

C A S T E L L A N O S

Señor

Director de la Dirección de Nuevas Creaciones

Superintendencia de Industria y Comercio

Ministerio de Comercio, Industria y Turismo

E. S. D.

Re.: Expediente **No. NC2018/0000499**

Solicitud de Patente PCT entrada en Fase Nacional, para: **“MOLÉCULAS DE ADN RECOMBINANTE QUE COMPRENDEN UN ELEMENTO DIANA DE ARNip ESPECÍFICO DE TEJIDO REPRODUCTOR MASCULINO (mts-ARNip)”**

Solicitantes: **MONSANTO TECHNOLOGY 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. 4271** notificado en junio 7 de 2019, me permito dar respuesta al mismo de la siguiente manera:

1. Excepciones a la patentabilidad y Reivindicaciones relativas a un uso

En relación con las objeciones elevadas las reivindicaciones 5, 6, 7 a 11, y 12 a 17 por contener materia no patentable, y la objeción de las reivindicaciones 7 a 11 y 12 a 17 por contener materia que se refieren a usos de la invención, mi representada manifiesta que las reivindicaciones 7-11, 13 y 17 se han eliminado. Así mismo, las reivindicaciones 5, 12 y 16 se modificaron cambiando los términos “expresando” y “aplicar”. Por lo tanto, las objeciones elevadas a este respecto se deben dar por superadas.

Teniendo en cuenta las anteriores aclaraciones, es claro que la presente invención cumple con los requerimientos del artículo 20, literal (c) y artículo 14 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

2. Título

El examinador ha sugerido modificar el título de la solicitud, dado que es muy general y no se relaciona completamente con el objeto de la solicitud contenido en la descripción y las reivindicaciones, por lo tanto, el título se ha modificado de la siguiente manera:

**CALLE 117 No. 5A – 35 / P.O. BOX 6349
TELÉFONO (571) 756 0770 FAX (571) 755 0158
BOGOTÁ D.C. COLOMBIA
castellanos@castellanosyco.co / www.castellanosyco.co**

“MOLÉCULAS DE ADN RECOMBINANTE QUE COMPRENDEN UN ELEMENTO DIANA DE ARNip ESPECÍFICO DE TEJIDO REPRODUCTOR MASCULINO (mts-ARNip)”

3. 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 8 reivindicaciones y se pone de presente que la materia recitada se encuentra debidamente soportada en la descripción tal como fue originalmente presentada.

Con respecto a la objeción elevada hacia la reivindicación 4, mi representada manifiesta amablemente que el método reclamado sería entendido perfectamente por un experto en la materia. Específicamente, un experto en la técnica podría usar una serie de técnicas, que son de rutina en la técnica, para producir la molécula de ADN recombinante. Además, la memoria descriptiva proporciona una descripción más que adecuada de los métodos para lograr la unión operativa del elemento diana mts-ARNip recitado a la molécula polinucleotídica heteróloga, por ejemplo en el párrafo [0044] de la solicitud PCT. Los párrafos [0046] - [0050], [0058] y [0059] también describen métodos y técnicas, de rutina en la técnica, para la identificación, creación, modificación y prueba de moléculas o construcciones de ADN, incluidas las de la presente invención. Además, los Ejemplos 1 y 2 de la presente memoria descriptiva proporcionan métodos específicos para la identificación y creación de moléculas de ADN recombinante y construcciones de la presente invención. Por lo tanto, el método reivindicado es completamente claro para un experto en la materia en vista de la descripción y el conocimiento en la técnica, y cualquier paso o condición adicional sería indebidamente limitante.

Finalmente, la reivindicación 1 ha sido modificada de manera que se ha limitado la secuencias SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. Así mismo, se ha indicado que el elemento diana de mts-ARNip está unido operativamente a una molécula de polinucleótido heterólogo es transcribible, donde dicha molécula de polinucleótido heterólogo transcribible codifica una 5-enolpiruvil shikimato 3-fosfato sintasa (EPSPS)tolerante a glifosato.

Por otro lado, las reivindicaciones 2, 3, 7 a 11, 13 y 17 han sido eliminadas.

