

REPÚBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181

Señores

THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM

TÍTULO DE LA SOLICITUD: “ESTRATEGIA OPTIMIZADA PARA MODIFICACIONES DE OMISIÓN DE EXONES MEDIANTE EL USO DE CRISPR/CAS9 CON SECUENCIAS GUÍA TRIPLES”

NÚMERO DE SOLICITUD INTERNACIONAL: PCT/US2018/012558

FECHA DE PRESENTACIÓN INTERNACIONAL: 5 de enero de 2018.

PRIORIDAD: US 62/442,606 5 de enero de 2017

US 62/544,449 11 de agosto de 2017

US 62/596,298 8 de diciembre de 2017

Como resultado del examen de patentabilidad realizado a la solicitud indicada en la referencia, atendiendo a lo consagrado en el artículo 45 de la Decisión 486 de 2000, se le comunica que esta Dirección ha encontrado que la materia objeto de solicitud no cumple con algunos requisitos establecidos en la Decisión, con fundamento en los siguientes aspectos:

1. Modificaciones presentadas

Revisada la modificación a la solicitud objeto de estudio, la cual fue radicada el 29 de abril de 2020 bajo el número NC2020/0005362, y teniendo en cuenta lo señalado en el artículo 34 de la Decisión 486 de 2000 de la Comisión de la Comunidad Andina, esta oficina acepta las modificaciones presentadas por ajustarse a los requisitos legales.

2. Objeto de la invención

El problema planteado consiste en la necesidad de proporcionar componentes de edición génica más eficaces y seguros para la omisión de exones en células musculares esqueléticas y cardíacas para tratar la distrofia muscular de Dushene (DMD).

Para resolver dicho problema técnico, la solicitud en estudio plantea un ácido nucleico que comprende: una secuencia que codifica un primer ARN guía de DMD que se dirige a una primera secuencia diana genómica, una secuencia que codifica un segundo ARN guía de DMD que se dirige a una segunda secuencia diana genómica, una secuencia que codifica un tercer ARN guía de DMD que se dirige a una tercera secuencia diana genómica, un primer promotor, en donde el primer promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el primer ARN guía de DMD, un segundo promotor, en donde el segundo promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el segundo ARN guía de DMD, y un tercer promotor, en donde el tercer promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el tercer ARN guía de DMD, en donde cada una de la primera secuencia diana genómica, la segunda secuencia diana genómica, y la tercera secuencia diana genómica comprende un sitio aceptor de corte y empalme de distrofina, en donde la secuencia que codifica el primer ARN guía de DMD, la secuencia que codifica el



Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181
segundo ARN guía de DMD, y la secuencia que codifica el tercer ARN guía de DMD son idénticas.

3. Reivindicaciones estudiadas

El presente estudio se basa en el capítulo reivindicatorio del escrito radicado bajo el N° NC2020/0005362 presentado el 29 de abril de 2020.

4. Excepción de Patentabilidad

Conforme a lo establecido en los literales a) y c) del artículo 20 de la Decisión 486 de 2000 de la Comisión de la Comunidad Andina:

“No serán patentables:

(...) a) las invenciones cuya explotación comercial en el territorio del País Miembro respectivo deba impedirse necesariamente para proteger el orden público o la moral. A estos efectos la explotación comercial de una invención no se considerará contraria al orden público o a la moral solo debido a la existencia de una disposición legal o administrativa que prohíba o que regule dicha explotación; (...)”

(...) c) las plantas, los animales y los procedimientos esencialmente biológicos para la producción de plantas o animales que no sean procedimientos no biológicos o microbiológicos; (...)”

Debido a lo anterior, esta oficina establece que el objeto de las reivindicaciones 54 y 76 a 79, no es patentable, toda vez que, se refieren a “una célula”, donde dicha célula según el capítulo descriptivo puede ser una célula embrionaria humana, lo cual podría incluir la manipulación genética de los individuos. Al respecto el Tribunal Andino de justicia en la interpretación prejudicial 21-IP-2000 ha señalado que: *“razones de carácter eminentemente ético impiden que el cuerpo humano y aún sus componentes mínimos, puedan ser objeto de apropiación exclusiva con fines lucrativos e industriales. (...) Dentro de la prohibición de patentar materias que componen el cuerpo humano y su identidad genética, se encontrarían comprendidos, por ejemplo, el genoma o germoplasma del ser humano, los procedimientos de mutación o modificación genética, así como otras técnicas que pueden resultar contrarias a la dignidad de la persona o al orden público, tales como clonación de personas, manipulación de embriones humanos o creación en laboratorio de seres humanos individualizados”* (resaltado fuera del texto).

Adicionalmente, el alcance de dichas reivindicaciones 54 y 76 a 78 es tan amplio, dado que, “una célula” podría ser una célula embrionaria de acuerdo con el capítulo descriptivo, así las células reclamadas podrían llegar a producir un organismo, ya sea vegetal o animal. Por las mismas razones expuestas la reivindicación de “una célula” y una “célula de humano” no son objeto de patentabilidad según art. 20 literal c) de la Decisión 486.

5. Reivindicaciones relativas a un uso

De conformidad con lo señalado en el artículo 14 de la Decisión 486 de 2000 de la Comisión de la Comunidad Andina solo son patentables las invenciones de producto o de procedimiento.

En consecuencia, las reivindicaciones 29 a 36 y 80 a 83 no se consideran patentables, teniendo en cuenta que un método donde la única etapa es “poner en contacto”, lo cual



Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181
es considerado el uso del ARN o del ácido nucleico, dado que, no hay evidencia de etapas técnicas esenciales.

6. De la solicitud de patente

6.1. Título

De conformidad con el literal d) del artículo 27 de la Decisión 486 de 2000 de la Comisión de la Comunidad Andina, el nombre de la invención de que se trata deberá reflejar el objeto y el campo industrial con el cual se relaciona la misma y ser concordante con la materia descrita y las reivindicaciones de la solicitud. El nombre no podrá referirse a nombres personales, marcas de productos o nombres de fantasía.

El título de la solicitud no refleja el objeto divulgado en la descripción y las reivindicaciones, por lo cual se sugiere el siguiente título: "ÁCIDOS NUCLEICOS, VECTORES Y MÉTODO DE CRISPR CAS9 CON TRIPLE SECUENCIA DE RNA GUÍA PARA OMISIÓN DE EXONES DE DISTROFINA".

6.2. Reivindicaciones

Teniendo en cuenta lo establecido en el artículo 30 de la Decisión 486 de 2000 de la Comisión de la Comunidad Andina:

"Las reivindicaciones definirán la materia que se desea proteger mediante la patente. Deben ser claras y concisas y estar enteramente sustentadas por la descripción. (...)"

Esta oficina informa que,

La reivindicación 1 no es clara porque menciona un ácido nucleico que comprende secuencias que codifican para tres diferentes ARN guía de DMD, pero no menciona las características técnicas esenciales de dichas secuencias y sus SEQ ID NO. Se sugiere colocar las SEQ ID NO de cada uno de los ARN guía de DMD reclamados en la reivindicación. Así mismo, menciona DMD en lugar de mencionar las secuencias diana genómicas, ni su SEQ ID NO: a la cual se encuentran dirigidos los ARN guías reclamados, ni cuáles son los sitios aceptores de corte y de empalme. Se sugiere también incluir la SEQ ID NO: de las secuencias diana dada que dicha información son características técnicas esenciales, así como las características del sitio aceptor de corte y de empalme. En el mismo sentido, se mencionan promotores que dirigen los ARN guías, pero no se menciona las características técnicas esenciales de dichos promotores y sus SEQ ID NO: se sugiere incluir las características técnicas esenciales de los promotores reclamados y sus SEQ ID NO: de acuerdo con el capítulo descriptivo.

La reivindicación 5 no es clara porque menciona *"en donde al menos dos del primer promotor, el segundo promotor y el tercer promotor son idénticos"*, pero no se entiende si es que el ácido nucleico lleva dos copias del mismo promotor. Realizar las aclaraciones respectivas.

La reivindicación 6 no es clara porque menciona *"el tercer promotor no son idénticas"* cuando debería ser *"el tercer promotor no son idénticos"*.

La reivindicación 11 no es clara porque menciona *"Un ácido nucleico que comprende tres copias del mismo ARN guía de DMD, en donde cada copia del ARN guía de DMD es"*



Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181

expresada por su propio promotor”, pero no menciona las características técnicas esenciales de los ARN y cada uno de los promotores, ni sus SEQ ID NO:. Se sugiere incluir las SEQ ID NO: de los ARN y los respectivos promotores.

La reivindicación 12 no es clara porque menciona *“Un ácido nucleico que comprende tres copias del mismo ARN guía simple (ARNgs) de DMD, en donde el ARNgs comprende un ARN guía de DMD y un andamiaje spCas9, en donde cada copia del ARNgs es expresada por su propio promotor”*, pero no menciona las características técnicas esenciales del ARN guía de DMD ni del andamiaje spCas9 y el promotor. Se sugiere incluir los SEQ ID NO: del ARN, el andamiaje spCas9 y el promotor reclamado y de acuerdo con lo divulgado en el capítulo descriptivo.

La reivindicación 17 no es clara porque menciona *“un ácido nucleico que comprende tres copias de una secuencia que codifica un ARN guía de DMD, en donde la secuencia comprende el SEQ ID NO: 714, en donde cada copia del ARN guía de DMD es expresada por su propio promotor”*, pero no menciona las características técnicas esenciales del promotor ni su SEQ ID NO:. Se sugiere incluir el SEQ ID NO: del promotor.

La reivindicación 20 no es clara porque menciona *“Un ácido nucleico que comprende tres copias de una secuencia que codifica ARN guía simple (ARNgs) de DMD, en donde la secuencia comprende la SEQ ID NO: 762, en donde cada copia del ARN guía de DMD es expresada por su propio promotor”*, pero no menciona las características técnicas esenciales del promotor ni su SEQ ID NO:. Se sugiere incluir el SEQ ID NO: del promotor.

La reivindicación 23 no es clara porque menciona *“una secuencia que codifica un ARN guía simple (ARNgs) de DMD y un promotor”*, pero no menciona las características técnicas esenciales del promotor ni su SEQ ID NO:. Se sugiere incluir el SEQ ID NO: del promotor.

La reivindicación 27 no es clara porque menciona *“en donde el ARNgs comprende un ARN guía de DMD y un andamiaje spCas9”*, pero no menciona las características esenciales del andamiaje spCas9 ni su SEQ ID NO:. Se sugiere incluir la SEQ ID NO: del andamiaje.

La reivindicación 42 no es clara porque menciona *“y un segundo ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína Cas9 o un dominio de nucleasa de la misma”* pero no menciona la SEQ ID NO: de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica para la proteína Cas9.

La reivindicación 43 no es clara porque menciona *“una composición que comprende un vector”* pero no menciona las características técnicas esenciales del vector ni su SEQ ID NO:. Se sugiere incluir las características técnicas esenciales del vector y su SEQ ID NO:.

Las reivindicaciones 44, 46 y 49 a 52 no son claras porque reclama *“El ácido nucleico de la Reivindicación (...) o la composición de la Reivindicación (...)”* donde un ácido nucleico y una composición son dos categorías diferente de producto. Se sugiere realizar las aclaraciones respectivas.

La reivindicación 46 menciona *“S. pyogenes”* cuando debería ser *“Streptococcus pyogenes”* por ser la primera vez que se menciona en el texto. Se sugiere realizar las modificaciones respectivas.



Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181
La reivindicación 49 no es clara porque menciona “una secuencia que codifica una repetición terminal invertida 5’ (ITR) y una secuencia que codifica una ITR 3’” pero no menciona las características técnicas esenciales de las secuencias que codifica los ITRs ni su SEQ ID NO:. Se sugiere incluir los SEQ ID NO: de los ITRs reclamados.

La reivindicación 57 no es clara porque menciona “un secuencia” cuando debería ser “una secuencia”. Se sugiere realizar las correcciones respectivas.

La reivindicación 60 no es clara porque menciona “una ITR 5’ de un transposón T7 y una secuencia que codifica una ITR 3’ de un transposón T7” pero no menciona las características técnicas esenciales de las secuencias que codifica los ITRs ni su SEQ ID NO:. Se sugiere incluir los SEQ ID NO: de los ITRs reclamados.

El capítulo reivindicatorio no es conciso porque contiene una cantidad de reivindicaciones independientes de producto. Se sugiere que por categoría inventiva se presente una reivindicación independiente y las otras si son verdaderas modalidades como dependientes.

En consecuencia, es necesario que allegue las aclaraciones o modificaciones correspondientes para dar cumplimiento a lo establecido en el citado artículo.

6.3.Listado de secuencias

De conformidad con lo establecido por el artículo 28 de la Decisión 486 de 2000 de la Comisión de la Comunidad Andina, la solicitud se refiere a secuencias de nucleótidos o aminoácidos.

Teniendo en cuenta lo anterior, es necesarios presentar las listas en forma separada de la descripción, bajo el título: “Listado de secuencias” de acuerdo con el estándar ST. 25, para dar cumplimiento a lo establecido.

7. Determinación del Estado de la Técnica

La fecha para determinar el estado de la técnica es el 5 de enero de 2017, que corresponde a la fecha de prioridad.

