

Señor Director

División de Nuevas Creaciones

Superintendencia de Industria y Comercio

Ministerio de Comercio, Industria y Turismo

E.

S.

D.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-125763- -00007-0000

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-125763- -00007-0000

Fecha: 2012-12-07 15:41:43 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 523 RESPUESTA Folios: 23

Re.: Expediente **No. 08 125763**

Solicitud de Patente de invención para: **“PLANTA Y SEMILLA DE MAIZ
CORRESPONDIENTES AL EVENTO TRANSGENICO MON89034 Y METODOS
PARA SU DETECCION Y USO”**

Solicitante: **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**

RESPUESTA AL EXAMEN DE FONDO

Yo, **Margarita Castellanos Abondano**, identificada como aparece al pie de mi firma, atentamente me permito presentar respuesta al oficio **No.13052** notificado por fijación en lista del 27 de julio de 2012, estando dentro del término de la prórroga solicitada el 18 de octubre de 2012, en los siguientes términos:

De la solicitud de patente

Su Despacho concluye que el pliego reivindicatorio de la presente solicitud de patente no cumple con las disposiciones de los artículos 28 y 30 de la Decisión 486. El Examinador señala lo siguiente:

- “Definición del evento MON89304, 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 los 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”.
- “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 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”.
- “El par de moléculas de ADN reclamadas en la reivindicación 17 debe ser definido a partir de su secuencia”.
- “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”.
- Asimismo, el Examinador señala que 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, los cuales no son considerados patentables de acuerdo con la legislación vigente.

Con el fin de atender las observaciones formuladas a este respecto, y de acuerdo con el artículo 34 de la Decisión 486, se presenta un nuevo capítulo reivindicatorio conformado por 23 reivindicaciones como sustituto del anteriormente presentado. De tal manera que, las objeciones formuladas a este respecto se deben tener por superadas de la siguiente manera:

- En este nuevo capítulo reivindicatorio, no han sido incluidas las reivindicaciones 4-10, 12-13, 15-16 y 33 (y sus dependientes) y por lo tanto, las objeciones formuladas a este respecto se deben tener por

superadas.

- De otro lado, la reivindicación 14 ha sido redactada nuevamente incluyendo el paso de a) transformar una célula de de la planta, el cual es un paso esencial en el proceso reivindicado que requiere de la intervención humana. Esta etapa del proceso es esencial para lograr el objetivo del mismo y requiere de la intervención humana por lo que no se trata de un proceso esencialmente biológico y no está excluido de patentabilidad. De modo que, la objeción formulada a este respecto también se debe tener por superada.
- Con respecto a la descripción de la presente solicitud, se aclara a su Despacho que el Ejemplo 1 describe claramente el evento MON89034 y que el depósito de semillas provee una definición adicional del mismo. En efecto, en la Figura 1 se muestra que el ADN del inserto del transgen comprende Cry1A.105 y Cry2Ab y en la página 27, línea 27 a la página 28, línea 8 (de la solicitud PCT publicada) se divulga que Cry1A.105 se encuentra en las posiciones 3244 a 6777, y que Cry2Ab se encuentra en las posiciones 8893 a 10800 de la SEQ ID N°: 5. Además notamos que la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°: 5 está en el Listado de secuencias. Por ello, en vista de la Descripción, el Listado de secuencias y las figuras, una persona versada comprendería claramente la invención definida por el evento MON89034.
- En relación con la reivindicación 11, vale la pena resaltar que una persona versada en el arte claramente sabría cómo preparar una composición derivada de una planta que comprenda el evento MON89034. Lo anterior, teniendo en cuenta que en la Descripción se describe la composición reivindicada y los productos comerciales indicados comenzando en la página 8, línea 18 de la Solicitud PCT publicada. Teniendo en cuenta la anterior aclaración, es claro que la objeción formulada a este respecto se debe tener por superada.
- Además, mi representada desea poner de presente que el evento MON89034 da como resultado un menor daño y por consiguiente un mayor

rendimiento en las plantas de las cuales derivan los productos comerciales. Dicho aumento en el rendimiento incrementa inherentemente la cantidad de semillas (granos) producidas y por consiguiente la cantidad de productos comerciales que se pueden producir por unidad de tierra. Asimismo, dicho aumento tiene múltiples beneficios, incluyendo la capacidad para alimentar a un mayor número de personas o animales en una cantidad igual o menor de tierra cultivable, lo cual disminuye a su vez el costo del producto comercial así como el impacto sobre el medio ambiente. Por ello, el aumento en el rendimiento debido a la presencia del evento produce numerosos efectos beneficiosos.

- De otro lado, la reivindicación 1 ha sido redactada nuevamente para indicar que la molécula de ADN comprende las SEQ ID N°: 1 ó 2 y Cry1A.105 o Cry2Ab. De esta manera la molécula de ADN queda definida por sus elementos, de conformidad con las sugerencias del Señor Examinador.
- Con respecto a la objeción formulada a la reivindicación 17 en relación con los pares de cebadores o sondas por no ser clara la expresión: "las moléculas de ADN son de una longitud suficiente de nucleótidos contiguos de la SEQ ID N°: 3 o de la SEQ ID N°:5", se pone de presente que las reivindicaciones se han modificado para indicar que la primera y segunda moléculas de ADN "comprenden al menos 20" nucleótidos contiguos. Cabe señalar que un especialista en el arte comprendería claramente el alcance de las moléculas de cebadores y sondas reivindicadas, ya que la identificación y el diseño de moléculas de cebadores y sondas es bien conocido en general en el arte. De modo que, la objeción formulada a este respecto se debe tener por superada.

