

REIVINDICACIONES

1. Una enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N: 68, SEQ ID N: 145, SEQ ID N: 148, SEQ ID N: 150, SEQ ID N: 152, SEQ ID N: 154, SEQ ID N: 156, SEQ ID N: 158, SEQ ID N: 160, SEQ ID N: 162, SEQ ID N: 164, SEQ ID N: 166, y SEQ ID N: 168.

2. Una molécula de ácido nucleico que codifica una enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), en donde la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre el grupo formado por SEQ ID NO:147, SEQ ID N: 149, SEQ ID N: 151, SEQ ID N: 153, SEQ ID N: 155, SEQ ID N: 157, SEQ ID N: 159, SEQ ID N: 161, SEQ ID N: 163, SEQ ID N: 165, SEQ ID N: 167 y SEQ ID N: 169.

3. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la molécula es un vector plásmido.

4. El vector plásmido de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende además una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido heterólogo.

5. El vector de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la secuencia nucleotídica está operativamente unida a un promotor.

6. Una línea celular vegetal que contiene la enzima EPSPS de acuerdo con la reivindicación 1 como una molécula heteróloga.

7. El vector de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el promotor es el promotor *Arabidopsis thaliana* Ubiquitina-10 (AtUbi10).

8. La línea celular vegetal de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la línea celular vegetal es tolerante al glifosato, cuando se compara a una línea celular vegetal de la misma especie que no comprende la molécula de ácido nucleico.

9. Un método para generar a planta transgénica, parte de planta, órgano de planta, semilla de planta o célula de planta resistente a glifosato, en donde el método comprende:

transformar la planta, la parte de planta, órgano de planta, semilla de planta o célula de planta con la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 2; y

producir la enzima EPSPS.

10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la planta transformada, parte de planta, órgano de planta, semilla de planta o célula de planta es resistente al glifosato.

11. Un método para controlar semillas en un área bajo cultivo que contiene plantas resistentes a herbicida, en donde el método comprende:

incorporar la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1 como un ácido nucleico heterólogo en una planta o una semilla de planta.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el herbicida es glifosato.

13. El método de acuerdo con la reivindicación 11, el método que comprende además incorporar un segundo ácido nucleico que codifica un polipéptido heterólogo, en donde el segundo ácido nucleico comprende *aad-1* o *aad-12*.

14. Un método para conferir Resistencia a un herbicida en una planta, en donde el método comprende:

incorporar el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 2 en una planta, en donde la secuencia nucleotídica está operativamente unido a un promotor;

y

producir la enzima EPSPS.

15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el herbicida es glifosato.

16. El método de acuerdo con la reivindicación 14, el método que comprende además incorporar una segunda molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido heterólogo en la planta.

17. El método de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la segunda molécula de ácido nucleico comprende *aad-1* o *aad-12*.

18. Una línea celular vegetal que contiene la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 2 como un ácido nucleico heterólogo.



(12) **United States Patent**
Lira et al.

(10) **Patent No.:** **US 9,359,614 B2**
(45) **Date of Patent:** ***Jun. 7, 2016**

(54) **CLASS OF GLYPHOSATE RESISTANCE GENES**
C12N 15/8274 (2013.01); *C12N 15/8275* (2013.01); *C12N 15/8281* (2013.01); *C12N 15/8283* (2013.01); *C12N 15/8286* (2013.01); *C07K 2319/08* (2013.01)

(71) Applicant: **Dow AgroSciences LLC**, Indianapolis, IN (US)

(72) Inventors: **Justin M. Lira**, Zionsville, IN (US); **Robert M. Cicchillo**, Westfield, IN (US); **Satish K. Nair**, Champaign, IL (US)

(73) Assignee: **Dow AgroSciences LLC**, Indianapolis, IN (US)

(*) Notice: Subject to any disclaimer, the term of this patent is extended or adjusted under 35 U.S.C. 154(b) by 400 days.
This patent is subject to a terminal disclaimer.

(58) **Field of Classification Search**
None
See application file for complete search history.

(56) **References Cited**
U.S. PATENT DOCUMENTS
2003/0049814 A1 3/2003 Andrews et al.
2007/0289035 A1 12/2007 Vande Berg et al.
2007/0300326 A1* 12/2007 Peters *C12N 15/8275* 800/278
2009/0093366 A1* 4/2009 Wright *C12N 9/0069* 504/142

(21) Appl. No.: **13/757,544**

(22) Filed: **Feb. 1, 2013**

(65) **Prior Publication Data**
US 2013/0217577 A1 Aug. 22, 2013

Related U.S. Application Data
(60) Provisional application No. 61/593,555, filed on Feb. 1, 2012, provisional application No. 61/625,222, filed on Apr. 17, 2012.