Así las cosas, teniendo en cuenta lo anterior, las objeciones formuladas hacia el pliego reivindicatorio se deben tener por superadas.

4. Unidad de Invención

El solicitante ha elegido el grupo inventivo 1 (SEQ ID NO: 1) para su examen. Sin embargo, también se incluye al grupo inventivo 2 (SEQ ID NO: 2). En vista del alto

porcentaje de identidad de secuencia compartida entre los dos secuencias, ambos pertenecen al mismo concepto inventivo y deben estudiarse juntas. Específicamente, la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2 comparten una identidad de secuencia del 99,5%, y difieren en un solo nucleótido. Por ejemplo, como se explica en la Breve descripción de las secuencias en los párrafos [0019] - [0020] de la aplicación PCT, ambas secuencias tienen la misma descripción de ser una secuencia de elemento diana mts-ARNip que tiene un 95% de identidad de secuencia con el nucleótido posiciones 1429 a 1628 de la secuencia de ADNc proporcionada en la presente solicitud como SEQ ID NO: 17, excepto que la SEQ ID NO: 2 tiene "un solo cambio de nucleótido (T69A) en relación con la SEQ ID NO: 1". Por lo tanto, es evidente que ambos SEQ ID NOs: 1 y SEQ ID NO: 2 comparten un concepto inventivo unificador y deben examinarse juntos. Además, como las SEQ ID N°: 1 y 2 son novedosas e inventivas, estas secuencias proporcionan la base para un concepto unificador para todas las reivindicaciones pendientes, ya que se relacionan con estas secuencias.

Teniendo en cuenta las anteriores aclaraciones, es claro que la presente invención cumple con el requerimiento del artículo 25 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

5. Nivel inventivo

La materia de invención recitada en la presente solicitud de patente, fue objetada por falta de nivel inventivo frente a dos documentos del estado de la técnica de la siguiente manera:

- Reivindicaciones 1 a 4: Nivel inventivo frente al documento US/2013/007908 (D1).
- Reivindicaciones 1 a 4: Nivel inventivo frente al documento WO/2007/047016 (D2).

Teniendo en cuenta el nuevo pliego reivindicatorio y los argumentos que se ponen de presente a continuación, es claro que la materia objeto de protección es novedosa frente a los documentos citados. Veamos:

El examinador objetó las reivindicaciones por presuntamente carecer de un paso inventivo sobre D1 (US 2013/0007908) y D2 (WO 2007/047016). En particular, se afirma que D1 describe construcciones de ADN recombinante que comprenden un elemento diana mts-ARNip operativamente unido a una molécula de polinucleótido heterólogo, tal como un gen que codifica un EPSPS tolerante a glifosato. También se afirma que D1 describe un elemento diana mts-ARNip que comparte una identidad de secuencia del 95,5% con la presente SEQ ID NO: 1. D2 se cita adicionalmente para revelar miRNAs específicos y sitios de reconocimiento de miRNA útiles para conferir esterilidad inducible y construcciones de ADN recombinante que incluyen tales construcciones de miRNA. En respuesta, observamos que ninguna de las referencias citadas enseña elementos diana de mts-ARNip como se menciona en las presentes

reivindicaciones. En particular, las reivindicaciones requieren que el elemento objetivo mts-ARNip elegido que comprende la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. Sin embargo, las referencias citadas no enseñan ni sugieren elementos diana de mts-ARNip que comprenden las secuencias específicamente recitadas. Aunque el informe afirma que D1 revela una secuencia mts-ARNip que comparte una identidad de secuencia del 95.5% con la presente SEQ ID NO: 1, observamos que la reivindicación 1 no requiere un porcentaje de identidad o fragmento de SEQ ID NO: 1, sino que requiere la secuencia de longitud total, que las referencias no enseñan. Como ni D1 ni D2 revelan SEQ ID NO: 1 o 2, o la construcción o los métodos actualmente reivindicados relacionados con estas secuencias, ni ninguna enseñanza sobre los cambios específicos de nucleótidos a SEQ ID NO: 78 de D1 que darían como resultado SEQ ID NO: 1, las reivindicaciones pendientes, que requieren la longitud total de SEQ ID NO: 1, de ninguna manera serían obvias sobre las referencias citadas.