Así entonces, teniendo en cuenta las anteriores aclaraciones y las modificaciones efectuadas al capítulo reivindicatorio, consideramos que las objeciones que por claridad hizo su Despacho quedan superadas ya que el nuevo capítulo reivindicatorio se encuentra redactado en los términos sugeridos por su Despacho, el mismo es ahora claro y conciso y la materia de invención reivindicada se encuentra debidamente soportada en la descripción.

Nivel inventivo

Su Despacho concluye que los documentos WO 2004/020636 (D1) y "Claire Halpin. Plant Biotechnology Journal (2005) vol.3, pp.141-155" (D2) afectan el nivel inventivo de las reivindicaciones 1-3, 13 de la presente solicitud y que el documento US2002/0102582 (D3) afecta el nivel inventivo de las reivindicaciones 17-38 de la presente solicitud. En cuanto a las objeciones del examinador deseamos poner de presente lo siguiente:

De acuerdo con el artículo 18 de la Decisión 486:

"Artículo 18.- *Se considerará que una invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica*".

Teniendo en cuenta el anterior artículo, se exponen a continuación las razones por las cuales la presente invención es inventiva frente a las enseñanzas del documento D1:

Con el fin de demostrar el nivel inventivo de la presente solicitud de patente frente a los documentos citados D1, D2 y D3, se presenta anexo al presente memorial la Declaración del Dr. James Roberts que demuestra las propiedades superiores del evento MON89034 y que la materia de invención reivindicada en la presente solicitud es novedosa e inventiva. Adicionalmente, deseamos poner de presente lo siguiente:

(1) Con respecto al rechazo de las reivindicaciones 1-3 y 13 ante D1 y D2, se pone de presente que en D1 se compara la actividad insecticida contra el gusano militar tardío entre plantas de maíz que expresan Cry1Bb, plantas de maíz que expresan Cry2Ab (MON840) y plantas de maíz que expresan una combinación de Cry1Ab (MON810) y Cry2Ab (MON840) (ver la página 45, Tabla 7).

Aparentemente, el Examinador sustenta el presente rechazo de nivel inventivo en la presunción de que los genes Cry1Ab y Cry2Ab divulgados en la referencia

citada son los mismos que los del presente evento MON89034. Sin embargo, en contraste a lo supuesto por el Examinador, el evento MON810 de maíz citado expresa Cry1Ab que en realidad es una quimera Cry1Ab/Cry1Ac, en tanto la presente invención comprende un evento de maíz que expresa ambos **Cry1A.105 (es decir, una quimera Cry1Ab/Cry1Fa)** y un gen Cry2Ab. Con mayor detalle, el componente de toxina Cry1Ab de MON810 corresponde a los dominios I y II de Cry1Ab unidos **al dominio III de Cry1Ac**, en tanto en MON89034 el componente de toxina Cry1A.105 corresponde a los dominios I y II de Cry1Ab unidos a un dominio III de Cry1Fa. Solamente hay un 44% identidad de secuencias de aminoácidos entre Cry1Ac y Cry1Fa sobre la longitud de los aproximadamente 150 aminoácidos que conforman las regiones de estas proteínas correspondientes al dominio III. Además, la proteína quimera Cry1Ab en MON810 presenta un espectro de actividad dirigido contra especies de Lepidópteros completamente diferentes en comparación con la proteína quimera Cry1A.105 en MON89034.

Dadas las diferencias entre los componentes de las toxinas de MON810 y MON89034, una persona versada en el arte no podría haber anticipado el objeto de la presente invención a partir de D1 o D2 o predecir sin experimentación alguna si estas diferencias podrían haber originado el nivel mencionado previamente de actividad diferencial entre las dos proteínas. Una persona versada en el arte hubiera esperado además que la presente combinación de un Cry1A.105 con un Cry2Ab presentara propiedades complementarias dirigidas a las múltiples especies de lepidópteros que también son el blanco de Cry2Ab. Por ello, no habría ninguna expectativa de éxito con base en las diferencias entre las moléculas divulgadas y las moléculas reivindicadas.

Además, la Cry1Bb1 divulgada es una proteína que presenta un espectro de actividad completamente diferente dirigido a las especies de lepidópteros de la presente proteína Cry1A y presenta menos que un 78% de identidad de secuencia de aminoácidos con una proteína Cry1A en la porción activa de la misma. Por consiguiente, D1 parece ser una referencia inapropiada y no debería considerarse como un documento cercano a la presente solicitud y ser materia para el nivel inventivo en este caso. De otro lado, D2 describe solamente y de manera general el apilamiento de genes usando un sólo ADN-T que comprende dos o más "genes de efectos ligados".