Consultadas las fuentes de información con que se cuenta, se encontraron los siguientes documentos que anticipan el objeto de esta solicitud:

Ítem	Documento	Título	Fecha de publicación
D1	Ousterout, D. G., et al. <i>Nature communications</i>	“Multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for correction of dystrophin mutations that cause Duchenne muscular dystrophy”	18 de febrero de 2015
D2	Bertero, A., et al. <i>Development</i>	“Optimized inducible shRNA and CRISPR/Cas9 platforms for <i>in vitro</i> studies of human development using hPSCs”	01 de diciembre de 2016
D3	WO2014025887A1	“Selective reactivation of genes on the inactive x chromosome”	13 de febrero de 2014



Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181

D4	Strausberg, R. L., T., <i>et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.</i>	"Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences"	24 de diciembre de 2002
----	--	--	----------------------------

D1¹ divulga un ácido nucleico que comprende los componentes de un sistema CRISPR/Cas9 para restaurar la expresión del gen de la distrofina en células portadoras de mutaciones de distrofina que causan distrofia muscular de Duchenne (DMD), donde se diseñaron sgRNAs simples o multiplexados para restaurar el marco de lectura de la distrofina dirigiéndose al punto de acceso mutacional en los exones 45–55 con el fin de introducir cambios dentro de los exones o eliminar uno o más exones, así, después de la edición de genes en mioblastos de pacientes con DMD, la expresión de distrofina fue restaurada *in vitro*. Así mismo, se logró detectar la restauración de DMD *in vivo* después del trasplante de células de pacientes en ratones inmunodeficientes, concluyendo que la edición de genes multiplex con un sistema CRISPR/Cas9 facilitan la generación de una solo gran delección que puede corregir hasta el 62% de las mutaciones de DMD (Abstract, Págs. 2 a 12).

D2² divulga un ácido nucleico que comprende los componentes de un sistema de CRISPR CAS9 optimizado para la eliminación de genes inducibles en un solo paso, sean genes multiplexados o individuales estrictamente controlados en hPSC (células humanas pluripotentes) y en una amplia variedad de células diferenciadas. Así mismo, divulga líneas hESC (células madres embrionarias humanas) en las que un gen reportero fluorescente puede ser eliminado de manera inducible, para los cual se dirigió a las hESC con el EGFPd2 (Proteína verde fluioresencte mejorada), un sgRNA (dirigido contra EGFPd2) y un gen constitutivo de Cas9, donde la coexpresión de dos o tres copias del mismo casete de ARN guía de EGFP del mismo locus AAVS1 (sitio de inserción 1 de adenovirus en el genoma humano) fue suficiente para aumentar significativamente la velocidad y la eficiencia de la desactivación inducible de EGFPd2 en todas las sublíneas clonales analizadas (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).

D3³ divulga un ácido nucleico compuesto entre 8 y 18 nucleótidos que reactiva selectivamente genes en el cromosoma X inactivo (Xi) de una manera específica de locus como es el caso de genes asociados con la distrofia muscular de Duchenne, donde se pueden usar secuencias de nucleótidos idénticas a la proteína distrofina (Abstract, Reivs. 1 a 5).

D4⁴ divulga la generación y análisis inicial de más de 15000 secuencias de CDNA de longitud completa de humano y ratón bajo el programa Colección de genes de mamíferos (MGC por sus siglas en inglés) donde se lograron identificar 7800 genes de humano y fueron depositados en la base de datos pública del instituto nacional de salud (NHI) (Abstract, todo el documento).

¹Ousterout, D. G., *et al.* (2015). Multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for correction of dystrophin mutations that cause Duchenne muscular dystrophy. *Nature communications*, 6, 6244. Recuperado desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4335351/>
²Bertero, A., *et al.* (2016). Optimized inducible shRNA and CRISPR/Cas9 platforms for in vitro studies of human development using hPSCs. *Development (Cambridge, England)*, 143(23), 4405–4418. Recuperado desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5201041/>
³ <https://patentimages.storage.googleapis.com/59/73/7d/7ec540b22baaae/WO2014025887A1.pdf>
⁴ Strausberg, R. L., T., *et al.* (2002). Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(26), 16899–16903.

Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181

8. Examen de Patentabilidad

De acuerdo con lo establecido en el artículo 14 de la Decisión 486 de 2000 de la Comisión de la Comunidad Andina, en el cual se establecen los requisitos de patentabilidad objeto de la solicitud en estudio, esta Oficina presenta a continuación el análisis de los requisitos de patentabilidad.

8.1. Nivel Inventivo

Teniendo en cuenta lo señalado en el artículo 18 de la Decisión 486 de 2000 de la Comisión de la Comunidad Andina, la reivindicación independiente 1 (NC2020/0005362 presentado el 29 de abril de 2020) refiere a: “*Un ácido nucleico que comprende: una secuencia que codifica un primer ARN guía de DMD que se dirige a una primera secuencia diana genómica, (...)*”. A continuación, se presenta la tabla comparativa entre el objeto reivindicado y los documentos encontrados en el estado de la técnica:

CARACTERÍSTICAS ESENCIALES	D1	D2
Un ácido nucleico que comprende:	Un ácido nucleico que comprende: (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Fig. 2).	Un ácido nucleico que comprende: (Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning)
una secuencia que codifica un primer ARN guía de DMD que se dirige a una primera secuencia diana genómica,	una secuencia que codifica un primer ARN guía de DMD que se dirige a una primera secuencia diana genómica (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Págs. 2 a 6. Sección – Results, Figs. 1 a 3, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	una secuencia que codifica un primer ARN guía de EFGP (proteína verde fluorescente mejorada) que se dirige a una primera secuencia diana genómica (Fig, 8).
una secuencia que codifica un segundo ARN guía de DMD que se dirige a una segunda secuencia diana genómica,	una secuencia que codifica un segundo ARN guía de DMD que se dirige a una segunda secuencia diana genómica (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Pág. Págs. 2 a 6. Sección – Results, Figs. 1 a 3, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	una secuencia que codifica un segundo ARN guía de EFGP que se dirige a una segunda secuencia diana genómica (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
una secuencia que codifica un tercer ARN guía de DMD que se dirige a una tercera secuencia diana genómica,	una secuencia que codifica un tercer ARN guía de DMD que se dirige a una tercera secuencia diana genómica (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Págs. 2 a 6. Sección – Results, Figs. 1 a 3, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	una secuencia que codifica un tercer ARN guía de EFGP que se dirige a una tercera secuencia diana genómica (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
un primer promotor, en donde el primer promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el primer ARN guía de DMD,	un primer promotor, en donde el primer promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el primer ARN guía de DMD (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Págs. 2 a	un primer promotor, en donde el primer promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el primer ARN guía de EFGP (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible

Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181

	6. Sección – Results, Figs. 1 a 3, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
un segundo promotor, en donde el segundo promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el segundo ARN guía de DMD,	un segundo promotor, en donde el segundo promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el segundo ARN guía de DMD (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Págs. 2 a 7. Sección – Results, Figs. 1 a 4, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	un segundo promotor, en donde el segundo promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el segundo ARN guía de EFGP (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
y un tercer promotor, en donde el tercer promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el tercer ARN guía de DMD,	No menciona	y un tercer promotor, en donde el tercer promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el tercer ARN guía de EFGP (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
en donde cada una de la primera secuencia diana genómica, la segunda secuencia diana genómica, y la tercera secuencia diana genómica comprende un sitio aceptor de corte y empalme de distrofina,	en donde cada una de la primera secuencia diana genómica y la segunda secuencia diana genómica comprende un sitio aceptor de corte y empalme de distrofina (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Pág. Págs. 2 a 7. Sección – Results, Figs. 1 a 4 y 7, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	en donde cada una de la primera secuencia diana genómica, la segunda secuencia diana genómica, y la tercera secuencia diana genómica comprende un sitio aceptor de corte y empalme de EFGP (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
en donde la secuencia que codifica el primer ARN guía de DMD, la secuencia que codifica el segundo ARN guía de DMD, y la secuencia que codifica el tercer ARN guía de DMD son idénticas	No menciona	en donde la secuencia que codifica el primer ARN guía de EFGP, la secuencia que codifica el segundo ARN guía de EFGP, y la secuencia que codifica el tercer ARN guía de EFGP son idénticas (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figuras 7D y 8S).

D1 es considerado como el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 1, ya que divulga un ácido nucleico que comprende los componentes de un sistema CRISPR/Cas9 para restaurar la expresión del gen de la distrofina en células portadoras de mutaciones de distrofina que causan distrofia muscular de Duchenne



Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181

(DMD), donde se diseñaron sgRNAs simples o multiplexados para restaurar el marco de lectura de la distrofina dirigiéndose al punto de acceso mutacional en los exones 45–55 con el fin de introducir cambios dentro de los exones o eliminar uno o más exones, así, después de la edición de genes en mioblastos de pacientes con DMD, la expresión de distrofina fue restaurado *in vitro*. Así mismo, se logró detectar la restauración de DMD *in vivo* después del trasplante de células de pacientes en ratones inmunodeficientes, concluyendo que la edición de genes multiplex con un sistema CRISPR/Cas9 facilitan la generación de una solo gran delección que puede corregir hasta el 62% de las mutaciones de DMD (Abstract, Págs. 2 a 12).

Además, D1 divulga que los promotores del primer sgRNA y el segundo sgRNA son idénticos el cual es un promotor musculo esquelético hU6 (Fig, 2), siendo el sitio de corte y empalme en la distrofina el sitio del aceptor de corte y empalme 5´ del exón 51 y el ácido nucleico que contiene los elementos de un sistema CRISPR CAS9 también contiene un sitio de andamiaje spCAS9 (Págs. 4 y 5, Sección – Results).

La diferencia entre la invención definida entre la reivindicación 1 y el ácido nucleico divulgado en D1, consiste en la presencia de un tercer promotor que dirige una tercera secuencia de sgRNA y que las tres secuencias de sgRNA sean idénticas.

No hay evidencia de que el incluir específicamente tres secuencias de sgRNA idénticas proporcione un ácido nucleico con algún efecto técnico diferente al que ya proporcionaba el objeto de D1, puesto que un ácido nucleico que compone un sistema de CRISPR CAS9 para la omisión de exones de DMD ya había sido previsto en dicho documento (Abstract, Págs. 2 a 12).

Por lo tanto, el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: ¿Cómo modificar el ácido nucleico conocido en D1 con el fin de proporcionar un ácido nucleico alternativo?

Sin embargo, el incluir tres copias de un sgRNA unidas a tres promotores en un ácido nucleico en un sistema de CRISPR-CAS9, está divulgado en D2 que se refiere a un ácido nucleico que comprende los componentes de un sistema de CRISPR CAS9 optimizado para la eliminación de genes inducibles en un solo paso, sean genes multiplexados o individuales estrictamente controlados en hPSC (células humanas pluripotentes) y en una amplia variedad de células diferenciadas. Así mismo, divulga líneas hESC (células madres embrionarias humanas) en las que un gen reportero fluorescente puede ser eliminado de manera inducible, para los cual se dirigió a las hESC con el EGFPd2 (Proteína verde fluorescente mejorada), un sgRNA (dirigido contra EGFPd2) y un gen constitutivo de Cas9, donde la coexpresión de dos o tres copias del mismo casete de ARN guía de EGFP del mismo locus AAVS1 (sitio de inserción 1 de adenovirus en el genoma humano) fue suficiente para aumentar significativamente la velocidad y la eficiencia de la desactivación inducible de EGFPd2 en todas las sublíneas clonales analizadas (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).

En consecuencia, la persona normalmente versada en la materia estaría motivada a incluir tres copias de sgRNA idénticas con sus respectivos promotores como lo enseña del D2 en el ácido nucleico de D1, para así llegar al objeto de la reivindicación 1. Por lo cual se considera obvia.



Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181
Las reivindicaciones dependientes 2 a 10, 37, 38, 41, 53, 56 y 79 no mencionan alguna característica que, junto con las características de la reivindicación independiente, aporte nivel inventivo al ácido nucleico de la reivindicación 1, por lo cual se considera que carece de nivel inventivo.

Teniendo en cuenta lo señalado en el artículo 18 de la Decisión 486 de 2000 de la Comisión de la Comunidad Andina, la reivindicación independiente 11 (NC2020/0005362 presentado el 29 de abril de 2020) refiere a: *“Un ácido nucleico que comprende: una secuencia que codifica un primer ARN guía de DMD que se dirige a una primera secuencia diana genómica, (...)”*. A continuación, se presenta la tabla comparativa entre el objeto reivindicado y los documentos encontrados en el estado de la técnica:

CARACTERÍSTICAS ESENCIALES	D1	D2
Un ácido nucleico que comprende:	Un ácido nucleico que comprende: (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Fig. 2).	Un ácido nucleico que comprende: (Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning)
tres copias del mismo ARN guía de DMD	dos ARN guía de DMD distintos, (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Pág. Págs. 2 a 7. Sección – Results, Figs. 1 a 4, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	tres copias del mismo ARN guía de EFGR (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
en donde cada copia del ARN guía de DMD es expresada por su propio promotor.	en donde cada ARN guía es expresado por su propio promotor (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Pág. Págs. 2 a 7. Sección – Results, Figs. 1 a 4, Tabla 1).	en donde cada ARN guía es expresado por su propio promotor (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figuras 7D y 8S).

D1 es considerado como el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 11, ya que divulga un ácido nucleico que comprende los componentes de un sistema CRISPR/Cas9 para restaurar la expresión del gen de la distrofina en células portadoras de mutaciones de distrofina que causan distrofia muscular de Duchenne (DMD), donde se diseñaron sgRNAs simples o multiplexados, incluyendo dos ARN guías DMD cuyas secuencias son diferentes y se encuentran dirigidos por su propio promotor, para restaurar el marco de lectura de la distrofina dirigiéndose al punto de acceso mutacional en los exones 45–55 con el fin de introducir cambios dentro de los exones o eliminar uno o más exones, así, después de la edición de genes en mioblastos de pacientes con DMD, la expresión de distrofina fue restaurado *in vitro*. Así mismo, se logró detectar la restauración de DMD *in vivo* después del trasplante de células de pacientes en ratones inmunodeficientes, concluyendo que la edición de genes multiplex con un sistema CRISPR/Cas9 facilitan la generación de una solo gran delección que puede corregir hasta el 62% de las mutaciones de DMD (Abstract, Págs. 2 a 12).

