir de la fecha de notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento, o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

Se invita al solicitante se sirva indicar, si así lo considera, su renuncia al término faltante para dar respuesta a este requerimiento y presentarla por escrito

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



JESÚS FERNEL GARCÍA GARCÍA
Director de Nuevas Creaciones (E)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha 27 JUL 2012

Elaboró: N.Lamprea *NLB*.
Revisó: Consuelo Leguizamón L. *CL*
Aprobó: Jesús Fernel García G.

Review

Gene stacking in transgenic plants – the challenge for 21st century plant biotechnology

Claire Halpin

Plant Research Unit, School of Life Sciences, University of Dundee at SCRI, Invergowrie, Dundee DD2 5DA, UK

Received 30 June 2004;
revised 15 September 2004;
accepted 14 October 2004

Correspondence (fax 44 (0)1382 568505;
e-mail: c.halpin@dundee.ac.uk)

Keywords: chloroplast

transformation, co-transformation,
linked transgenes, marker gene
excision, metabolic engineering,
multigene manipulation, polyproteins,
pyramiding, retransformation,
stacking.

Summary

One of the major technical hurdles impeding the advance of plant genetic engineering and biotechnology is the fact that the expression or manipulation of multiple genes in plants is still difficult to achieve. Although a small proportion of commercial genetically modified (GM) crops present 'stacked' or 'pyramided' traits, only a handful of products have been developed by introducing three or more novel genes. On the research front, a variety of conventional and more novel methods have been employed to introduce multiple genes into plants, but all techniques suffer from certain drawbacks. In this review, the potential and problems of these various techniques and strategies are discussed, and the prospects for improving these technologies in the future are presented.

Introduction

Transgenic crops have the potential to promote revolutionary change in agriculture, industry, nutrition and even medicine. By manipulating plant genomes, crops can be engineered to provide enhanced nutritional value and to be resistant to biotic and abiotic stresses, plant raw materials can be better adapted to the requirements of industry, and 'green factories' can be used to produce a host of novel products, including pharmaceuticals, in an environmentally benign and sustainable manner. Although much has been written about the staggering potential of genetically modified (GM) crops, achievements to date have been relatively modest, as the technology itself is still in its infancy. This gap between the hyperbole and the reality of the relatively crude first-generation 'input trait' GM crops, perceived by many to offer benefits only to seed companies and farmers, has prompted several commentators and pressure groups to deem the technology a failure. Progress towards second-generation 'output trait' products with nutritional, environmental or other benefits that consumers can appreciate directly has been slow, and will continue to be so until the bottleneck of developing technologies for the co-ordinated manipulation of multiple genes or traits has been removed. This bottleneck is perhaps not widely appreciated, but is amply evidenced by the huge body of literature describing the manipulation or expression of single useful genes in

plants and the comparative paucity of publications dealing with the manipulation of multiple genes. Yet, the advantages of 'stacking' or 'pyramiding' existing GM traits in crops are obvious, and offer the potential for providing durable multi-toxin resistance to particular pests or for engineering multiple resistance to different types of pathogen, perhaps in crops that are also herbicide tolerant. Similarly, the potential for sophisticated metabolic engineering in plants is enormous, and could lead to the development of plants able to grow in inhospitable environments, which might provide healthier foodstuffs or improved raw materials. However, most metabolic processes that are targets for manipulation depend on the interaction between numerous genes, and flux through biochemical pathways is often co-ordinated with that of competing pathways; therefore, effective metabolic engineering will only be achieved by controlling multiple genes on the same, or interconnected, pathways. For example, although three carotenoid biosynthesis genes have been successfully engineered into 'Golden rice' to allow it to produce provitamin A (Ye *et al.*, 2000), efficient provitamin A absorption may require the resorbable iron content to be enhanced, potentially requiring the introduction of another three genes. Similarly, it is estimated that the production of reasonable levels of a really durable biodegradable plastic [a copolymer of polyhydroxybutyrate (PHB) and polyhydroxyvalerate] in crops would require the introduction of four to six genes and