Contrario a la afirmación del examinador, en cuanto a que el presente evento solamente difiere de los eventos divulgados en la integración de las dos toxinas en un solo inserto en oposición a dos insertos separados, se aclara a su Despacho que la combinación de Cry1A.105 y Cry2Ab en un solo evento insertado en una ubicación específica en el genoma de maíz difiere significativamente de los eventos del estado de la técnica. Además, de las diferencias descritas previamente entre los transgenes insertados, vale la pena resaltar que en general cada evento transgénico es único y comprenden secuencias de unión únicas que son suficientes para definir y caracterizar al evento. El presente evento comprende las secuencias de unión de las SEQ ID N°: 1-4 y el inserto más la secuencia de unión de la SEQ ID N°: 5 que son nuevas y exclusivas del evento MON89034. Estas secuencias de unión definen al evento y le proporcionan a la persona versada la posibilidad de detectar específicamente el evento MON89034 particular en una muestra de maíz. Ninguno de los documentos D1 o D2, en combinación o solos, divulgan o sugieren ninguna de las secuencias de las SEQ ID N°: 1-5 y tampoco el evento MON89034 específico de la presente invención. Sin el conocimiento de ninguna de las características estructurales únicas del evento MON89034, que solamente se divulgan en la presente solicitud, una persona versada en el arte no podría llevar a la práctica las reivindicaciones de la presente invención. Por consiguiente, la presente invención divulga, por primera vez, una planta de maíz que tiene la combinación única de las dos proteínas de toxina insertadas en una ubicación específica en el genoma de maíz y **los efectos superiores de esta combinación particular de proteínas** en comparación con otras plantas de maíz conocidas en el arte.

Como respaldo adicional del nivel inventivo de la presente invención, la Declaración adjunta del Dr. James Roberts permite demostrar las propiedades superiores del evento MON89034. Tal como se muestra en la Tabla 2 de dicha Declaración, el evento MON89034 (identificado como el evento "49434") sorprendentemente aumentó la expresión de Cry2Ab en las plantas de maíz durante todo el desarrollo y en la etapa madura. De hecho, en comparación con los otros 10 eventos, MON89034 presentaba una expresión mejorada en todos los tiempos y en todos los tipos de tejido. El evento MON89034 se seleccionó entre una gran cantidad de eventos de inserción basados en estudios a campo, que incluyeron estudios de rendimiento y bioensayos. Se demostró que este evento particular tiene un mayor

rendimiento, un control de plagas más eficaz y un menor aporte por parte del granjero. Tal como se indicó previamente, una persona normalmente versada en el arte no hubiera tenido la capacidad o se hubiera visto motivada a producir el evento específico a partir de las enseñanzas de D1 y D2 y sin el conocimiento en retrospectiva que solamente puede encontrar en la presente solicitud. No obstante, los datos demuestran claramente que el evento MON89034 confiere un incremento significativo e inesperado en la expresión de la proteína Cry2Ab y por lo tanto, es claro que la presente invención es inventiva frente a las enseñanzas del estado de la técnica.

Adicionalmente, el sitio de integración particular de la presente invención no resulta evidente con base en las enseñanzas de las referencias citadas toda vez que de los cientos de millones de sitios de integración teóricos, una persona versada en la materia tendría una oportunidad limitada de obtener el evento particular de la presente invención. Este evento de transformación, reconocido únicamente por las SEQ ID N°: 1 y 2, indicadas en el nuevo pliego reivindicatorio de la presente solicitud, además del inserto de ADN reivindicado que codifica Cry2Ab y Cry1A.105, representa una proporción muy pequeña de la composición genética total de la planta. Por ejemplo, en el presente evento de transformación, el segmento de ADN introducido comprende aproximadamente 5 kb introducidos en **una sola ubicación en un único cromosoma**. Por otro lado, el genoma completo de maíz, contiene **más de 2,5 mil millones de pares de bases en 20 pares de cromosomas**. Aun suponiendo que tan solo un 10% del genoma es adecuado para una inserción transgénica, que sería una estimación conservadora, aún habría solamente una probabilidad de **1 en 250 millones** de obtener el evento reivindicado.

Según se describe en la página 4, líneas 9-32 de la solicitud PCT publicada, no hay certeza de éxito de identificar un único evento transgénico que proporcione los niveles de expresión óptimos de diferentes agentes tóxicos y que no presente ninguna deficiencia agronómica indeseada. Por ejemplo, la expresión de genes extraños en plantas es afectada por su posición cromosómica o por la proximidad de elementos reguladores de la transcripción cercanos al sitio de integración. También puede haber diferencias en los patrones de expresión espaciales o temporales, por ejemplo, diferencias en la expresión relativa de un transgen en diversos tejidos vegetales, que pueden no corresponder a los patrones esperados a partir de los

elementos reguladores de la transcripción presentes en la construcción genética introducida.

De lo anterior, es claro que una persona versada en la materia no se vería motivada a obtener el evento específico de la presente invención teniendo en cuenta las enseñanzas del estado de la técnica, tales como D1 y D2.