Además, D1 divulga que los promotores del primer sgRNA y el segundo sgRNA son idénticos el cual es un promotor musculo esquelético hU6 (Fig, 2), siendo el sitio de corte y empalme en la distrofina el sitio del aceptor de corte y empalme 5´del exón 51 y el ácido

Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181

nucleico que contiene los elementos de un sistema CRISPR CAS9 también contiene un sitio de andamiaje spCAS9 (Págs. 4 y 5, Sección – Results).

La diferencia entre la invención definida entre la reivindicación 11 y el ácido nucleico divulgado en D1, consiste en que las tres secuencias de sgRNA DMD sean idénticas.

No hay evidencia de que el incluir específicamente tres secuencias de sgRNA idénticas DMD proporcione un ácido nucleico con algún efecto técnico diferente al que ya proporcionaba el objeto de D1, puesto que un ácido nucleico que compone un sistema de CRISPR CAS9 para la omisión de exones de DMD con sgRNAs que tienen su propio promotor ya había sido previsto en dicho documento (Abstract, Págs. 2 a 12).

Por lo tanto, el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: ¿Cómo modificar el ácido nucleico conocido en D1 con el fin de proporcionar un ácido nucleico alternativo?

Sin embargo, el incluir tres copias de un sgRNA unidas a su respectivo promotor en un ácido nucleico en un sistema de CRISPR-CAS9, está divulgado en D2 que se refiere a un ácido nucleico que comprende los componentes de un sistema de CRISPR CAS9 optimizado para la eliminación de genes inducibles en un solo paso, sean genes multiplexados o individuales estrictamente controlados en hPSC (células humanas pluripotentes) y en una amplia variedad de células diferenciadas. Así mismo, divulga líneas hESC (células madres embrionarias humanas) en las que un gen reportero fluorescente puede ser eliminado de manera inducible, para lo cual se dirigió a las hESC con el EGFPd2 (Proteína verde fluorescente mejorada), un sgRNA (dirigido contra EGFPd2) y un gen constitutivo de Cas9, donde la coexpresión de dos o tres copias del mismo casete de ARN guía de EGFP del mismo locus AAVS1 (sitio de inserción 1 de adenovirus en el genoma humano) fue suficiente para aumentar significativamente la velocidad y la eficiencia de la desactivación inducible de EGFPd2 en todas las sublíneas clonales analizadas (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figuras 7D y 8S).

En consecuencia, la persona normalmente versada en la materia estaría motivada a incluir tres copias del mismo sgRNA con sus respectivos promotores como lo enseña el D2 en el ácido nucleico de D1, para así llegar al objeto de la reivindicación 11. Por lo cual se considera obvia.

Las reivindicaciones dependientes 37, 38, 41, 53 y 56 no mencionan alguna característica que, junto con las características de la reivindicación independiente, aporte nivel inventivo al ácido nucleico de la reivindicación 11, por lo cual se considera que carece de nivel inventivo.

Teniendo en cuenta lo señalado en el artículo 18 de la Decisión 486 de 2000 de la Comisión de la Comunidad Andina, la reivindicación independiente 12 (NC2020/0005362 presentado el 29 de abril de 2020) refiere a: *“Un ácido nucleico que comprende: tres copias del mismo ARN guía simple (ARNgs) de DMD, en donde el ARNgs comprende, (...)”*. A continuación, se presenta la tabla comparativa entre el objeto reivindicado y los documentos encontrados en el estado de la técnica:



Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181

CARACTERÍSTICAS ESENCIALES	D1	D2
Un ácido nucleico que comprende:	Un ácido nucleico que comprende: (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Fig. 2).	Un ácido nucleico que comprende: (Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning)
tres copias del mismo ARN guía simple (ARNgs) de DMD, en donde el ARNgs comprende	dos ARN guía de DMD diferentes, (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Pág. Págs. 2 a 7. Sección – Results, Figs. 1 a 4, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	tres copias del mismo ARN guía de EFGP, (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
un ARN guía de DMD y un andamiaje spCas9,	Un ARN guía de DMD y un andamiaje spCas9 (Págs. 5 y 6, Secciones - Multiplex CRISPR/Cas9 Gene Editing to Delete Exon 51 y Dystrophin Rescue by a Multi-Exon Large Genomic Deletion , Fig. 3).	Un ARN guía de EGFP y un andamiaje spCas9 (Pág. 23, Sección – Molecular cloning)
en donde cada copia del ARNgs es expresada por su propio promotor.	en donde cada ARN guía es expresado por su propio promotor (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Pág. Págs. 2 a 7. Sección – Results, Figs. 1 a 4, Tabla 1,).	en donde cada ARN guía es expresado por su propio promotor (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).

D1 es considerado como el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 12, ya que divulga un ácido nucleico que comprende los componentes de un sistema CRISPR/Cas9 para restaurar la expresión del gen de la distrofina en células portadoras de mutaciones de distrofina que causan distrofia muscular de Duchenne (DMD), donde se diseñaron sgRNAs simples o multiplexados, incluyendo dos ARN guías DMD cuyas secuencias son idénticas y se encuentran dirigidos por su propio promotor, para restaurar el marco de lectura de la distrofina dirigiéndose al punto de acceso mutacional en los exones 45–55 con el fin de introducir cambios dentro de los exones o eliminar uno o más exones, así, después de la edición de genes en mioblastos de pacientes con DMD, la expresión de distrofina fue restaurado *in vitro*. Así mismo, se logró detectar la restauración de DMD *in vivo* después del trasplante de células de pacientes en ratones inmunodeficientes, concluyendo que la edición de genes multiplex con un sistema CRISPR/Cas9 facilitan la generación de una solo gran delección que puede corregir hasta el 62% de las mutaciones de DMD (Abstract, Págs. 2 a 12).

Además, D1 divulga que los promotores del primer sgRNA y el segundo sgRNA son idénticos el cual es un promotor musculo esquelético hU6 (Fig, 2), siendo el sitio de corte y empalme en la distrofina el sitio del aceptor de corte y empalme 5´del exón 51 y el ácido nucleico que contiene los elementos de un sistema CRISPR CAS9 también contiene un sitio de andamiaje spCAS9 (Págs. 4 y 5, Sección – Results).

La diferencia entre la invención definida entre la reivindicación 12 y el ácido nucleico divulgado en D1, consiste en que las tres secuencias de sgRNA DMD sean copias.

Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181
No hay evidencia de que el incluir específicamente tres secuencias de sgRNA idénticas DMD proporcione un ácido nucleico con algún efecto técnico diferente al que ya proporcionaba el objeto de D1, puesto que un ácido nucleico que compone un sistema de CRISPR CAS9 para la omisión de exones de DMD con sgRNAs que tienen su propio promotor ya había sido previsto en dicho documento (Abstract, Págs. 2 a 12).

Por lo tanto, el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: ¿Cómo modificar el ácido nucleico conocido en D1 con el fin de proporcionar otro ácido nucleico alternativo?

Sin embargo, el incluir tres copias de un sgRNA unidas a tres promotores en un ácido nucleico en un sistema de CRISPR-CAS9, está divulgado en D2 que se refiere a un ácido nucleico que comprende los componentes de un sistema de CRISPR CAS9 optimizado para la eliminación de genes inducibles en un solo paso, sean genes multiplexados o individuales estrictamente controlados en hPSC (células humanas pluripotentes) y en una amplia variedad de células diferenciadas. Así mismo, divulga líneas hESC (células madres embrionarias humanas) en las que un gen reportero fluorescente puede ser eliminado de manera inducible, para los cual se dirigió a las hESC con el EGFPd2 (Proteína verde fluorescente mejorada), un sgRNA (dirigido contra EGFPd2) y un gen constitutivo de Cas9, donde la coexpresión de dos o tres copias del mismo casete de ARN guía de EGFP del mismo locus AAVS1 (sitio de inserción 1 de adenovirus en el genoma humano) fue suficiente para aumentar significativamente la velocidad y la eficiencia de la desactivación inducible de EGFPd2 en todas las sublíneas clonales analizadas (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figuras 7D y 8S).

En consecuencia, la persona normalmente versada en la materia estaría motivada a incluir tres copias de sgRNA con sus respectivos promotores como lo enseña del D2 en el ácido nucleico de D1, para así llegar al objeto de la reivindicación 12. Por lo cual se considera obvia.

Las reivindicaciones dependientes 13 a 16, 37, 38, 41, 53 y 56 no menciona alguna característica que, junto con las características de la reivindicación independiente, aporte nivel inventivo al ácido nucleico de la reivindicación 12, por lo cual se considera que carece de nivel inventivo.

Teniendo en cuenta lo señalado en el artículo 18 de la Decisión 486 de 2000 de la Comisión de la Comunidad Andina, la reivindicación independiente 17 (NC2020/0005362 presentado el 29 de abril de 2020) refiere a: *“Un ácido nucleico que comprende tres copias de una secuencia que codifica un ARN guía de DMD, en donde la secuencia comprende el SEQ ID NO: 714, (...)”*. A continuación, se presenta la tabla comparativa entre el objeto reivindicado y los documentos encontrados en el estado de la técnica:

CARACTERÍSTICAS ESENCIALES	D1	D2
Un ácido nucleico que comprende:	Un ácido nucleico que comprende: (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Fig. 2).	Un ácido nucleico que comprende: (Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning)
tres copias de una secuencia que codifica un ARN guía de DMD	dos ARN guía de DMD diferentes, (Pág. 11, Sección –	tres copias del mismo ARN guía de EFGP, (Págs. 4412 y 4413,

Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181

	Plasmid construction. Pág. Págs. 2 a 7. Sección – Results, Figs. 1 a 4, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
en donde la secuencia comprende el SEQ ID NO: 714	y en donde el ARNGs comprende cualquiera de las siguientes secuencias: CR1:GATTGGCTTTGATTTCCCTA CR2:GTGTAGAGTAAGTCAGCTA CR3:GCCTACTCAGACTGTTA CTC CR4:GTTGGACAGAACTTACC GAC CR5:GCAGTTGCCTAAGAACT GGT CR6:GGGGCTCCACCCTCACG AGT CR7:GTTTGCTTCGCTATAAA CG CR10:GCCAGGATGGCATTGG GCAG CR11:GCTGAATCTGCGGTGG CAGG CR12:GTTCTTTTGTTCTTCTA GCC CR13:GGAAAAGCTTGAGCAA GTCA CR14:GGAAGAGTTGCCCTG CGCC CR15:GACAAATCTCCAGTGG ATAA CR16:GTGTTTCTCAGGTAAAG CTC CR17:GGAAGGACCATTTGAC GTTA CR18:GAACTGCTATTTTCAGTT TCC CR19:GCCAGCCACTCAGCCA GTGA CR20:GGTATGCTTTTCTGTTA AAG	No menciona
en donde cada copia del ARN guía de DMD es expresada por su propio promotor	en donde cada ARN guía es expresado por su propio promotor (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Pág. Págs. 2 a 7. Sección – Results, Figs. 1 a 4, Tabla 1,).	en donde cada ARN guía es expresado por su propio promotor (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).

D1 es considerado como el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 17, ya que divulga un ácido nucleico que comprende los componentes de un sistema CRISPR/Cas9 para restaurar la expresión del gen de la distrofina en células portadoras de mutaciones de distrofina que causan distrofia muscular de Duchenne (DMD), donde se diseñaron sgRNAs simples o multiplexados, incluyendo dos

Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181

ARN guías DMD cuyas secuencias son idénticas y se encuentran dirigidos por su propio promotor, para restaurar el marco de lectura de la distrofina dirigiéndose al punto de acceso mutacional en los exones 45–55 con el fin de introducir cambios dentro de los exones o eliminar uno o más exones, así, después de la edición de genes en mioblastos de pacientes con DMD, la expresión de distrofina fue restaurado *in vitro*. Así mismo, se logró detectar la restauración de DMD *in vivo* después del trasplante de células de pacientes en ratones inmunodeficientes, concluyendo que la edición de genes multiplex con un sistema CRISPR/Cas9 facilitan la generación de una solo gran delección que puede corregir hasta el 62% de las mutaciones de DMD (Abstract, Págs. 2 a 12).

Además, D1 divulga que los promotores del primer sgRNA y el segundo sgRNA son idénticos el cual es un promotor musculo esquelético hU6 (Fig, 2), siendo el sitio de corte y empalme en la distrofina el sitio del aceptor de corte y empalme 5´ del exón 51 y el ácido nucleico que contiene los elementos de un sistema CRISPR CAS9 también contiene un sitio de andamiaje spCAS9 (Págs. 4 y 5, Sección – Results).

La diferencia entre la invención definida entre la reivindicación 17 y el ácido nucleico divulgado en D1, consiste en que las tres secuencias de sgRNA DMD sean copias y en que la secuencia sea la SEQ ID NO: 714.

No hay evidencia de que el incluir específicamente tres secuencias de sgRNA idénticas DMD y que sea la secuencia SEQ ID NO: 714, proporcione un ácido nucleico con algún efecto técnico diferente al que ya proporcionaba el objeto de D1, puesto que un ácido nucleico que compone un sistema de CRISPR CAS9 para la omisión de exones de DMD con sgRNAs que tienen su propio promotor y con diferentes opciones de sgRNA ya había sido previsto en dicho documento (Abstract, Págs. 2 a 12).

Por lo tanto, el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: ¿Cómo modificar el ácido nucleico conocido en D1 con el fin de proporcionar otro ácido nucleico alternativo?

Sin embargo, el incluir tres copias de un sgRNA unidas a tres promotores en un ácido nucleico en un sistema de CRISPR-CAS9, está divulgado en D2 que se refiere a un ácido nucleico que comprende los componentes de un sistema de CRISPR CAS9 optimizado para la eliminación de genes inducibles en un solo paso, sean genes multiplexados o individuales estrictamente controlados en hPSC (células humanas pluripotentes) y en una amplia variedad de células diferenciadas. Así mismo, divulga líneas hESC (células madres embrionarias humanas) en las que un gen reportero fluorescente puede ser eliminado de manera inducible, para los cual se dirigió a las hESC con el EGFPd2 (Proteína verde fluorescente mejorada), un sgRNA (dirigido contra EGFPd2) y un gen constitutivo de Cas9, donde la coexpresión de dos o tres copias del mismo casete de ARN guía de EGFP del mismo locus AAVS1 (sitio de inserción 1 de adenovirus en el genoma humano) fue suficiente para aumentar significativamente la velocidad y la eficiencia de la desactivación inducible de EGFPd2 en todas las sublíneas clonales analizadas (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figuras 7D y 8S).