Además, observamos que el informe señala que sería obvio para una persona experta en la técnica combinar la enseñanza en D1 de sitios de reconocimiento de miRNA para miRNA maduro expresado específicamente en tejido reproductivo en una planta y la enseñanza en D1 de un ARNip elemento diana que comparte una identidad de secuencia del 95,5% con la SEQ ID NO: 1 actual para llegar a la presente invención. Sin embargo, como reconoció el examinador, D2 se centra en construcciones que comprenden sitios de reconocimiento de microARN (miARN) reconocidos por microARN (miARN) (ver D2, párrafos [0010] - [0016], [0043] y la reivindicación 1), y no describe ningún elemento diana de ARNip específico de tejido masculino (ARNm-mts) reconocido por pequeños ARN interferentes (ARNip) como se describe y reivindica en la presente solicitud.

Una persona experta en la técnica comprenderá fácilmente que los miRNAs que se describen en D2 son distintos de los mts-ARNips descritos en la presente solicitud. Por ejemplo, los miRNA son moléculas monocatenarias que derivan de regiones de transcripciones de ARN que se pliegan sobre sí mismas para formar horquillas cortas, como se conoce en la técnica y se describe en D2 en los párrafos [0011] y [0012]. Por el contrario, los ARNip se derivan de regiones más largas de ARN bicatenario. Además, los miARN no son necesariamente una coincidencia exacta con su objetivo de ARNm y, por lo tanto, reconocen familias de moléculas objetivo, mientras que los siARN tienen una gran similitud con sus ARNm objetivo, lo que resulta en una mayor especificidad. Una persona experta en la técnica también sería consciente de que los miRNAs se expresan por genes cuyo propósito es hacer miRNAs, y que regulan genes (mRNAs) distintos de los genes a partir de los cuales se expresan. Por el contrario, los ARNip suelen regular los mismos genes que los expresan. Además, se cree que los miARN funcionan a través de un mecanismo distinto de los siARN, que funcionan para inhibir la traducción de un ARNm objetivo mientras que los siARN funcionan para escindir los ARNm.

Debido a estas diferencias entre miRNAs y ARNips, los sitios de reconocimiento de miRNA descritos en D2 son distintos de los elementos diana de mts-ARNip

mencionados en las presentes reivindicaciones. Específicamente, un miRNA no reconocería un elemento diana de ARNip, y un ARNip no reconocería un sitio de reconocimiento de miRNA. Además, una búsqueda de sitios de reconocimiento de miARN usando sondas de miARN como se describe en el Ejemplo 2 de D2 no identificaría los elementos diana de ARNm-mts mencionados en las reivindicaciones. En particular, el Ejemplo 2 de D2 describe la identificación de patrones de expresión de miARN usando sondas dirigidas contra familias de miARN. D2, párrafo [0169] y Tabla 1. Debido a que estos ensayos se realizaron usando sondas dirigidas a miRNAs, no habrían identificado patrones de expresión de ARNip o elementos diana de ARNip como se menciona en las presentes reivindicaciones.

Además, las construcciones descritas en el Ejemplo 3 de D2 son distintas de las construcciones de las presentes reivindicaciones. En particular, D2 describe construcciones para la supresión de un ARN diana, en el que las construcciones comprenden un promotor unido operativamente a un ADN que codifica un ARN que incluye al menos un sitio de reconocimiento de miARN exógeno (no un elemento diana ARNip específico de tejido masculino (mts-ARNip)) y una secuencia objetivo. D2, párrafo [0172]. Esto es distinto de las reivindicaciones que se acompañan porque el sitio de reconocimiento de miARN exógeno no está relacionado de ninguna manera con los elementos diana ARNip específicos de tejido masculino (mts-ARNip) que se mencionan en las reivindicaciones y un ARNsi no lo reconocería como mts- El elemento diana ARNip lo haría. Debido a que las secuencias de reconocimiento de miRNA son reconocidas por miRNA y no por ARNip, las construcciones de D2 también funcionan a través de un mecanismo distinto para provocar la supresión de una secuencia de codificación.