Con respecto a la falta de nivel inventivo de las reivindicaciones 17-38 frente a D3 debido a que dicho documento divulga un método de detección que comprende el uso de secuencias de unión, se aclara a su Despacho que dicho documento D3 está dirigido al evento MON810, el cual, como es reconocido en la acción oficial, comprende un inserto diferente del inserto del presente evento y en una ubicación diferente, ya que por definición comprende secuencias de unión completamente diferentes de las del evento reivindicado. Tal como se indicó previamente, las secuencias de unión de las SEQ ID N°: 1-4 y el inserto más la secuencia de unión de la SEQ ID N°: 5, son exclusivas del evento MON89034. La novedad y el nivel inventivo de la presente invención no reside en los métodos generales para la detección del evento, sino en la detección **del evento MON89034 específico** el cual, como se describió previamente, proporciona resultados inesperados y superiores, y claramente es novedoso e inventivo. Además, sin un conocimiento en retrospectiva una persona versada en el arte no hubiera tenido posibilidad de conocer la ubicación del inserto en el genoma para así diseñar los cebadores y las sondas reivindicadas y poder poner en práctica los métodos de detección y el método para determinar la cigosidad reivindicados.

En consecuencia, la invención reclamada en el nuevo pliego reivindicatorio se debe tener como inventiva frente a las enseñanzas de los documentos D1, D2 y D3, por cuanto todas las características técnicas de la presente invención no se encuentran anticipadas por dichos documentos, dichos documentos por si solos o combinados no enseñan ni sugieren en conjunto todas las características técnicas esenciales de la materia de invención acá reivindicada y por lo tanto, es claro que una persona versada en la materia no derivaría de manera obvia u evidente la presente invención a partir de las enseñanzas de dichos documentos.

Concesión de una solicitud foránea:

Debido a que la concesión de una solicitud de patente en otros países, equivalente a la solicitud Colombiana, constituye un antecedente favorable para el estudio de patentabilidad, respetuosamente solicitamos tener en cuenta que la presente invención ha sido otorgada en El Salvador y en Sudáfrica.

Dado que la presente solicitud cumple con las disposiciones de los artículos 28, 30 y 18 de la Decisión 486, respetuosamente solicito a ese Despacho que se proceda con la concesión de la presente solicitud.

Anexos

Nuevo capítulo reivindicatorio conformado por 23 reivindicaciones.

Recibo por \$390.000 por concepto de 13 reivindicaciones adicionales a la décima reivindicación.

Declaración Dr. J Robert junto con su traducción a español.

Señor Director,



Margarita Castellanos Abondano

C.C. No. 39.779.654 de Usaquén

T.P.A. No. 79.810 del C.S.J.

Calle 94 A No. 7 A-09 – Bogotá

Teléfono: 7560770

Bogotá, D.C.

7 DIC. 2012

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



RECIBO DE CAJA

No. 12 - 133749

Bogotá D.C., Diciembre 03 de 2012 - 16:04:55

RECIBIDO DE : CASTELLANOS Y Y CO NI 800.174.641

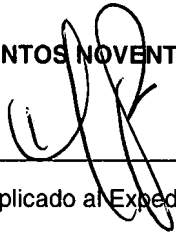
*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	325136696	03/12/2012	6.231.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
13	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	390.000.00
				\$390.000.00

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

Responsable: 
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 08-125763- -00007-0000
2012-12-07 15:41:43 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 08-125763- -00007-0000
Fecha: 2012-12-07 15:41:43 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 23

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ADN CARACTERIZADA PORQUE comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2, y Cry1A o Cry2Ab o un complemento de la misma.

2. La molécula de ADN de la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 o un complemento de la misma.

3. La molécula de ADN de la reivindicación 2, CARACTERIZADA PORQUE consiste esencialmente en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:5 o un complemento de la misma.

4. Una composición derivada de la planta de maíz transgénico, o partes de la misma, que comprende la molécula de ADN de la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE dicha composición comprende una cantidad detectable de dicha molécula de ADN, y donde dicha composición es un producto básico que se selecciona entre el grupo que consiste en harina gruesa de maíz, aceite de maíz, torta de maíz [*subproducto de la extracción de aceite*], semilla de maíz, germen de maíz, almidón de maíz, harina de maíz, polen de maíz, barbas de maíz, licor de maíz fermentado, malta de maíz, azúcar de maíz, jarabe de maíz, margarina producida a partir de aceite de maíz, granos secos de destilería (DDGS, por "Distillers Dry Goods Solids"), cosméticos y agentes de carga.

5. Un método para producir una planta de maíz resistente a los insectos, CARACTERIZADO PORQUE comprende

(a) transformar una célula de la planta de maíz con la molécula de ADN de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; y

(b) regenerar una planta de maíz a partir de dicha célula transformada, donde dicha planta de maíz comprende dicha molécula de ADN y es resistente a los insectos.

6. Un par de moléculas de ADN CARACTERIZADO PORQUE comprende:

una primera molécula de ADN y una segunda molécula de ADN, donde las moléculas de ADN comprenden al menos 20 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO: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.