Adicionalmente, la SEQ ID NO: 714 ha sido previamente reportada y se encuentra depositada en el NCBI bajo la accesión BC150141.1 (alineamiento 1).



Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181

Homo sapiens dystrophin, mRNA (cDNA clone IMAGE:40124455), complete cds
Sequence ID: [BC150141.1](#) Length: 4733 Number of Matches: 1

Range 1: 501 to 520 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
40.1 bits(20)	1.2	20/20(100%)	0/20(0%)	Plus/Minus
Query 1	CACCAGAGTAACAGTCTGAG	20		
Sbjct 520	CACCAGAGTAACAGTCTGAG	501		

Alineamiento 1. Entre la secuencia de mRN de distrofina humana de la accesión No BC150141.1 depositada en el NCBI del documento D4 y la SEQ ID NO: 714 de la solicitud.

En consecuencia, la persona normalmente versada en la materia estaría motivada a incluir tres copias de sgRNA con sus respectivos promotores como lo enseña del D2 en el ácido nucleico de D1 y usar diferentes sgRNA dirigidos a la secuencia de DMD, para así llegar al objeto de la reivindicación 17. Por lo cual se considera obvia.

Las reivindicaciones dependientes, 37, 38, 41, 53 y 56 no mencionan alguna característica que, junto con las características de la reivindicación independiente, aporte nivel inventivo al ácido nucleico de la reivindicación 17, por lo cual se considera que carece de nivel inventivo.

Teniendo en cuenta lo señalado en el artículo 18 de la Decisión 486 de 2000 de la Comisión de la Comunidad Andina, la reivindicación independiente 18 (NC2020/0005362 presentado el 29 de abril de 2020) refiere a: *“Un ácido nucleico que comprende tres copias de una secuencia que ARN guía simple (ARNgs) de DMD, en donde el ARNgs comprende un ARN guía de DMD y (...)”*. A continuación, se presenta la tabla comparativa entre el objeto reivindicado y los documentos encontrados en el estado de la técnica:

CARACTERÍSTICAS ESENCIALES	D1	D2
Un ácido nucleico que comprende:	Un ácido nucleico que comprende: (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Fig. 2).	Un ácido nucleico que comprende: (Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning)
tres copias de una secuencia que ARN guía simple (ARNgs) de DMD, en donde el ARNgs comprende un ARN guía de DMD	dos ARN guía de DMD diferentes, (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Pág. Págs. 2 a 7. Sección – Results, Figs. 1 a 4, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	tres copias del mismo ARN guía de EFgp, (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
y un andamiaje spCas9,	y un andamiaje spCas9 (Págs. 5 y 6, Secciones - Multiplex CRISPR/Cas9 Gene Editing to Delete Exon 51 y Dystrophin Rescue by a Multi-Exon Large Genomic Deletion , Fig. 3)	y un andamiaje spCas9 (Pág. 23, Sección – Molecular cloning)
en donde la secuencia del ARN guía de DMD comprende la SEQ ID NO: 714,	y en donde el ARNgs comprende cualquiera de las siguientes secuencias: CR1:GATTGGCTTTGATTTCCTA	No menciona

Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181

	CR2:GTGTAGAGTAAGTCAGC CTA CR3:GCCTACTCAGACTGTTA CTC CR4:GTTGGACAGAACTTACC GAC CR5:GCAGTTGCCTAAGAACT GGT CR6:GGGGCTCCACCCTCACG AGT CR7:GTTTGCTTCGCTATAAAA CG CR10:GCCAGGATGGCATTGG GCAG CR11:GCTGAATCTGCGGTGG CAGG CR12:GTTCTTTTGTTCTTCTA GCC CR13:GGAAAAGCTTGAGCAA GTCA CR14:GGAAGAGTTGCCCTG CGCC CR15:GACAAATCTCCAGTGG ATAA CR16:GTGTTTCTCAGGTAAAG CTC CR17:GGAAGGACCATTGAC GTTA CR18:GAACTGCTATTTAGTT TCC CR19:GCCAGCCACTCAGCCA GTGA CR20:GGTATGCTTTTCTGTTA AAG	
y en donde cada copia del ARNGs es expresada por su propio promotor.	en donde cada ARN guía es expresado por su propio promotor (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Pág. Págs. 2 a 7. Sección – Results, Figs. 1 a 4, Tabla 1,).	en donde cada ARN guía es expresado por su propio promotor (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).

D1 es considerado como el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 18, ya que divulga un ácido nucleico que comprende los componentes de un sistema CRISPR/Cas9 para restaurar la expresión del gen de la distrofina en células portadoras de mutaciones de distrofina que causan distrofia muscular de Duchenne (DMD), donde se diseñaron sgRNAs simples o multiplexados, incluyendo dos ARN guías DMD cuyas secuencias son idénticas y se encuentran dirigidos por su propio promotor, para restaurar el marco de lectura de la distrofina dirigiéndose al punto de acceso mutacional en los exones 45–55 con el fin de introducir cambios dentro de los exones o eliminar uno o más exones, así, después de la edición de genes en mioblastos de pacientes con DMD, la expresión de distrofina fue restaurado *in vitro*. Así mismo, se logró detectar la restauración de DMD *in vivo* después del trasplante de células de pacientes en ratones inmunodeficientes, concluyendo que la edición de genes multiplex con un sistema CRISPR/Cas9 facilitan la generación de una solo gran delección que puede corregir hasta el 62% de las mutaciones de DMD (Abstract, Págs. 2 a 12).

Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181

Además, D1 divulga que los promotores del primer sgRNA y el segundo sgRNA son idénticos el cual es un promotor musculo esquelético hU6 (Fig, 2), siendo el sitio de corte y empalme en la distrofina el sitio del aceptor de corte y empalme 5' del exón 51 y el ácido nucleico que contiene los elementos de un sistema CRISPR CAS9 también contiene un sitio de andamiaje spCAS9 (Págs. 4 y 5, Sección – Results).

La diferencia entre la invención definida entre la reivindicación 18 y el ácido nucleico divulgado en D1, consiste en que las tres secuencias de sgRNA DMD sean copias y en que la secuencia sea la SEQ ID NO: 714.

No hay evidencia de que el incluir específicamente tres secuencias de sgRNA idénticas DMD y que la secuencia sea la SEQ ID NO: 714, proporcione un ácido nucleico con algún efecto técnico diferente al que ya proporcionaba el objeto de D1, puesto que un ácido nucleico que compone un sistema de CRISPR CAS9 para la omisión de exones de DMD con sgRNAs que tienen su propio promotor y con diferentes opciones de sgRNA ya había sido previsto en dicho documento (Abstract, Págs. 2 a 12).

Por lo tanto, el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: ¿Cómo modificar el ácido nucleico conocido en D1 con el fin de proporcionar otro ácido nucleico alternativo?

Sin embargo, el incluir tres copias de un sgRNA unidas a tres promotores en un ácido nucleico en un sistema de CRISPR-CAS9, está divulgado en D2 que se refiere a un ácido nucleico que comprende los componentes de un sistema de CRISPR CAS9 optimizado para la eliminación de genes inducibles en un solo paso, sean genes multiplexados o individuales estrictamente controlados en hPSC (células humanas pluripotentes) y en una amplia variedad de células diferenciadas. Así mismo, divulga líneas hESC (células madres embrionarias humanas) en las que un gen reportero fluorescente puede ser eliminado de manera inducible, para los cual se dirigió a las hESC con el EGFPd2 (Proteína verde fluorescente mejorada), un sgRNA (dirigido contra EGFPd2) y un gen constitutivo de Cas9, donde la coexpresión de dos o tres copias del mismo casete de ARN guía de EGFP del mismo locus AAVS1 (sitio de inserción 1 de adenovirus en el genoma humano) fue suficiente para aumentar significativamente la velocidad y la eficiencia de la desactivación inducible de EGFPd2 en todas las sublíneas clonales analizadas (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figuras 7D y 8S).

Adicionalmente, la SEQ ID NO: 714 ha sido previamente reportada y se encuentra depositada en el NCBI bajo la accesión BC150141.1 (alineamiento 1).

En consecuencia, la persona normalmente versada en la materia estaría motivada a incluir tres copias de sgRNA con sus respectivos promotores como lo enseña del D2 en el ácido nucleico de D1 y usar diferentes sgRNA dirigidos a la secuencia de DMD, para así llegar al objeto de la reivindicación 18. Por lo cual se considera obvia.

Las reivindicaciones dependientes, 37, 38, 41, 53 y 56 no mencionan alguna característica que, junto con las características de la reivindicación independiente, aporte nivel inventivo al ácido nucleico de la reivindicación 18, por lo cual se considera que carece de nivel inventivo.



Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181

Teniendo en cuenta lo señalado en el artículo 18 de la Decisión 486 de 2000 de la Comisión de la Comunidad Andina, la reivindicación independiente 19 (NC2020/0005362 presentado el 29 de abril de 2020) refiere a: *“Un ácido nucleico que comprende tres copias de una secuencia que codifica ARN guía simple (ARNgs) de DMD, en donde el ARNgs comprende un ARN guía de DMD y (...)”*. A continuación, se presenta la tabla comparativa entre el objeto reivindicado y los documentos encontrados en el estado de la técnica:

CARACTERÍSTICAS ESENCIALES	D1	D2
Un ácido nucleico que comprende:	Un ácido nucleico que comprende: (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Fig. 2).	Un ácido nucleico que comprende: (Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning)
tres copias de una secuencia que codifica ARN guía simple (ARNgs) de DMD, en donde el ARNgs comprende un ARN guía de DMD	dos ARN guía de DMD diferentes, (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Pág. Págs. 2 a 7. Sección – Results, Figs. 1 a 4, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	tres copias del mismo ARN guía de EFGP, (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
y andamiaje spCas9,	y un andamiaje spCas9 (Págs. 5 y 6, Secciones - Multiplex CRISPR/Cas9 Gene Editing to Delete Exon 51 y Dystrophin Rescue by a Multi-Exon Large Genomic Deletion , Fig. 3)	y un andamiaje spCas9 (Pág. 23, Sección – Molecular cloning)
en donde la secuencia del ARN guía de DMD comprende la SEQ ID NO: 714,	y en donde el ARNgs comprende cualquiera de las siguientes secuencias: CR1:GATTGGCTTTGATTTCCTA CR2:GTGTAGAGTAAGTCAGCTA CR3:GCCTACTCAGACTGTCTC CR4:GTTGGACAGAACTTACCGAC CR5:GCAGTTGCCTAAGAACTGGT CR6:GGGGCTCCACCCTCACGAGT CR7:GTTTGCTTCGCTATAAAACG CR10:GCCAGGATGGCATTGGGCAG CR11:GCTGAATCTGCGGTGGCAGG CR12:GTTCTTTTGTTCTTCTAGCC CR13:GGAAAAGCTTGAGCAAGTCA CR14:GGAAGAGTTGCCCTGCGCC CR15:GACAAATCTCCAGTGGATAA	No menciona

Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181

	CR16:GTGTTTCTCAGGTAAAG CTC CR17:GGAAGGACCATTTGAC GTTA CR18:GAACTGCTATTTTCAGTT TCC CR19:GCCAGCCACTCAGCCA GTGA CR20:GGTATGCTTTTCTGTTA AAG	
y en donde una copia del ARNGs es expresada por un promotor U6, una copia del ARNGs es expresada por un promotor H1, y una copia del ARNGs es expresada por un promotor 7SK	los promotores del primer sgRNA y el segundo sgRNA son idénticos el cual es un promotor musculo esquelético hU6 (Fig, 2).	en donde cada ARN guía es expresado por su propio promotor (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).

D1 es considerado como el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 19, ya que divulga un ácido nucleico que comprende los componentes de un sistema CRISPR/Cas9 para restaurar la expresión del gen de la distrofina en células portadoras de mutaciones de distrofina que causan distrofia muscular de Duchenne (DMD), donde se diseñaron sgRNAs simples o multiplexados, incluyendo dos ARN guías DMD cuyas secuencias son idénticas y se encuentran dirigidos por su propio promotor, para restaurar el marco de lectura de la distrofina dirigiéndose al punto de acceso mutacional en los exones 45–55 con el fin de introducir cambios dentro de los exones o eliminar uno o más exones, así, después de la edición de genes en mioblastos de pacientes con DMD, la expresión de distrofina fue restaurado *in vitro*. Así mismo, se logró detectar la restauración de DMD *in vivo* después del trasplante de células de pacientes en ratones inmunodeficientes, concluyendo que la edición de genes multiplex con un sistema CRISPR/Cas9 facilitan la generación de una solo gran delección que puede corregir hasta el 62% de las mutaciones de DMD (Abstract, Págs. 2 a 12).

Además, D1 divulga que los promotores del primer sgRNA y el segundo sgRNA son idénticos el cual es un promotor musculo esquelético hU6 (Fig, 2), siendo el sitio de corte y empalme en la distrofina el sitio del aceptor de corte y empalme 5´ del exón 51 y el ácido nucleico que contiene los elementos de un sistema CRISPR CAS9 también contiene un sitio de andamiaje spCAS9 (Págs. 4 y 5, Sección – Results).

La diferencia entre la invención definida entre la reivindicación 19 y el ácido nucleico divulgado en D1, consiste en que las tres secuencias de sgRNA DMD sean copias y en que la secuencia sea la SEQ ID NO: 714 y que los tres promotores sean diferentes.