Por lo tanto, está claro que las moléculas de ADN reivindicadas aprovechan las diferencias en los patrones de expresión de ARNip para proporcionar la supresión génica específica de tejido, mientras que las construcciones de D2 no serían reconocidas por los ARNips y no serían influenciadas por los patrones de expresión de ARNip. Las presentes reivindicaciones recitan elementos diana específicos de mts-ARNip que se identifican en la presente solicitud por primera vez y son reconocidos por ARNips que están enriquecidos o expresan específicamente en el tejido masculino de las plantas. En vista de los nuevos elementos diana de mts-ARNip mencionados en las reivindicaciones, así como el efecto técnico distintivo de las moléculas de ADN mencionadas en las reivindicaciones, está claro que las reivindicaciones son inventivas en comparación con D2 y que no sería obvio a un experto en el arte para combinar las enseñanzas de D1 y D2.

Adicionalmente, la memoria descriptiva proporciona datos que demuestran propiedades inesperadas y beneficiosas producidas por plantas que comprenden las moléculas de ADN recombinante reivindicadas, lo que demuestra además la altura inventiva de la invención reivindicada. En particular, como se describe en los Ejemplos 3 y 5 de la memoria descriptiva, las plantas que comprenden vectores de transformación que contienen un elemento diana mts-ARNip operativamente unido a una secuencia que

codifica una proteína CP4-EPSPS para la tolerancia al glifosato, se analizaron para determinar la tolerancia al glifosato vegetativo (según lo medido por lesión vegetativa), tolerancia al glifosato específico del tejido masculino (medida por la esterilidad masculina) y rendimiento promedio. Como se muestra en las Tablas 11-14 de la memoria descriptiva, los elementos mts-ARNip que comprenden la SEQ ID N°: 1 y la SEQ ID N°: 2 produjeron un alto porcentaje de plantas que comprenden el vector de transformación que exhibe tolerancia vegetativa y un alto porcentaje de plantas que exhiben esterilidad masculina. Como se describe en el Ejemplo 3, el 100% de las plantas que comprenden el elemento objetivo mts-ARNip de SEQ ID NO: 1 demostraron completa esterilidad masculina. Además, las plantas que contienen eventos transgénicos que comprenden un vector de transformación que comprende el elemento diana mts-ARNip de SEQ ID NO: 2 dieron como resultado un alto porcentaje de plantas que exhiben esterilidad masculina como lo demuestra la presencia de muy pocos granos de polen abortado o directamente su ausencia. De manera similar, como se muestra en el Ejemplo 5 y las Tablas 13-14, cuatro eventos transgénicos que comprenden el elemento diana mts-ARNip de SEQ ID NO: 1 resultaron en plantas que demostraron daño vegetativo de cero a muy bajo y extrusión de anteras, lo que indica tolerancia vegetativa y esterilidad masculina y además no muestra pérdida de rendimiento, en comparación con las plantas de control. Además, la Tabla 15 en el Ejemplo 5 muestra que las plantas que comprenden un elemento mts-ARNip de SEQ ID NO: 1 no mostraron diferencias significativas en el daño del cultivo en la etapa VT (como una medida de tolerancia vegetativa; CIPVT), disminuyeron significativamente a ninguna extrusión de anteras (como medida de la esterilidad masculina; AES90 + 8), y sin diferencias significativas en la altura promedio de la planta o disminución en el rendimiento de la semilla, en comparación con las plantas de control.

Los resultados anteriores demuestran que la construcción de ADN recombinante reivindicada que comprende el elemento diana mts-ARNip específicamente recitado de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 da como resultado una supresión selectiva específica en tejido masculino. En particular, la tolerancia vegetativa observada es indicativa de no supresión de la secuencia de codificación EPSPS operativamente unida en tejido vegetativo, mientras que la esterilidad masculina observada es indicativa de supresión selectiva de la secuencia de codificación EPSPS en tejido específico masculino. La capacidad de las secuencias específicamente recitadas para demostrar dicha supresión no se hubiera esperado sin un conocimiento retrospectivo, ya que los elementos mts-ARNip específicamente recitados de SEQ ID NO: 1 y 2 no se enseñaron ni se sugirieron en la técnica citada y, por lo tanto, un experto en la técnica no hubiera esperado tener éxito al seleccionar las secuencias de ADN específicas mencionadas en las presentes reivindicaciones capaces de dar como resultado la supresión selectiva específica de tejido masculino observada.