7. El par de moléculas de ADN de la reivindicación 6, CARACTERIZADO PORQUE dicha primera molécula de ADN comprende 11 o más nucleótidos contiguos de cualquier porción de la región del transgen de la SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5, o un complemento de la misma, y dicha segunda molécula de ADN comprende una longitud similar de una región flanqueadora 5' del ADN genómico del maíz de la SEQ ID NO:3, o un complemento de la misma.

8. El par de moléculas de ADN de la reivindicación 7, CARACTERIZADO PORQUE dicha primera molécula de ADN comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos complementarios a la porción del ADN heterólogo inserto de la SEQ ID NO:5, y donde dicha segunda molécula de ADN comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos a la porción del genoma de maíz de la SEQ ID NO:3.

9. El par de moléculas de ADN de la reivindicación 7, CARACTERIZADO PORQUE dicha primera molécula de ADN hibridiza específicamente a la SEQ ID NO:5 aproximadamente desde la posición 2060 del nucleótido hasta aproximadamente la posición 12.208 del nucleótido, y donde dicha segunda molécula de ADN se hibridiza específicamente con la secuencia complementaria inversa correspondiente a la SEQ ID NO:3 aproximadamente desde la posición 1 del nucleótido hasta aproximadamente la posición 2050.

10. Un par de moléculas de ADN CARACTERIZADO PORQUE 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 ID NO:4 o SEQ ID NO:5 o su complemento, suficiente como para funcionar como ADN cebadores o sondas diagnóstico del ADN que se extrae de la planta de maíz MON89034 o progenie de la misma.

11. El par de moléculas de ADN de la reivindicación 10, CARACTERIZADO PORQUE dicha primera molécula de ADN comprende 11 o más nucleótidos contiguos de cualquier porción de la región del transgen de la SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:5, o un complemento de la misma, y dicha segunda molécula de ADN comprende una longitud similar de una región flanqueadora 3' del ADN genómico de maíz de la SEQ ID NO:4, o un complemento de la misma.

12. El par de moléculas de ADN de la reivindicación 11, CARACTERIZADO PORQUE dicha primera molécula de ADN comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos a la porción del ADN heterólogo inserto de la SEQ ID NO:5, y donde dicha segunda molécula de ADN comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos complementaria a la porción del genoma de maíz de la SEQ ID NO:4.

13. El par de moléculas de ADN de la reivindicación 11, CARACTERIZADO PORQUE dicha primera molécula de ADN hibridiza específicamente a la secuencia complementaria inversa correspondiente a la SEQ ID NO:5 aproximadamente desde la posición 1 del nucleótido hasta aproximadamente la posición 11305, y donde dicha segunda molécula de ADN hibridiza específicamente a la SEQ ID NO:4 aproximadamente desde la posición del nucleótido 21 hasta aproximadamente la posición 914 del nucleótido.

14. El par de moléculas de ADN de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 13, CARACTERIZADO PORQUE dicha primera molécula de ADN comprende a la SEQ ID NO:6 y dicha segunda molécula de ADN comprende a la SEQ ID NO:7.

15. Un método para detectar la presencia de una molécula de ADN CARACTERIZADO PORQUE se selecciona entre el grupo que consiste en SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, y SEQ ID NO:5 en una muestra biológica, donde el método comprende:

(a) poner en contacto dicha muestra biológica con un par de cebadores de ADN que comprende moléculas de ADN con una longitud de nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:3 o su complemento, SEQ ID NO:4 o su complemento, SEQ ID NO:5 o su complemento, suficiente como para que puedan funcionar como ADN cebadores o sondas diagnóstico del ADN que se extrae de la planta de

maíz MON89034 o progenie de la misma;

- (b) proveer condiciones de reacción de amplificación de ácido nucleico;
- (c) llevar a cabo dicha reacción de amplificación de ácido nucleico, produciendo de esa manera un amplicon de molécula de ADN; y
- (d) detectar dicho amplicon de molécula de ADN, donde la detección de un amplicon que comprende por lo menos una de la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 y complementos de las mismas es un indicador de la presencia de dicha molécula de ADN en dicha muestra biológica.

16. El método de la reivindicación 15, CARACTERIZADO PORQUE dicha muestra biológica es una muestra de ADN que se extrae de una planta de maíz.

17. Un método para detectar la presencia de una molécula de ADN CARACTERIZADO PORQUE se selecciona entre el grupo que consiste en SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:5 en una muestra biológica, donde el método comprende:

- (a) poner en contacto dicha muestra biológica con una sonda de ADN que se hibridiza en condiciones severas con dicha molécula de ADN, y no se hibridiza en las condiciones severas con una muestra biológica que no contiene dicha molécula de ADN;
- (b) someter a dicha muestra biológica y sonda de ADN a condiciones de hibridización severas; y
- (c) detectar la hibridización de dicha sonda de ADN en dicha muestra biológica, donde la detección de la hibridización es un indicador de la presencia de dicha molécula de ADN en dicha muestra biológica.

18. El método de la reivindicación 17, CARACTERIZADO PORQUE dicha muestra biológica es una muestra de ADN que se extrae de una planta de maíz.