No hay evidencia de que el incluir específicamente tres secuencias de sgRNA idénticas DMD cuya secuencia es la SEQ ID NO: 714 y tres promotores distintos, proporcione un ácido nucleico con algún efecto técnico diferente al que ya proporcionaba el objeto de D1, puesto que un ácido nucleico que compone un sistema de CRISPR CAS9 para la omisión de exones de DMD con sgRNAs que tienen su propio promotor y con diferentes opciones de sgRNA ya había sido previsto en dicho documento (Abstract, Págs. 2 a 12).

Por lo tanto, el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: ¿Cómo modificar el ácido nucleico conocido en D1 con el fin de proporcionar otro ácido nucleico alternativo?

Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181

Sin embargo, el incluir tres copias de un sgRNA unidas a tres promotores en un ácido nucleico en un sistema de CRISPR-CAS9, está divulgado en D2 que se refiere a un ácido nucleico que comprende los componentes de un sistema de CRISPR CAS9 optimizado para la eliminación de genes inducibles en un solo paso, sean genes multiplexados o individuales estrictamente controlados en hPSC (células humanas pluripotentes) y en una amplia variedad de células diferenciadas. Así mismo, divulga líneas hESC (células madres embrionarias humanas) en las que un gen reportero fluorescente puede ser eliminado de manera inducible, para los cual se dirigió a las hESC con el EGFPd2 (Proteína verde fluorescente mejorada), un sgRNA (dirigido contra EGFPd2) y un gen constitutivo de Cas9, donde la coexpresión de dos o tres copias del mismo casete de ARN guía de EGFP del mismo locus AAVS1 (sitio de inserción 1 de adenovirus en el genoma humano) fue suficiente para aumentar significativamente la velocidad y la eficiencia de la desactivación inducible de EGFPd2 en todas las sublíneas clonales analizadas (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figuras 7D y 8S).

Así mismo, los promotores 7SK, U6 y H1 están ampliamente divulgados en la literatura para su uso en el desarrollo de vectores para terapia génica basada en RNAi con el fin de eliminar a largo plazo genes diana, de esta forma, los sistemas de expresión basados en vectores a menudo utilizan promotores de ARN polimerasa III (pol III), incluidos U6, H1 y 7SK, para impulsar la expresión de ARN⁵.

En consecuencia, la persona normalmente versada en la materia estaría motivada a incluir tres copias de sgRNA con sus respectivos promotores como lo enseña del D2 en el ácido nucleico de D1 y tres copias del mismo sgRNA dirigidos a la secuencia de DMD donde cada uno puede llevar un promotor diferente, para así llegar al objeto de la reivindicación 19. Por lo cual se considera obvia.

Las reivindicaciones dependientes, 37, 38, 41, 53 y 56 no mencionan alguna característica que, junto con las características de la reivindicación independiente, aporte nivel inventivo al ácido nucleico de la reivindicación 19, por lo cual se considera que carece de nivel inventivo.

Teniendo en cuenta lo señalado en el artículo 18 de la Decisión 486 de 2000 de la Comisión de la Comunidad Andina, la reivindicación independiente 20 (NC2020/0005362 presentado el 29 de abril de 2020) refiere a: *“Un ácido nucleico que comprende tres copias de una secuencia que codifica ARN guía simple (ARNgs) de DMD, en donde la secuencia comprende la SEQ ID NO: 762, en donde cada copia del ARN guía de DMD es expresada por su propio promotor (...)”*. A continuación, se presenta la tabla comparativa entre el objeto reivindicado y los documentos encontrados en el estado de la técnica:

CARACTERÍSTICAS ESENCIALES	D1	D2
Un ácido nucleico que comprende:	Un ácido nucleico que comprende: (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Fig. 2).	Un ácido nucleico que comprende: (Págs, 23 a 28

⁵ Ni, W., et al. (2012). Sheep 7SK promoter for short hairpin RNA expression. *Electronic Journal of Biotechnology*, 15(2), 10. Recuperado desde: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-34582012000200010



Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181

		material suplementario sección – Molecular cloning)
tres copias de una secuencia que codifica ARN guía simple (ARNgs) de DMD,	dos ARN guía de DMD diferentes, (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Pág. Págs. 2 a 7. Sección – Results, Figs. 1 a 4, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	tres copias del mismo ARN guía de EFGP, (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
en donde la secuencia comprende la SEQ ID NO: 762,	y en donde el ARNgs comprende cualquiera de las siguientes secuencias: CR1:GATTGGCTTTGATTTCCCTA CR2:GTGTAGAGTAAGTCAGCTA CR3:GCCTACTCAGACTGTCTC CR4:GTTGGACAGAACTTACCGAC CR5:GCAGTTGCCTAAGAACTGGT CR6:GGGGCTCCACCCTCACGAGT CR7:GTTTGCTTCGCTATAAAACG CR10:GCCAGGATGGCATTGGGCAG CR11:GCTGAATCTGCGGTGGCAGG CR12:GTTCTTTTGTTCTTCTAGCC CR13:GGAAAAGCTTGAGCAAGTCA CR14:GGAAGAGTTGCCCTGCGCC CR15:GACAAATCTCCAGTGGATAA CR16:GTGTTTCTCAGGTAAAGCTC CR17:GGAAGGACCATTGACGTTA CR18:GAACTGCTATTTTCAGTTTCC CR19:GCCAGCCACTCAGCCAGTGA CR20:GGTATGCTTTTCTGTTAAG	No menciona
en donde cada copia del ARN guía de DMD es expresada por su propio promotor	los promotores del primer sgRNA y el segundo sgRNA son idénticos el cual es un promotor musculo esquelético hU6 (Fig, 2).	en donde cada ARN guía es expresado por su propio promotor (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).



Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181

D1 es considerado como el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 20, ya que divulga un ácido nucleico que comprende los componentes de un sistema CRISPR/Cas9 para restaurar la expresión del gen de la distrofina en células portadoras de mutaciones de distrofina que causan distrofia muscular de Duchenne (DMD), donde se diseñaron sgRNAs simples o multiplexados, incluyendo dos ARN guías DMD cuyas secuencias son idénticas y se encuentran dirigidos por su propio promotor, para restaurar el marco de lectura de la distrofina dirigiéndose al punto de acceso mutacional en los exones 45–55 con el fin de introducir cambios dentro de los exones o eliminar uno o más exones, así, después de la edición de genes en mioblastos de pacientes con DMD, la expresión de distrofina fue restaurado *in vitro*. Así mismo, se logró detectar la restauración de DMD *in vivo* después del trasplante de células de pacientes en ratones inmunodeficientes, concluyendo que la edición de genes multiplex con un sistema CRISPR/Cas9 facilitan la generación de una sola gran delección que puede corregir hasta el 62% de las mutaciones de DMD (Abstract, Págs. 2 a 12).

Además, D1 divulga que los promotores del primer sgRNA y el segundo sgRNA son idénticos el cual es un promotor musculo esquelético hU6 (Fig, 2), siendo el sitio de corte y empalme en la distrofina el sitio del aceptor de corte y empalme 5' del exón 51 y el ácido nucleico que contiene los elementos de un sistema CRISPR CAS9 también contiene un sitio de andamiaje spCAS9 (Págs. 4 y 5, Sección – Results).

La diferencia entre la invención definida entre la reivindicación 20 y el ácido nucleico divulgado en D1, consiste en que las tres secuencias de sgRNA DMD sean copias y en que la secuencia sea la SEQ ID NO: 762 y que los tres promotores sean diferentes.

No hay evidencia de que el incluir específicamente tres secuencias de sgRNA idénticas DMD cuya secuencia es la SEQ ID NO: 762 y tres promotores distintos, proporcione un ácido nucleico con algún efecto técnico diferente al que ya proporcionaba el objeto de D1, puesto que un ácido nucleico que compone un sistema de CRISPR CAS9 para la omisión de exones de DMD con sgRNAs que tienen su propio promotor y con diferentes opciones de sgRNA ya había sido previsto en dicho documento (Abstract, Págs. 2 a 12).

Por lo tanto, el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: ¿Cómo modificar el ácido nucleico conocido en D1 con el fin de proporcionar otro ácido nucleico alternativo?

Sin embargo, el incluir tres copias de un sgRNA unidas a tres promotores en un ácido nucleico en un sistema de CRISPR-CAS9, está divulgado en D2 que se refiere a un ácido nucleico que comprende los componentes de un sistema de CRISPR CAS9 optimizado para la eliminación de genes inducibles en un solo paso, sean genes multiplexados o individuales estrictamente controlados en hPSC (células humanas pluripotentes) y en una amplia variedad de células diferenciadas. Así mismo, divulga líneas hESC (células madres embrionarias humanas) en las que un gen reportero fluorescente puede ser eliminado de manera inducible, para los cual se dirigió a las hESC con el EGFPd2 (Proteína verde fluorescente mejorada), un sgRNA (dirigido contra EGFPd2) y un gen constitutivo de Cas9, donde la coexpresión de dos o tres copias del mismo casete de ARN guía de EGFP del mismo locus AAVS1 (sitio de inserción 1 de adenovirus en el genoma humano) fue suficiente para aumentar significativamente la velocidad y la eficiencia de la desactivación inducible de EGFPd2 en todas las sublíneas clonales analizadas (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figuras 7D y 8S).



Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181

En consecuencia, la persona normalmente versada en la materia estaría motivada a incluir tres copias de sgRNA con sus respectivos promotores como lo enseña del D2 en el ácido nucleico de D1 y tres copias del mismo sgRNA dirigidos a la secuencia de DMD donde cada uno puede llevar un promotor diferente, para así llegar al objeto de la reivindicación 20. Por lo cual se considera obvia.

Las reivindicaciones dependientes, 37, 38, 41, 53 y 56 no mencionan alguna característica que, junto con las características de la reivindicación independiente, aporte nivel inventivo al ácido nucleico de la reivindicación 20, por lo cual se considera que carece de nivel inventivo.

Teniendo en cuenta lo señalado en el artículo 18 de la Decisión 486 de 2000 de la Comisión de la Comunidad Andina, la reivindicación independiente 21 (NC2020/0005362 presentado el 29 de abril de 2020) refiere a: *“Un ácido nucleico que comprende tres copias de una secuencia que codifica ARN guía simple (ARNgs) de DMD (...)”*. A continuación, se presenta la tabla comparativa entre el objeto reivindicado y los documentos encontrados en el estado de la técnica:

CARACTERÍSTICAS ESENCIALES	D1	D2
Un ácido nucleico que comprende:	Un ácido nucleico que comprende: (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Fig. 2).	Un ácido nucleico que comprende: (Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning)
tres copias de una secuencia que codifica ARN guía simple (ARNgs) de DMD, en donde el ARNgs comprende un ARN guía de DMD	dos ARN guía de DMD diferentes, (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Pág. Págs. 2 a 7. Sección – Results, Figs. 1 a 4, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	tres copias del mismo ARN guía de EFGP, (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
y un andamiaje spCas9,	y un andamiaje spCas9 (Págs. 5 y 6, Secciones - Multiplex CRISPR/Cas9 Gene Editing to Delete Exon 51 y Dystrophin Rescue by a Multi-Exon Large Genomic Deletion , Fig. 3)	y un andamiaje spCas9 (Pág. 23, Sección – Molecular cloning)
en donde la secuencia del ARN guía de DMD comprende la SEQ ID NO: 762,	y en donde el ARNgs comprende cualquiera de las siguientes secuencias: CR1:GATTGGCTTTGATTTCCCTA CR2:GTGTAGAGTAAGTCAGCTA CR3:GCCTACTCAGACTGTCTC CR4:GTTGGACAGAACTTACCGAC CR5:GCAGTTGCCTAAGAACTGGT CR6:GGGGCTCCACCCTCACGAGT CR7:GTTTGCTTCGCTATAAAACG	No menciona

Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181

	CR10:GCCAGGATGGCATTGG GCAG CR11:GCTGAATCTGCGGTGG CAGG CR12:GTTCTTTTGTTCCTTCTA GCC CR13:GGAAAAGCTTGAGCAA GTCA CR14:GGAAGAGTTGCCCTG CGCC CR15:GACAAATCTCCAGTGG ATAA CR16:GTGTTTCTCAGGTAAAG CTC CR17:GGAAGGACCATTTGAC GTTA CR18:GAACTGCTATTTTCAGTT TCC CR19:GCCAGCCACTCAGCCA GTGA CR20:GGTATGCTTTTCTGTTA AAG	
y en donde cada copia del ARNGs es expresada por su propio promotor.	los promotores del primer sgRNA y el segundo sgRNA son idénticos el cual es un promotor musculo esquelético hU6 (Fig, 2).	en donde cada ARN guía es expresado por su propio promotor (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).

D1 es considerado como el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 21, ya que divulga un ácido nucleico que comprende los componentes de un sistema CRISPR/Cas9 para restaurar la expresión del gen de la distrofina en células portadoras de mutaciones de distrofina que causan distrofia muscular de Duchenne (DMD), donde se diseñaron sgRNAs simples o multiplexados, incluyendo dos ARN guías DMD cuyas secuencias son idénticas y se encuentran dirigidos por su propio promotor, para restaurar el marco de lectura de la distrofina dirigiéndose al punto de acceso mutacional en los exones 45–55 con el fin de introducir cambios dentro de los exones o eliminar uno o más exones, así, después de la edición de genes en mioblastos de pacientes con DMD, la expresión de distrofina fue restaurado *in vitro*. Así mismo, se logró detectar la restauración de DMD *in vivo* después del trasplante de células de pacientes en ratones inmunodeficientes, concluyendo que la edición de genes multiplex con un sistema CRISPR/Cas9 facilitan la generación de una solo gran delección que puede corregir hasta el 62% de las mutaciones de DMD (Abstract, Págs. 2 a 12).