(51) **Int. Cl.**
C12N 15/82 (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)
C12N 9/96 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)

(52) **U.S. Cl.**
CPC *C12N 15/8247* (2013.01); *C07K 14/415* (2013.01); *C12N 9/1092* (2013.01); *C12N 9/96* (2013.01); *C12N 15/8209* (2013.01); *C12N 15/8221* (2013.01); *C12N 15/8245* (2013.01);

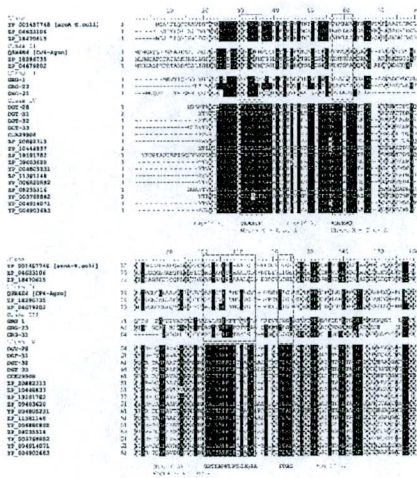
(55) **Foreign Patent Documents**
CN 101490252 7/2009
CN 101553111 10/2009
(Continued)

OTHER PUBLICATIONS
GenBank sequence CM000951.*
(Continued)

Primary Examiner — Russell Kallis
Assistant Examiner — Weihua Fan
(74) **Attorney, Agent, or Firm** — C. Philip Poirier; Magleby Cataxinos & Greenwood

(57) **ABSTRACT**
The present disclosure relates to a novel class of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) enzymes, which enzymes are identifiable both by conserved amino acid sequence motifs (primary structure) and secondary and tertiary structural elements. Also disclosed are nucleic acids useful in encoding the novel EPSPS enzymes.

32 Claims, 62 Drawing Sheets



(56)

References Cited

FOREIGN PATENT DOCUMENTS

CN	101688219	3/2010
CN	101831443	9/2010
WO	2007064828	6/2007
WO	20100781561	7/2010

OTHER PUBLICATIONS

NCBI, GenBank accession No. CCB77268.1 (Sep. 19, 2011).
 NCBI, GenBank accession No. EDY54343.1 (May 28, 2010).
 International Search Report and Written Opinion for International Application No. PCT/US2013/024511, mailed May 30, 2013, 11 pages.
 Database EMBL [Online] Jun. 1, 2010, “*Streptomyces sviveus* ATCC 29083 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase”, XP002742214, retrieved from EBI accession No. EMBL:EDY54343.
 Database EMBL [Online] Nov. 12, 2010, “*Kitasatospora setae* KM-6054 putative 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase”, XP002742691, retrieved from EBI accession No. EMBL:BAJ27727.
 Database EMBL [Online] Jul. 18, 2011, “*Streptomyces griseus* XylebKG-1 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase”, XP002742690, retrieved from EBI accession No. EMBL:EGE41430.
 Database EMBL [Online] Jul. 20, 2011, “*Amycolatopsis mediterranei* S699 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase”, XP002742215, retrieved from EBI accession No. EMBL:AEK46452 ; -& M. Verma et al: “Whole Genome Sequence of the Rifamycin B-Producing Strain *Amycolatopsis mediterranei* S699”, Journal of Bacteriology, Oct. 2011, vol. 193, No. 19, pp. 5562-5563, XP55202124.
 Database EMBL [Online] Jan. 26, 2011, “*Streptomyces pratensis* ATCC 33331 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase”, XP002742687, retrieved from EBI accession No. EMBL:ADW03091.

Database EMBL [Online] Aug. 30, 2011, “*Streptomyces* sp. SirexAA-E 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase”, XP002742688, retrieved from EBI accession No. EMBL:AEN12691.
 Database EMBL [Online] Apr. 7, 2011, “*Streptomyces venezuelae* ATCC 10712 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase”, XP002742689, retrieved from EBI accession No. EMBL:CCA58633.
 Haghani K, et al., “Comparative studies of 1-13 wild type *Escherichia coli* 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase with three glyphosate-insensitive mutated forms: Activity, stability and structural characterization”, Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)—Proteins & Proteomics, Elsevier, Netherlands, Aug. 22, 2008, vol. 1784, No. 9, pp. 1167-1175.
 He-Yong Wang, , et al., “Expression of a 1-13 bacterial aroA mutant, aroA-M1 , encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase for the production of glyphosate-resistant tobacco plants”, Journal of Plant Research, Sep. 4, 2003, vol. 116, No. 6, pp. 455-460.
 NCBI Gene ID: 6853537, (Oct. 14, 2008).
 Pereira J. H., et al., “Structural 1-13 bioinformatics study of EPSP synthase from *Mycobacterium tuberculosis*”, Biochemical and Biophysical Research Communications, Academic Press Inc. Orlando, FL, US, Dec. 19, 2003, vol. 312, No. 3, pp. 308-614.
 Pollegioni, Loredano, et al., Molecular basis of glyphosate resistance: Different approaches through protein engineering, FEBS J. Aug. 2011, pp. 2753-2766, vol. 278, No. 16.
 Si-Sun Choi, et al., “Proteomics-driven 1-13 identification of SC04677-dependent proteins in *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor*”, Journal of Microbiology and Biotechnology, Jan. 22, 2010, vol. 20, No. 3, pp. 480-484.
 T. Funke, et al., “Structural Basis of 1-13 Glyphosate Resistance Resulting from the Double Mutation Thr97 → Ile and Pro101 → Ser in 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate Synthase from *Escherichia coli*”, Journal of Biological Chemistry, Feb. 11, 2009, vol. 284, No. 15, pp. 9854-9860.

* cited by examiner