19. El método de la reivindicación 17 o 18, CARACTERIZADO PORQUE dicha sonda de ADN comprende a la SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2 o a un complemento de la misma.

20. El método de las reivindicaciones 17 a 19, CARACTERIZADO PORQUE

dicha sonda de ADN se marca con por lo menos un fluoróforo.

21. El método de la reivindicación 15 ó 17, CARACTERIZADO PORQUE dicha muestra biológica se selecciona entre el grupo que consiste en harina gruesa de maíz, aceite de maíz, torta de maíz [*subproducto de la extracción de aceite*], semilla de maíz, germen de maíz, almidón de maíz, harina de maíz, polen de maíz, barbas de maíz, licor de maíz fermentado, malta de maíz, azúcar de maíz, jarabe de maíz, margarina producida a partir de aceite de maíz, granos secos de destilería (DDGS, por "Distillers Dry Goods Solids"), cosméticos y agente de carga.

22. Un método para determinar la cigosidad del ADN de una planta de maíz CARACTERIZADO PORQUE comprende al evento MON89034 de maíz en una muestra biológica que comprende:

(a) poner en contacto dicha muestra con un primer conjunto que comprende a la SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, y SEQ ID NO:10, que (1) cuando se utiliza en una reacción de amplificación de ácido nucleico que comprende ADN del evento MON89034 de maíz, produce un primer amplicon que es diagnóstico del evento MON89034 de maíz, y (2) cuando se utiliza en una reacción de amplificación de ácido nucleico que comprende ADN genómico de maíz diferente del ADN de MON89034, produce un segundo amplicon que es diagnóstico del ADN genómico de maíz diferente del ADN de MON89034;

(b) llevar a cabo una reacción de amplificación de ácido nucleico; y

(c) detectar los amplicones que se producen de dicha manera, donde la detección de la presencia de ambos amplicones indica que dicha muestra es heterocigota para el ADN del evento MON89034 de maíz, donde la detección de solo el primer amplicon indica que dicha muestra es homocigota para el ADN del evento MON89034 de maíz.

23. El método de la reivindicación 22, CARACTERIZADO PORQUE dicho primer conjunto se utiliza además junto con las SEQ ID NO:14 y SEQ ID NO:15.

Roberts Declaration

Mon89034 selection

An Important characteristic of the MON89034 transgenic event is the unique pattern of expression of the two insect control genes. It is critical that the two Bt genes are expressed in the appropriate tissues and at the correct stage in plant development. It is common to observe the decline in expression of a transgene as the plant ages thus it is critical to check expression at several developmental stages. The expression of the transgenes have been monitored by two mean; directly measuring the amount of the novel protein originating from the transgenes and by testing how well protected the plant is to damage by the target insect pest.

In order to select a transgenic corn plant that expressed two different Bt genes in the correct tissue and in amounts that are sufficient to control insect pests we tested plants by infesting with, *Diatraea saccharalis*, a commercially important pest of corn. Four plants for each treatment were grown to the same developmental stage in a controlled environment growth chamber. Twelve different transgenic events that contained the same two transgenes in different chromosomal locations were compared with non- transgenic corn plants and corn plants containing the currently commercially available transgene, Mon810. All plants were infested with 50 neonate larva and after 21 days the corn plants were assessed for feeding damage by spiting the corn stalk and measuring the length of the tunnel created by the *Diatraea saccharalis* larva. The average length of tunnel created by *Diatraea saccharalis* is displayed in the graph below. Many transgenic events sustained significant damage from infestation by *Diatraea saccharalis* as measured by the length of the tunnel created by the larva. Plants containing the Mon89034 (49434) transgene showed the least amount of damage from *Diatraea saccharalis*. The MON89034 event also gave the most consistent protection from feeding by *Diatraea saccharalis* as all four plants tested showed very little damage, while other transgenic event gave rise to plant with more variable levels of damage as illustrated by the larger error bars. (See figure 1)

The amount of protein produced by a transgenic plant was by determined with standard ELISA assays (Enzyme-linked immunosorbent assay). For each transgenic event eight plants were sampled at each developmental time and both leaf and root were sampled at both developmental times. Expression in roots was tested at the V2 stage. Each value listed on table 1 is an average of three ELISA assays per plant, with eight plants per event. The level of cry2Ab protein is expressed as parts per million of fresh weight of plant tissue. From table 1 it is clear that MON89034 (event 49434) expressed cry2B at higher levels than transgenic events generated with the same transgenes. In addition to expressing higher amounts of cry2Ab it retained higher levels of expression as the plant aged.