Además, D1 divulga que los promotores del primer sgRNA y el segundo sgRNA son idénticos el cual es un promotor musculo esquelético hU6 (Fig, 2), siendo el sitio de corte y empalme en la distrofina el sitio del aceptor de corte y empalme 5´del exón 51 y el ácido nucleico que contiene los elementos de un sistema CRISPR CAS9 también contiene un sitio de andamiaje spCAS9 (Págs. 4 y 5, Sección – Results).

La diferencia entre la invención definida entre la reivindicación 21 y el ácido nucleico divulgado en D1, consiste en que las tres secuencias de sgRNA DMD sean copias y en que la secuencia sea la SEQ ID NO: 762 y que los tres promotores sean diferentes.

Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181
No hay evidencia de que el incluir específicamente tres secuencias de sgRNA idénticas DMD cuya secuencia es la SEQ ID NO: 762 y tres promotores distintos, proporcione un ácido nucleico con algún efecto técnico diferente al que ya proporcionaba el objeto de D1, puesto que un ácido nucleico que compone un sistema de CRISPR CAS9 para la omisión de exones de DMD con sgRNAs que tienen su propio promotor y con diferentes opciones de sgRNA ya había sido previsto en dicho documento (Abstract, Págs. 2 a 12).

Por lo tanto, el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: ¿Cómo modificar el ácido nucleico conocido en D1 con el fin de proporcionar otro ácido nucleico alternativo?

Sin embargo, el incluir tres copias de un sgRNA unidas a tres promotores en un ácido nucleico en un sistema de CRISPR-CAS9, está divulgado en D2 que se refiere a un ácido nucleico que comprende los componentes de un sistema de CRISPR CAS9 optimizado para la eliminación de genes inducibles en un solo paso, sean genes multiplexados o individuales estrictamente controlados en hPSC (células humanas pluripotentes) y en una amplia variedad de células diferenciadas. Así mismo, divulga líneas hESC (células madres embrionarias humanas) en las que un gen reportero fluorescente puede ser eliminado de manera inducible, para los cual se dirigió a las hESC con el EGFPd2 (Proteína verde fluorescente mejorada), un sgRNA (dirigido contra EGFPd2) y un gen constitutivo de Cas9, donde la coexpresión de dos o tres copias del mismo casete de ARN guía de EGFP del mismo locus AAVS1 (sitio de inserción 1 de adenovirus en el genoma humano) fue suficiente para aumentar significativamente la velocidad y la eficiencia de la desactivación inducible de EGFPd2 en todas las sublíneas clonales analizadas (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figuras 7D y 8S).

En consecuencia, la persona normalmente versada en la materia estaría motivada a incluir tres copias de sgRNA con sus respectivos promotores como lo enseña del D2 en el ácido nucleico de D1 y tres copias del mismo sgRNA dirigidos a la secuencia de DMD donde cada uno puede llevar un promotor diferente, para así llegar al objeto de la reivindicación 21. Por lo cual se considera obvia.

Las reivindicaciones dependientes, 37, 38 y 41 no mencionan alguna característica que, junto con las características de la reivindicación independiente, aporte nivel inventivo al ácido nucleico de la reivindicación 21, por lo cual se considera que carece de nivel inventivo.

Teniendo en cuenta lo señalado en el artículo 18 de la Decisión 486 de 2000 de la Comisión de la Comunidad Andina, la reivindicación independiente 22 (NC2020/0005362 presentado el 29 de abril de 2020) refiere a: *“Un ácido nucleico que comprende tres copias de una secuencia que codifica ARN guía simple (ARNgs) de DMD, en donde (...)”*. A continuación, se presenta la tabla comparativa entre el objeto reivindicado y los documentos encontrados en el estado de la técnica:

CARACTERÍSTICAS ESENCIALES	D1	D2
Un ácido nucleico que comprende:	Un ácido nucleico que comprende: (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Fig. 2).	Un ácido nucleico que comprende: (Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning)



Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181

tres copias de una secuencia que codifica ARN guía simple (ARNgs) de DMD, en donde el ARNgs comprende un ARN guía de DMD	dos ARN guía de DMD diferentes, (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Pág. Págs. 2 a 7. Sección – Results, Figs. 1 a 4, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	tres copias del mismo ARN guía de EFGP, (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
y un andamiaje spCas9,	y un andamiaje spCas9 (Págs. 5 y 6, Secciones - Multiplex CRISPR/Cas9 Gene Editing to Delete Exon 51 y Dystrophin Rescue by a Multi-Exon Large Genomic Deletion , Fig. 3)	y un andamiaje spCas9 (Pág. 23, Sección – Molecular cloning)
en donde la secuencia del ARN guía de DMD comprende la SEQ ID NO: 762,	y en donde el ARNgs comprende cualquiera de las siguientes secuencias: CR1:GATTGGCTTTGATTTCCC TA CR2:GTGTAGAGTAAGTCAGC CTA CR3:GCCTACTCAGACTGTTA CTC CR4:GTTGGACAGAACTTACC GAC CR5:GCAGTTGCCTAAGAACT GGT CR6:GGGGCTCCACCCTCACG AGT CR7:GTTTGCTTCGCTATAAAA CG CR10:GCCAGGATGGCATTGG GCAG CR11:GCTGAATCTGCGGTGG CAGG CR12:GTTCTTTTGTCTTCTA GCC CR13:GGAAAAGCTTGAGCAA GTCA CR14:GGAAGAGTTGCCCTG CGCC CR15:GACAAATCTCCAGTGG ATAA CR16:GTGTTTCTCAGGTAAAG CTC CR17:GGAAGGACCATTTGAC GTTA CR18:GAACTGCTATTTAGTT TCC CR19:GCCAGCCACTCAGCCA GTGA CR20:GGTATGCTTTTCTGTTA AAG	No menciona
y en donde una copia del ARNgs es expresada por un promotor U6, una copia del ARNgs es expresada por un promotor H1, y una copia del ARNgs es expresada por un promotor 7SK.	los promotores del primer sgRNA y el segundo sgRNA son idénticos el cual es un promotor musculo esquelético hU6 (Fig, 2).	en donde cada ARN guía es expresado por su propio promotor (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección –

Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181

		Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
--	--	-------------------------------------

D1 es considerado como el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 22, ya que divulga un ácido nucleico que comprende los componentes de un sistema CRISPR/Cas9 para restaurar la expresión del gen de la distrofina en células portadoras de mutaciones de distrofina que causan distrofia muscular de Duchenne (DMD), donde se diseñaron sgRNAs simples o multiplexados, incluyendo dos ARN guías DMD cuyas secuencias son idénticas y se encuentran dirigidos por su propio promotor, para restaurar el marco de lectura de la distrofina dirigiéndose al punto de acceso mutacional en los exones 45–55 con el fin de introducir cambios dentro de los exones o eliminar uno o más exones, así, después de la edición de genes en mioblastos de pacientes con DMD, la expresión de distrofina fue restaurado *in vitro*. Así mismo, se logró detectar la restauración de DMD *in vivo* después del trasplante de células de pacientes en ratones inmunodeficientes, concluyendo que la edición de genes multiplex con un sistema CRISPR/Cas9 facilitan la generación de una solo gran delección que puede corregir hasta el 62% de las mutaciones de DMD (Abstract, Págs. 2 a 12).

Además, D1 divulga que los promotores del primer sgRNA y el segundo sgRNA son idénticos el cual es un promotor musculo esquelético hU6 (Fig, 2), siendo el sitio de corte y empalme en la distrofina el sitio del aceptor de corte y empalme 5´ del exón 51 y el ácido nucleico que contiene los elementos de un sistema CRISPR CAS9 también contiene un sitio de andamiaje spCAS9 (Págs. 4 y 5, Sección – Results).

La diferencia entre la invención definida entre la reivindicación 22 y el ácido nucleico divulgado en D1, consiste en que las tres secuencias de sgRNA DMD sean copias y en que la secuencia sea la SEQ ID NO: 762 y que los tres promotores sean diferentes.

No hay evidencia de que el incluir específicamente tres secuencias de sgRNA idénticas DMD cuya secuencia es la SEQ ID NO: 762 y tres promotores distintos, proporcione un ácido nucleico con algún efecto técnico diferente al que ya proporcionaba el objeto de D1, puesto que un ácido nucleico que compone un sistema de CRISPR CAS9 para la omisión de exones de DMD con sgRNAs que tienen su propio promotor y con diferentes opciones de sgRNA ya había sido previsto en dicho documento (Abstract, Págs. 2 a 12).

Por lo tanto, el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: ¿Cómo modificar el ácido nucleico conocido en D1 con el fin de proporcionar otro ácido nucleico alternativo?

Sin embargo, el incluir tres copias de un sgRNA unidas a tres promotores en un ácido nucleico en un sistema de CRISPR-CAS9, está divulgado en D2 que se refiere a un ácido nucleico que comprende los componentes de un sistema de CRISPR CAS9 optimizado para la eliminación de genes inducibles en un solo paso, sean genes multiplexados o individuales estrictamente controlados en hPSC (células humanas pluripotentes) y en una amplia variedad de células diferenciadas. Así mismo, divulga líneas hESC (células madres embrionarias humanas) en las que un gen reportero fluorescente puede ser eliminado de manera inducible, para los cual se dirigió a las hESC con el EGFPd2 (Proteína verde fluorescente mejorada), un sgRNA (dirigido contra EGFPd2) y un gen constitutivo de Cas9, donde la coexpresión de dos o tres copias del mismo casete de ARN guía de EGFP del mismo locus AAVS1 (sitio de inserción 1 de adenovirus en el genoma humano) fue suficiente para aumentar significativamente la velocidad y la eficiencia de la desactivación inducible de EGFPd2 en todas las sublíneas clonales analizadas (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible

Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181
CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figuras 7D y 8S).

En consecuencia, la persona normalmente versada en la materia estaría motivada a incluir tres copias de sgRNA con sus respectivos promotores como lo enseña el D2 en el ácido nucleico de D1 y tres copias del mismo sgRNA dirigidos a la secuencia de DMD donde cada uno puede llevar un promotor diferente, para así llegar al objeto de la reivindicación 22. Por lo cual se considera obvia.

Las reivindicaciones dependientes, 37, 38, 41, 53 y 56 no mencionan alguna característica que, junto con las características de la reivindicación independiente, aporte nivel inventivo al ácido nucleico de la reivindicación 22, por lo cual se considera que carece de nivel inventivo.

Teniendo en cuenta lo señalado en el artículo 18 de la Decisión 486 de 2000 de la Comisión de la Comunidad Andina, la reivindicación independiente 23 (NC2020/0005362 presentado el 29 de abril de 2020) refiere a: *“Un ácido nucleico que comprende: una secuencia que codifica un ARN guía simple (ARNgs) de DMD y un promotor, (...)”*. A continuación, se presenta la tabla comparativa entre el objeto reivindicado y los documentos encontrados en el estado de la técnica:

CARACTERÍSTICAS ESENCIALES	D1	D3
Un ácido nucleico que comprende:	Un ácido nucleico que comprende: (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Fig. 2).	Un ácido nucleico que comprende: (Reivs. 1 a 15).
una secuencia que codifica un ARN guía simple (ARNgs) de DMD y un promotor,	una secuencia que codifica un ARN guía simple (ARNgs) de DMD y un promotor, (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Pág. Págs. 2 a 7. Sección – Results, Figs. 1 a 4, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	Una secuencia entre 8 y 30 nucleótidos dirigida a DMD (Reivs. 1 a ,15, Tabla 8).
en donde el promotor dirige la expresión del ARNgs	en donde el promotor dirige la expresión del sgARN (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Pág. Págs. 2 a 7. Sección – Results, Figs. 1 a 4, Tabla 1).	No menciona
y en donde el ARNgs comprende la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NOS: 60 a 761, 763 a 864, o 947.	y en donde el ARNgs comprende cualquiera de las siguientes secuencias: CR1:GATTGGCTTTGATTTCCTA CR2:GTGTAGAGTAAGTCAGCTA CR3:GCCTACTCAGACTGTCTC CR4:GTTGGACAGAACTTACCGAC CR5:GCAGTTGCCTAAGAACTGGT CR6:GGGGCTCCACCCTCACGAGT CR7:GTTTGCTTCGCTATAAAACG CR10:GCCAGGATGGCATTGGGCAG	En donde las secuencias de nucleótidos están comprendidas en la SEQ ID NO: 5604 que codifica para DMD (Tabla 7). Las SEQ ID NOS: 60 a 761, 763 a 863 y 947 están comprendidas de la solicitud están comprendidas en SEQ ID NO: 5604 con un 100% de cobertura e identidad (Alineamiento 1).

Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181

	CR11:GCTGAATCTGCGGTGG CAGG CR12:GTTCTTTTGTTCTTCTA GCC CR13:GGAAAAGCTTGAGCAA GTCA CR14:GGAAGAGTTGCCCTG CGCC CR15:GACAAATCTCCAGTGG ATAA CR16:GTGTTTCTCAGGTAAAG CTC CR17:GGAAGGACCATTGAC GTTA CR18:GAACTGCTATTTAGTT TCC CR19:GCCAGCCACTCAGCCA GTGA CR20:GGTATGCTTTTCTGTTA AAG CR21:GCTCCTGGACTGACCA CTAT CR22:GGAACAGAGGCGTCCC CAGT CR23:GGAGGCTAGAACAATC ATTA CR24:GACAAGAACACCTTCA GAAC CR25:GGGTTTCTGTGATTTTC TTT CR26:GGGCCAAAGACCTCCG CCAG T CR27:GTTGGAGAAGCATTCA TAA (Tabla suplementaria 1).	
--	--	--

D1 es considerado como el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 23, ya que divulga un ácido nucleico que comprende los componentes de un sistema CRISPR/Cas9 para restaurar la expresión del gen de la distrofina en células portadoras de mutaciones de distrofina que causan distrofia muscular de Duchenne (DMD), donde se diseñaron sgRNAs simples o multiplexados, incluyendo dos ARN guías DMD cuyas secuencias son idénticas y se encuentran dirigidos por su propio promotor, para restaurar el marco de lectura de la distrofina dirigiéndose al punto de acceso mutacional en los exones 45–55 con el fin de introducir cambios dentro de los exones o eliminar uno o más exones, así, después de la edición de genes en mioblastos de pacientes con DMD, la expresión de distrofina fue restaurado *in vitro*. Así mismo, se logró detectar la restauración de DMD *in vivo* después del trasplante de células de pacientes en ratones inmunodeficientes, concluyendo que la edición de genes multiplex con un sistema CRISPR/Cas9 facilitan la generación de una solo gran delección que puede corregir hasta el 62% de las mutaciones de DMD (Abstract, Págs. 2 a 12).