Teniendo en cuenta las anteriores aclaraciones, es claro que la **presente invención** es inventiva, cumpliendo con los requerimientos de los artículos 14 y 16 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

6. Petición

- Puesto que se ha dado respuesta a todas las objeciones formuladas por la Dirección de Nuevas Creaciones, se solicita proceder al otorgamiento de la solicitud de patente.
- De manera subsidiaria, y en caso de que la Dirección de Nuevas Creaciones tenga observaciones adicionales a la patentabilidad del invento, solicito emitir un nuevo requerimiento en el marco del Artículo 45 de la Decisión 486 de 2000.

7. Conclusión

Teniendo en cuenta las modificaciones introducidas en esta oportunidad y los argumentos que se presentan, es posible establecer que las reivindicaciones cumplen con los requerimientos de la Decisión 486.

8. Anexos

- Nuevo pliego reivindicatorio conformado por 8 reivindicaciones
- Pago en línea de tasa por un examen de patentabilidad adicional

Señor Director,



Margarita Castellanos Abondano

C.C. No. **39.779.654** de Bogotá

T.P.A. No. **70.819** del C.S.J.

Calle 117 No. 5A-35 - Bogotá, D.C.

Teléfono: 7560770

Bogotá, D.C.

MCA/mg

P4836

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ADN recombinante que comprende un elemento diana de ARNip específico de tejido reproductor masculino (mts-ARNip) que comprende SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o un complemento de estas en donde el elemento diana de mts-ARNip está unido operativamente a una molécula de polinucleótido heterólogo transcribible, donde dicha molécula de polinucleótido heterólogo transcribible codifica una 5-enolpiruvil shikimato 3-fosfato sintasa (EPSPS) tolerante a glifosato.
2. Un método para producir una molécula de ADN recombinante que comprende unir operativamente un elemento diana de mts-ARNip que comprende SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o un complemento de estas a una molécula de polinucleótido que se puede transcribir heteróloga.
3. Un método para regular selectivamente la expresión de una proteína en un tejido reproductor masculino de una planta transgénica que comprende obtener una planta transgénica que contiene la molécula de ADN recombinante de la reivindicación 1.
4. El método de la reivindicación 3 en donde dicha proteína comprende una 5-enolpiruvil shikimato 3-fosfato sintasa (EPSPS) tolerante al glifosato.
5. Un método para producir una semilla híbrida que comprende:
 - a) Inducir esterilidad masculina en una planta transgénica que comprende una molécula de ADN recombinante que comprende un elemento diana de mts-ARNip que comprende SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o un complemento de estas, en donde el elemento diana de mts-ARNip está unido operativamente a una molécula de polinucleótido que se puede transcribir heteróloga que codifica una proteína que confiere tolerancia a al menos un primer herbicida, mediante el agregado de una cantidad efectiva de herbicida antes o de forma simultánea con el desarrollo del tejido reproductor masculino de la planta transgénica;
 - b) fertilizar dicha planta transgénica con polen de una segunda planta; y
 - c) obtener una semilla híbrida a partir de dicha planta transgénica.

6. El método de la reivindicación 5 en donde dicha molécula de polinucleótido que se puede transcribir heterólogo codifica un 5-enolipiruvil shikimato 3-fosfato sintasa (EPSPS) tolerante al glifosato.
7. El método de la reivindicación 5 en donde dicho herbicida es el glifosato.
8. El método de la reivindicación 7 en donde dicho glifosato se agrega de forma simultánea con el desarrollo en una cantidad eficaz de aproximadamente 0,125 libras de ácido equivalente por acre y aproximadamente 8 libras de ácido equivalente por acre.