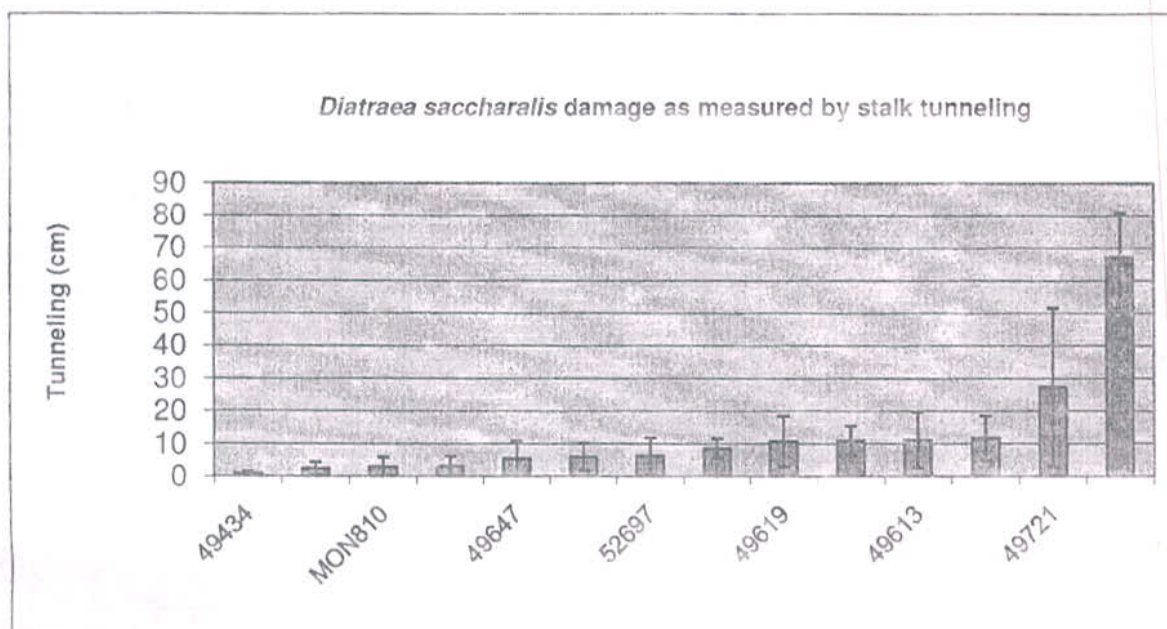


Figure 1 Damage to corn plants as measured by length of stalk tunneling by *Diatraea saccharalis*

	2Ab	2Ab	2Ab	2Ab	2Ab
Event	V2 Leaf	V8 Leaf	V2 Stalk	V2 Root	V8 Stalk
49434	423.37	110.95	129.08	71.83	31.51
49597	86.01	25.89	51.18	25.36	16.04
49613	80.49	23.55	69.79	27.30	9.18
49619	54.16	25.12	34.81	14.67	18.89
49623	53.83	20.77	38.76	16.31	14.56
49647	55.41	36.32	40.46	20.31	11.94
49721	80.39	31.84	90.88	23.50	22.47
50270	27.07	19.66	36.40	12.48	10.96
52662	46.33	32.54	50.76	19.65	21.84
52697	137.81	65.45	93.19	23.83	15.33
52971	72.63	63.12	98.61	60.03	20.17

Table 2 Level of cry2Ab expression in corn plants from different transgenic events. Levels of the Bt protein were determined by ELSIA assays on 8 independent plants form each event, at two different developmental time, Vegetative Stage 2 and Vegetative stage 8 and three different tissue types, leaves roots and stalks.

Compared to other transgenic insertion events generated from the same transgenes, MON89034 showed unusually good control of *Diatraea saccharalis*, and the expression of cry2Ab was maintained during the growth and development of the plant.

TRADUCCION DE LA DECLARACION DEL DR. JAMES ROBERT'S

Selección de Mon89034

Una característica importante del evento transgénico MON89034 es el patrón de expresión único de los dos genes que permiten controlar los insectos. Es fundamental que los dos genes de Bt se expresen en los tejidos apropiados y en la etapa correcta del desarrollo de la planta. Resulta común observar la declinación de la expresión de un transgen a medida que envejece la planta, por lo que es crítico verificar la expresión en diversas etapas del desarrollo. La expresión de los transgenes se monitoreó por dos medios: a través de una medición directa de la cantidad de proteínas novedosas originadas en los transgenes y mediante la evaluación del grado de protección de la planta contra los daños provocados por el insecto plaga blanco.

Con el propósito de seleccionar una planta de maíz transgénica donde se expresaran dos genes de Bt diferentes en el tejido correcto y en cantidades suficientes para controlar los insectos plaga, se evaluaron las plantas infestándolas con *Diatraea saccharalis*, una plaga del maíz que es relevante desde el punto de vista comercial. Se cultivaron cuatro plantas de cada tratamiento hasta la misma etapa del desarrollo en una recámara de cultivo con un ambiente controlado. Se compararon doce eventos transgénicos diferentes que contenían los mismos dos transgenes en distintas localizaciones en los cromosomas, entre plantas de maíz no transgénicas y plantas de maíz que contenían un transgen disponible comercialmente en la actualidad, Mon810. Todas las plantas se infestaron con 50 larvas neonatas, y después de 21 días, se evaluó el daño provocado por la alimentación de los insectos sobre ellas tomando muestras del tallo y midiendo la longitud de los túneles creados por las larvas de *Diatraea*

saccharalis. En el gráfico más adelante se representa la longitud promedio de los túneles creados por *Diatraea saccharalis*. A partir de las mediciones de la longitud de los túneles creados por las larvas, puede establecerse que muchos eventos transgénicos sufrieron daños significativos debido a la infestación de *Diatraea saccharalis*. Las plantas que contenían el transgen Mon89034 (49434) presentaron la menor cantidad de daños debidos a *Diatraea saccharalis*. El evento MON89034 también brindó la protección más consistente contra la alimentación por *Diatraea saccharalis*: las cuatro plantas tratadas presentaron muy pocos daños, mientras que otros eventos transgénicos dieron lugar a plantas con niveles de daño más variables, como lo reflejan las mayores barras de error (véase la figura 1).