Además, D1 divulga que los promotores del primer sgRNA y el segundo sgRNA son idénticos el cual es un promotor musculo esquelético hU6 (Fig, 2), siendo el sitio de corte y empalme en la distrofina el sitio del aceptor de corte y empalme 5´del exón 51 y el ácido nucleico que contiene los elementos de un sistema CRISPR CAS9 también contiene un sitio de andamiaje spCAS9 (Págs. 4 y 5, Sección – Results).



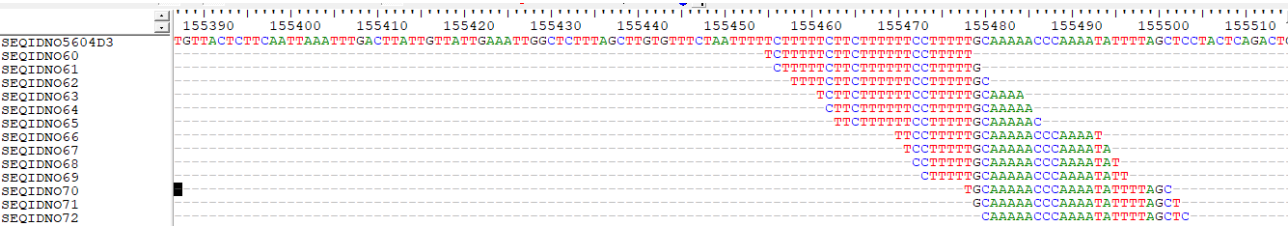
Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181
La diferencia entre la invención definida entre la reivindicación 23 y el ácido nucleico divulgado en D1, consiste en que las secuencias de los sgRNA, es decir, SEQ ID NOs: 60 a 761, 763 a 864, o 947.

No hay evidencia de que el incluir específicamente una secuencia de sgRNA de cualquiera de las SEQ ID NOs: 60 a 761, 763 a 864, o 947, proporcione un ácido nucleico con algún efecto técnico diferente al que ya proporcionaba el objeto de D1, puesto que un ácido nucleico que compone un sistema de CRISPR CAS9 para la omisión de exones de DMD con sgRNAs que tienen su propio promotor ya había sido previsto en dicho documento (Abstract, Págs. 2 a 12).

Por lo tanto, el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: ¿Cómo modificar el ácido nucleico conocido en D1 con el fin de proporcionar un ácido nucleico alternativo?

Sin embargo, el incluir las SEQ ID NO: 60 a 761, 763 y 941 en un ácido nucleico dirigido a DMD, ya está divulgado en D3 que se refiere a un ácido nucleico compuesto entre 8 y 18 nucleótidos que reactiva selectivamente genes en el cromosoma X inactivo (Xi) de una manera específica de locus como es el caso de genes asociados con la distrofia muscular de Duchenne, donde se pueden usar secuencias de nucleótidos idénticas a la proteína distrofina (Abstract, Reivs. 1 a 5). Específicamente, la mayoría de los sgRNA dirigidos a DMD de humano de la solicitud, ya se encuentran comprendidos con un 100% de cobertura e identidad dentro de la SEQ ID NO: 5604 de D3 que corresponde a DMD de humano (Alineamiento 2, a manera de ejemplo se presenta el alineamiento entre SEQ ID NO: 5604 de D3 y las SEQ ID NOs: 60 a 72 de la solicitud).



Alineamiento 2. Entre SEQ ID NO: 5604 de D3 y SEQ ID NOs: 60 a 72 de la solicitud.

En consecuencia, la persona normalmente versada en la materia estaría motivada a incluir sgRNA comprendidos en la SEQ ID NO: 5604 de DMD de D3 en el ácido nucleico de D1, para así llegar al objeto de la reivindicación 23. Por lo cual se considera obvia.

Las reivindicaciones dependientes 24 a 26, 37, 38, 41, 53 y 56 no mencionan alguna característica que, junto con las características de la reivindicación independiente, aporte nivel inventivo al ácido nucleico de la reivindicación 23, por lo cual se considera que carece de nivel inventivo.

Teniendo en cuenta lo señalado en el artículo 18 de la Decisión 486 de 2000 de la Comisión de la Comunidad Andina, la reivindicación independiente 27 (NC2020/0005362 presentado el 29 de abril de 2020) refiere a: *“Un ácido nucleico que comprende la secuencia que codifica un ARN guía simple (ARNgs) de DMD, en donde el ARNgs comprende un ARN guía de DMD y un andamiaje spCas9, en donde la secuencia del ARN guía de DMD comprende la SEQ ID NO: 714, y en donde el ARNgs es capaz de crear un solo corte en el exón 51 (...).”* A continuación, se presenta la tabla comparativa entre el objeto reivindicado y los documentos encontrados en el estado de la técnica:



Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181

CARACTERÍSTICAS ESENCIALES	D1	D4
Un ácido nucleico que comprende:	Un ácido nucleico que comprende: (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Fig. 2).	Un ácido nucleico que comprende: (Todo el documento)
la secuencia que codifica un ARN guía simple (ARNgs) de DMD, en donde el ARNgs comprende un ARN guía de DMD	una secuencia que codifica un ARN guía simple (ARNgs) de DMD y un promotor, (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Pág. Págs. 2 a 7. Sección – Results, Figs. 1 a 4, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	Una secuencia de nucleótidos incluido en una biblioteca de ADNc the Mammalian Gene Collection que fue obtenida de un conjunto diverso de tejidos y líneas celulares, el catálogo de bibliotecas de ADNc de MGC se puede acceder en http://mgc.nci.nih.gov (Pág. 1. Sección – Materials and methods).
y un andamiaje spCas9,	y un andamiaje spCas9 (Págs. 5 y 6, Secciones - Multiplex CRISPR/Cas9 Gene Editing to Delete Exon 51 y Dystrophin Rescue by a Multi-Exon Large Genomic Deletion , Fig. 3)	No menciona
en donde la secuencia del ARN guía de DMD comprende la SEQ ID NO: 714,	y en donde el ARNgs comprende cualquiera de las siguientes secuencias: CR1:GATTGGCTTTGATTTCCCTA CR2:GTGTAGAGTAAGTCAGCTA CR3:GCCTACTCAGACTGTCTC CR4:GTTGGACAGAACTTACCGAC CR5:GCAGTTGCCTAAGAACTGGT CR6:GGGGCTCCACCCTCACGAGT CR7:GTTTGCTTCGCTATAAAACG CR10:GCCAGGATGGCATTGGGCAG CR11:GCTGAATCTGCGGTGGCAGG CR12:GTTCTTTTGTCTTCTAGCC CR13:GGAAAAGCTTGAGCAAGTCA CR14:GGAAGAGTTGCCCCTGCGCC CR15:GACAAATCTCCAGTGGATAA CR16:GTGTTTCTCAGGTAAAGCTC CR17:GGAAGGACCATTGACGTTA CR18:GAACTGCTATTTCAAGTTCC CR19:GCCAGCCACTCAGCCAGTGA CR20:GGTATGCTTTTCTGTTAAG	En donde una de la secuencias de nucleótidos es la de distrofina humana con acceso del NCBI BC150141.1 la cual tiene un 100% de identidad y cobertura con la SEQ ID NO: 714 de la solicitud (Alineamiento 1).



Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181

	CR21:GCTCCTGGACTGACCA CTAT CR22:GGAACAGAGGCGTCCC CAGT CR23:GGAGGCTAGAACAAATC ATTA CR24:GACAAGAACACCTTCA GAAC CR25:GGGTTTCTGTGATTTTC TTT CR26:GGGCCAAAGACCTCCG CCAG T CR27:GTTGGAGAAGCATTCA TAA (Tabla suplementaria 1).	
y en donde el ARNGs es capaz de crear un solo corte en el exón 51	y en donde el ARNGs es capaz de crear un solo corte en el exón 51 (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Pág. Págs. 2 a 7. Sección – Results, Figs. 1 a 4, Tabla 1).	No menciona

D1 es considerado como el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 27, ya que divulga un ácido nucleico que comprende los componentes de un sistema CRISPR/Cas9 para restaurar la expresión del gen de la distrofina en células portadoras de mutaciones de distrofina que causan distrofia muscular de Duchenne (DMD), donde se diseñaron sgRNAs simples o multiplexados, incluyendo dos ARN guías DMD cuyas secuencias son idénticas y se encuentran dirigidos por su propio promotor, para restaurar el marco de lectura de la distrofina dirigiéndose al punto de acceso mutacional en los exones 45–55 con el fin de introducir cambios dentro de los exones o eliminar uno o más exones, así, después de la edición de genes en mioblastos de pacientes con DMD, la expresión de distrofina fue restaurado *in vitro*. Así mismo, se logró detectar la restauración de DMD *in vivo* después del trasplante de células de pacientes en ratones inmunodeficientes, concluyendo que la edición de genes multiplex con un sistema CRISPR/Cas9 facilitan la generación de una solo gran delección que puede corregir hasta el 62% de las mutaciones de DMD (Abstract, Págs. 2 a 12).

Además, D1 divulga que los promotores del primer sgRNA y el segundo sgRNA son idénticos el cual es un promotor musculo esquelético hU6 (Fig, 2), siendo el sitio de corte y empalme en la distrofina el sitio del aceptor de corte y empalme 5´ del exón 51 y el ácido nucleico que contiene los elementos de un sistema CRISPR CAS9 también contiene un sitio de andamiaje spCAS9 (Págs. 4 y 5, Sección – Results).

La diferencia entre la invención definida entre la reivindicación 27 y el ácido nucleico divulgado en D1, consiste en que la secuencia del sgRNA, es decir, SEQ ID NO: 714.

No hay evidencia de que el incluir específicamente una secuencia de sgRNA que sea la SEQ ID NO: 714 proporcione un ácido nucleico con algún efecto técnico diferente al que ya proporcionaba el objeto de D1, puesto que un ácido nucleico que compone un sistema de CRISPR CAS9 para realizar un solo corte en el exón 51 con un sgRNAs dirigido a DMD ya había sido previsto en dicho documento (Abstract, Págs. 2 a 12).

Por lo tanto, el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: ¿Cómo modificar el ácido nucleico conocido en D1 con el fin de proporcionar un ácido nucleico alternativo?



Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181

Sin embargo, el incluir las SEQ ID NO: 714 en un ácido nucleico dirigido a DMD, ya está divulgado en D4 que se refiere a la generación y análisis inicial de mas de 15000 secuencias de CDNA de longitud completa de humano y ratón bajo el programa Colección de genes de mamíferos (MGC por sus siglas en inglés) donde se lograron identificar 7800 genes de humano y fueron depositados en la base de datos pública del instituto nacional de salud (NHI) (Abstract, todo el documento). Se logro identificar las accesiones BC150141.1 del NCBI como asociado al gen de distrofina humana (DMD) con un 100% de cobertura e identidad con la SEQ ID NO. 714 de la solicitud (alineamiento 1).

En consecuencia, la persona normalmente versada en la materia estaría motivada a incluir un sgRNA con la secuencia de cDNA de DMD sugerida en D4 con accesión BC150141.1 del NCBI en el ácido nucleico de D1, para así llegar al objeto de la reivindicación 27. Por lo cual se considera obvia.

Las reivindicaciones dependientes, 37, 38, 41, 53 y 56 no mencionan alguna característica que, junto con las características de la reivindicación independiente, aporte nivel inventivo al ácido nucleico de la reivindicación 27, por lo cual se considera que carece de nivel inventivo.