Co-transformation with multiple transgenes

Co-transformation has been proven to be one of the most promising approaches taken to date for the introduction of multiple genes into plants. This strategy is quick and can be used in a variety of species and with both direct (e.g. biolistics) and indirect (*Agrobacterium*-mediated) transformation methods. The methodology is simple, even when using *Agrobacterium* – multiple transgenes, either harboured within different T-DNAs in a single *Agrobacterium* strain or harboured separately within different strains, are merely inoculated together on to plant tissues. A major advantage of co-transformation is that the co-introduced transgenes tend to co-integrate at the same chromosomal position in a high proportion of transgenics. This ensures that 'effect' genes are unlikely to segregate apart in subsequent generations. Conversely, linkage with the selectable marker gene may not be desirable, and many groups have explored the value of unlinked insertions to allow the subsequent generation of marker-free transgenic plants by segregating out the marker gene (e.g. see Komari *et al.*, 1996). Several studies have examined how transformation conditions might be manipulated to promote co-transformation and/or co-integration. For example, one tobacco study using two T-DNAs recorded co-transformation frequencies as high as 100%, with 40%–50% of lines showing the capacity for segregational separation (McCormac *et al.*, 2001). The strategy therefore has obvious advantages as a one-step procedure for the introduction of multiple 'effect' genes into plants. Alternatively, as a marker removal system, co-transformation is considered to be one of the more viable current methodologies, but potentially a labour-intensive one as a result of the increased numbers of transformation events that have to be handled in order to find lines suitable for marker gene elimination (König, 2003).

Several examples of deregulated products have used biolistic co-transformation as a means of stacking herbicide tolerance and insect resistance in maize (see Table 1). However, the most spectacular examples of the co-transformation strategy come from projects that are as yet at the research stage, such as the engineering of 'Golden rice'. Using *Agrobacterium*-mediated co-transformation, two T-DNAs, each harbouring two genes (one bacterial gene, two daffodil genes and a selectable marker gene), were introduced into rice, enabling the endosperm to express a carotenoid biosynthetic pathway and produce β -carotene (provitamin A) (Ye *et al.*, 2000). The production of this vitamin A precursor in rice endosperm could potentially help to alleviate vitamin A deficiency in certain regions of the world where rice is a staple. Subsequent work has introduced the 'Golden rice' trait

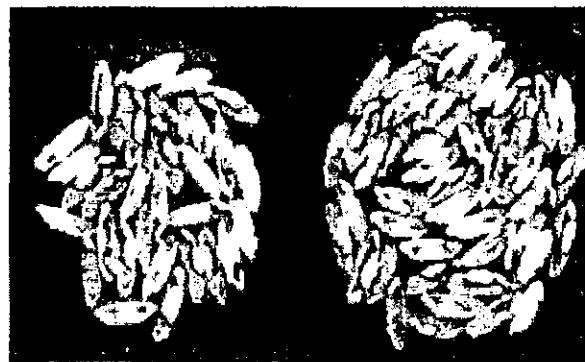


Figure 4 Co-transformation of multiple genes for carotenoid biosynthesis to produce 'Golden rice'. Polished grains from transgenic indica rice cultivar IR64 showing the white endosperm of wild-type plants (left) and yellow endosperm of transgenic plants (right). Reproduced from Datta *et al.* (2003) (figure 5a), with kind permission of Blackwell Publishing.

into commercially important *indica* and *japonica* rice varieties that are amenable to deregulation (Datta *et al.*, 2003; Hoa *et al.*, 2003; see Figure 4). Co-transformation, this time via particle bombardment, has also been used to simultaneously introduce three insecticidal genes (the Bt genes *cry1Ac* and *cry2A*, and the snowdrop lectin gene *gna*) into *indica* rice (Macbool *et al.*, 2001). Transgenic plants containing all three genes showed significant levels of protection against three of the most important insect pests of rice, rice leaf folder (*Cnaphalocrocis medinalis*), yellow stemborer (*Scirpophaga incertulas*) and brown planthopper (*Nilaparvata lugens*). In *Arabidopsis*, six genes (including two selectable marker genes), co-transformed on two T-DNAs, enabled the production of a biodegradable plastic copolymer in leaf plastids (Slater *et al.*, 1999). In order to produce the copolymer, the availability of metabolic precursors had to be increased by redirecting intermediates (acetyl-CoA and threonine) from fatty acid and amino acid biosynthesis. Nevertheless, the yields of copolymer were very low, and further metabolic engineering will be necessary if sufficient levels of a durable copolymer are to be produced to allow commercial exploitation.

Co-transformation has also been used for sophisticated metabolic engineering of several plant pathways in which the simultaneous introduction of both protein-expressing and gene-suppressing transgenes has been necessary. On the lignin biosynthetic pathway, for example, suppression of certain genes can reduce the lignin content, whilst the over-expression or suppression of other genes alters lignin composition (see Baucher *et al.*, 2003 or Halpin, 2004 for a review). Both types of change can potentially facilitate the ease of wood pulping for paper production. A recent study combined both strategies, using *Agrobacterium*-mediated co-transformation of aspen