La cantidad de proteínas producidas por las plantas transgénicas se determinó con ensayos de ELISA (ensayos inmunsorbentes ligados a enzimas) convencionales. Para cada evento transgénico, se tomaron muestras de las hojas y las raíces de ocho plantas en ambas etapas del desarrollo. La expresión en las raíces se evaluó en la etapa V2. Cada uno de los valores que se detalla en la tabla 1 es un promedio de tres ensayos de ELISA por planta, con ocho plantas por evento. El nivel de la proteína cry2Ab se expresa en partes por millón, con relación al peso fresco del tejido vegetal. Cuando se observa la tabla 1, resulta evidente que, a partir de MON89034 (el evento 49434), cry2B se expresó en niveles mayores que a partir de los otros eventos transgénicos que se generaron con los mismos transgenes. Además de la expresión de mayores cantidades de cry2Ab, se retuvieron mayores niveles de expresión a medida que envejeció la planta.

Daño provocado por *Diatraea saccharalis*, determinado a partir de la longitud de los túneles en los tallos

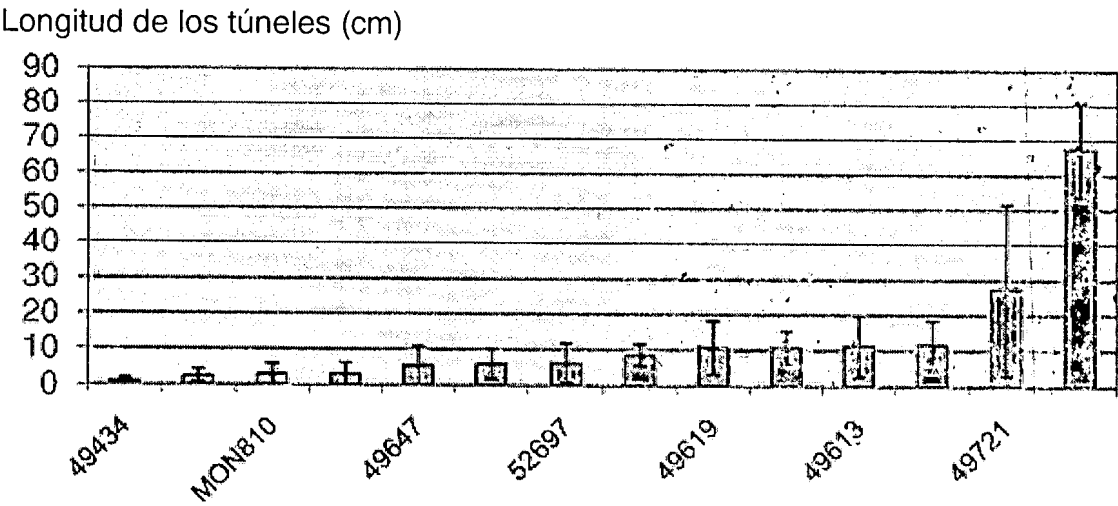


Figura 1. Daño en las plantas de maíz, determinado a partir de la longitud de los túneles cavados por *Diatraea saccharalis* en los tallos

Evento	2Ab	2Ab	2Ab	2Ab	2Ab
	Hoja V2	Hoja V8	Tallo V2	Raíz V2	Tallo V8
49434	423.37	110.95	129.08	71.83	31.51
49597	86.01	25.89	51.18	25.36	16.04
49613	80.49	23.55	69.79	27.30	9.18
49619	54.16	25.12	34.81	14.67	18.89
49623	53.83	20.77	38.76	16.31	14.56
49647	55.41	36.32	40.46	20.31	11.94
49721	80.39	31.84	90.88	23.50	22.47
50270	27.07	19.66	36.40	12.48	10.96
52662	46.33	32.54	50.76	19.65	21.84
52697	137.81	65.45	93.19	23.83	15.33
52971	72.63	63.12	98.61	60.03	20.17

Tabla 2. Nivel de expresión de cry2Ab en plantas de maíz de distintos eventos transgénicos. Los niveles de las proteínas de Bt se determinaron con ensayos de ELISA en 8 plantas independientes de cada evento, en dos etapas diferentes del

desarrollo, la etapa vegetativa 2 y la etapa vegetativa 8, y en tres tipos de tejidos diferentes, las hojas, las raíces y los tallos.

En comparación con otros eventos transgénicos de inserción generados a partir de los mismos transgenes, MON89034 presentó un control inusualmente bueno de *Diatraea saccharalis*, y la expresión de cry2Ab se mantuvo durante el crecimiento y el desarrollo de la planta.