Teniendo en cuenta lo señalado en el artículo 18 de la Decisión 486 de 2000 de la Comisión de la Comunidad Andina, la reivindicación independiente 28 (NC2020/0005362 presentado el 29 de abril de 2020) refiere a: *“Un ARN guía simple (ARNgs) de DMD, en donde el ARNgs comprende un ARN guía de DMD y un andamiaje spCas9, en donde la secuencia del ARN guía de DMD comprende la SEQ ID NO: 714, y donde el ARNgs es capaz de crear un solo corte en el exón 51. (...)”*. A continuación, se presenta la tabla comparativa entre el objeto reivindicado y los documentos encontrados en el estado de la técnica:

CARACTERÍSTICAS ESENCIALES	D1	D4
Un ARN guía simple (ARNgs) de DMD, en donde el ARNgs comprende	Un ARN guía simple (ARNgs) de DMD, en donde el ARNgs comprende (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Fig. 2).	Un ácido nucleico que comprende: (Todo el documento)
un ARN guía de DMD	un ARN guía de DMD, (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Pág. Págs. 2 a 7. Sección – Results, Figs. 1 a 4, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	Una secuencia de nucleótidos incluido en una biblioteca de ADNc the Mammalian Gene Collection que fue obtenida de un conjunto diverso de tejidos y líneas celulares, el catálogo de bibliotecas de ADNc de MGC se puede acceder en http://mgc.nci.nih.gov donde se encuentra secuencias de DMD humana (Pág. 1. Sección – Materials and methods).
y un andamiaje spCas9,	y un andamiaje spCas9 (Págs. 5 y 6, Secciones - Multiplex CRISPR/Cas9 Gene Editing to Delete Exon 51 y Dystrophin Rescue by a Multi-Exon Large Genomic Deletion , Fig. 3)	No menciona
en donde la secuencia del ARN guía de DMD comprende la SEQ ID NO: 714,	y en donde el ARNgs comprende cualquiera de las siguientes secuencias:	En donde una de la secuencia de nucleótidos es la de distrofina humana con accesión del NCBI

Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181

	CR1:GATTGGCTTTGATTTCCC TA CR2:GTGTAGAGTAAGTCAGC CTA CR3:GCCTACTCAGACTGTTA CTC CR4:GTTGGACAGAACTTACC GAC CR5:GCAGTTGCCTAAGAACT GGT CR6:GGGGCTCCACCCTCACG AGT CR7:GTTTGCTTCGCTATAAAA CG CR10:GCCAGGATGGCATTGG GCAG CR11:GCTGAATCTGCGGTGG CAGG CR12:GTTCTTTTGTTCTTCTA GCC CR13:GGAAAAGCTTGAGCAA GTCA CR14:GGAAGAGTTGCCCCTG CGCC CR15:GACAAATCTCCAGTGG ATAA CR16:GTGTTTCTCAGGTAAAG CTC CR17:GGAAGGACCATTTGAC GTTA CR18:GAACTGCTATTTTCAGTT TCC CR19:GCCAGCCACTCAGCCA GTGA CR20:GGTATGCTTTTCTGTTA AAG CR21:GCTCCTGGACTGACCA CTAT CR22:GGAACAGAGGCGTCCC CAGT CR23:GGAGGCTAGAACAATC ATTA CR24:GACAAGAACACCTTCA GAAC CR25:GGGTTTCTGTGATTTTC TTT CR26:GGGCCAAAGACCTCCG CCAG T CR27:GTTGGAGAAGCATTCA TAA (Tabla suplementaria 1).	BC150141.1 la cual tiene un 100% de identidad y cobertura con la SEQ ID NO: 714 de la solicitud (Alineamiento 1).
y donde el ARNGs es capaz de crear un solo corte en el exón	y en donde el ARNGs es capaz de crear un solo corte en el exón 51 (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Pág. Págs. 2 a 7. Sección – Results, Figs. 1 a 4, Tabla 1).	No menciona

D1 es considerado como el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 28, ya que divulga un RNA guía como componente de un sistema CRISPR/Cas9 para restaurar la expresión del gen de la distrofina en células portadoras de mutaciones de distrofina que causan distrofia muscular de Duchenne (DMD), donde

Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181

el sgRNA puede ser simple o multiplexado, incluso donde se pueden tener dos ARN guías DMD cuyas secuencias son idénticas y se encuentran dirigidos por su propio promotor, para restaurar el marco de lectura de la distrofina dirigiéndose al punto de acceso mutacional en los exones 45–55 con el fin de introducir cambios dentro de los exones o eliminar uno o más exones, así, después de la edición de genes en mioblastos de pacientes con DMD, la expresión de distrofina fue restaurado *in vitro*. Así mismo, se logró detectar la restauración de DMD *in vivo* después del trasplante de células de pacientes en ratones inmunodeficientes, concluyendo que la edición de genes multiplex con un sistema CRISPR/Cas9 facilitan la generación de una solo gran delección que puede corregir hasta el 62% de las mutaciones de DMD (Abstract, Págs. 2 a 12).

Además, D1 divulga que los promotores del primer sgRNA y el segundo sgRNA son idénticos el cual es un promotor musculo esquelético hU6 (Fig, 2), siendo el sitio de corte y empalme en la distrofina el sitio del aceptor de corte y empalme 5' del exón 51 y el ácido nucleico que contiene los elementos de un sistema CRISPR CAS9 también contiene un sitio de andamiaje spCAS9 (Págs. 4 y 5, Sección – Results).

La diferencia entre la invención definida entre la reivindicación 28 y RNA guía divulgado en D1, consiste en que la secuencia del sgRNA, es la SEQ ID NO: 714.

No hay evidencia de que específicamente la secuencia de sgRNA de SEQ ID NO: 714 proporcione un ácido nucleico con algún efecto técnico diferente al que ya proporcionaba el objeto de D1, puesto sgRNAs de un sistema de CRISPR CAS9 para realizar un solo corte en el exón 51 DMD ya había sido previsto en dicho documento (Abstract, Págs. 2 a 12).

Por lo tanto, el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: ¿Cómo modificar el sgRNA conocido en D1 con el fin de proporcionar un sgRNA alternativo?

Sin embargo, el incluir las SEQ ID NO: 714 en un ácido nucleico dirigido a DMD, ya está divulgado en D4 que se refiere a la generación y análisis inicial de mas de 15000 secuencias de cDNA de longitud completa de humano y ratón bajo el programa Colección de genes de mamíferos (MGC por sus siglas en inglés) donde se lograron identificar 7800 genes de humano y fueron depositados en la base de datos pública del instituto nacional de salud (NHI) (Abstract, todo el documento). Se logro identificar las accesiones BC150141.1 del NCBI como asociado al gen de distrofina humana (DMD) con un 100% de cobertura e identidad con la SEQ ID NO. 714 de la solicitud (alineamiento 1).

En consecuencia, la persona normalmente versada en la materia estaría motivada a incluir un sgRNA con la secuencia de cDNA de DMD sugerida en D4 con accesión BC150141.1 del NCBI como sgRNA de D1, para así llegar al objeto de la reivindicación 28. Por lo cual se considera obvia.

Las reivindicaciones dependientes 39 y 40 no mencionan alguna característica que, junto con las características de la reivindicación independiente, aporte nivel inventivo al ácido nucleico de la reivindicación 28, por lo cual se considera que carece de nivel inventivo.

Teniendo en cuenta lo señalado en el artículo 18 de la Decisión 486 de 2000 de la Comisión de la Comunidad Andina, la reivindicación independiente 42 (NC2020/0005362 presentado el 29 de abril de 2020) refiere a: *“Una composición que comprende un primer ácido nucleico que comprende el ácido nucleico de cualquiera de las Reivindicaciones 1*



Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181
a 27, y un segundo ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína Cas9 o un dominio de nucleasa de la misma (...)). A continuación, se presenta la tabla comparativa entre el objeto reivindicado y los documentos encontrados en el estado de la técnica:

CARACTERÍSTICAS ESENCIALES	D1	D2
Una composición que comprende	Una composición que comprende (Pág. 11, Secciones – Plasmid construction. y Cell culture transfection Fig. 2).	Una composición que comprende
un primer ácido nucleico que comprende	Un primer ácido nucleico que comprende, (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Pág. Págs. 2 a 7. Sección – Results, Figs. 1 a 4, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	Un primer ácido nucleico que comprende (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
una secuencia que codifica un primer ARN guía de DMD que se dirige a una primera secuencia diana genómica,	una secuencia que codifica un primer ARN guía de DMD que se dirige a una primera secuencia diana genómica (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Págs. 2 a 6. Sección – Results, Figs. 1 a 3, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	una secuencia que codifica un primer ARN guía de EFGP (proteína verde fluorescente mejorada) que se dirige a una primera secuencia diana genómica (Fig, 8).
una secuencia que codifica un segundo ARN guía de DMD que se dirige a una segunda secuencia diana genómica,	una secuencia que codifica un segundo ARN guía de DMD que se dirige a una segunda secuencia diana genómica (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Pág. Págs. 2 a 6. Sección – Results, Figs. 1 a 3, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	una secuencia que codifica un segundo ARN guía de EFGP que se dirige a una segunda secuencia diana genómica (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
una secuencia que codifica un tercer ARN guía de DMD que se dirige a una tercera secuencia diana genómica,	una secuencia que codifica un tercer ARN guía de DMD que se dirige a una tercera secuencia diana genómica (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Págs. 2 a 6. Sección – Results, Figs. 1 a 3, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	una secuencia que codifica un tercer ARN guía de EFGP que se dirige a una tercera secuencia diana genómica (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
un primer promotor, en donde el primer promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el primer ARN guía de DMD,	un primer promotor, en donde el primer promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el primer ARN guía de DMD (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Págs. 2 a 6. Sección – Results, Figs. 1 a 3, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	un primer promotor, en donde el primer promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el primer ARN guía de EFGP (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección –

Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181

		Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
un segundo promotor, en donde el segundo promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el segundo ARN guía de DMD,	un segundo promotor, en donde el segundo promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el segundo ARN guía de DMD (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Págs. 2 a 7. Sección – Results, Figs. 1 a 4, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	un segundo promotor, en donde el segundo promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el segundo ARN guía de EFGP (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
y un tercer promotor, en donde el tercer promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el tercer ARN guía de DMD,	No menciona	y un tercer promotor, en donde el tercer promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el tercer ARN guía de EFGP (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
en donde cada una de la primera secuencia diana genómica, la segunda secuencia diana genómica, y la tercera secuencia diana genómica comprende un sitio aceptor de corte y empalme de distrofina,	en donde cada una de la primera secuencia diana genómica y la segunda secuencia diana genómica comprende un sitio aceptor de corte y empalme de distrofina (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Pág. Págs. 2 a 7. Sección – Results, Figs. 1 a 4 y 7, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	en donde cada una de la primera secuencia diana genómica, la segunda secuencia diana genómica, y la tercera secuencia diana genómica comprende un sitio aceptor de corte y empalme de EFGP (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
en donde la secuencia que codifica el primer ARN guía de DMD, la secuencia que codifica el segundo ARN guía de DMD, y la secuencia que codifica el tercer ARN guía de DMD son idénticas	No menciona	en donde la secuencia que codifica el primer ARN guía de EFGP, la secuencia que codifica el segundo ARN guía de EFGP, y la secuencia que codifica el tercer ARN guía de EFGP son idénticas (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figuras 7D y 8S).
y un segundo ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína Cas9 o un dominio de nucleasa de la misma.	y un segundo ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína Cas9 o un dominio de nucleasa de la misma (Pág. 11, Sección – Plasmid construction., Fig. 2).	y un segundo ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína Cas9 o un dominio de nucleasa de la misma (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y



Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181

		Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figuras 7D y 8S).
--	--	---

D1 es considerado como el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 42, ya que divulga una composición que comprende un ácido nucleico que comprende los componentes de un sistema CRISPR/Cas9, incluyendo la secuencia que codifica para la proteína Cas9, para restaurar la expresión del gen de la distrofina en células portadoras de mutaciones de distrofina que causan distrofia muscular de Duchenne (DMD), y un segundo ácido nucleico que son un sgRNAs que pueden ser simples o multiplexados para restaurar el marco de lectura de la distrofina dirigiéndose al punto de acceso mutacional en los exones 45–55 con el fin de introducir cambios dentro de los exones o eliminar uno o más exones, así, después de la edición de genes en mioblastos de pacientes con DMD, la expresión de distrofina fue restaurado *in vitro*. Así mismo, se logró detectar la restauración de DMD *in vivo* después del trasplante de células de pacientes en ratones inmunodeficientes, concluyendo que la edición de genes multiplex con un sistema CRISPR/Cas9 facilitan la generación de una solo gran delección que puede corregir hasta el 62% de las mutaciones de DMD (Abstract, Págs. 2 a 12).

Además, D1 divulga que los promotores del primer sgRNA y el segundo sgRNA son idénticos el cual es un promotor musculo esquelético hU6 (Fig, 2), siendo el sitio de corte y empalme en la distrofina el sitio del aceptor de corte y empalme 5' del exón 51 y el ácido nucleico que contiene los elementos de un sistema CRISPR CAS9 también contiene un sitio de andamiaje spCAS9 (Págs. 4 y 5, Sección – Results) y la composición incluye el reactivo Lipofectamine 2000 (Pág. 11).

La diferencia entre la invención definida entre la reivindicación 42 y la composición divulgada en D1, consiste en que el primer ácido nucleico cuenta con la presencia de un tercer promotor que dirige una tercera secuencia de sgRNA y que las tres secuencias de sgRNA sean idénticas.

No hay evidencia de que el incluir específicamente tres secuencias de sgRNA idénticas proporcione una composición con algún efecto técnico diferente al que ya proporcionaba el objeto de D1, puesto que una composición que comprende un ácido nucleico que compone un sistema de CRISPR CAS9 para la omisión de exones de DMD incluyendo la secuencia que codifica para la proteína Cas9 ya había sido previsto en dicho documento (Abstract, Págs. 2 a 12).

Por lo tanto, el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: ¿Cómo modificar la composición de D1 con el fin de proporcionar una composición alternativa?

Sin embargo, el incluir tres copias de un sgRNA unidas a tres promotores en un ácido nucleico en un sistema de CRISPR-CAS9, está divulgado en D2 que se refiere a una composición que comprende ácidos nucleicos que comprende los componentes de un sistema de CRISPR CAS9 optimizado para la eliminación de genes inducibles en un solo paso, sean genes multiplexados o individuales estrictamente controlados en hPSC (células humanas pluripotentes) y en una amplia variedad de células diferenciadas. Así mismo, divulga líneas hESC (células madres embrionarias humanas) en las que un gen reportero fluorescente puede ser eliminado de manera inducible, para los cual se dirigió a las hESC con el EGFPd2 (Proteína verde fluorescente mejorada), un sgRNA (dirigido contra EGFPd2) y un gen constitutivo de Cas9, donde la coexpresión de dos o tres copias

Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181
del mismo casete de ARN guía de EGFP del mismo locus AAVS1 (sitio de inserción 1 de adenovirus en el genoma humano) fue suficiente para aumentar significativamente la velocidad y la eficiencia de la desactivación inducible de EGFPd2 en todas las sublíneas clonales analizadas (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).

En consecuencia, la persona normalmente versada en la materia estaría motivada a incluir tres copias de sgRNA idénticas con sus respectivos promotores como lo enseña del D2 en la composición de D1, para así llegar al objeto de la reivindicación 42. Por lo cual se considera obvia.

Las reivindicaciones dependientes 44 a 52 no mencionan alguna característica que, junto con las características de la reivindicación independiente, aporte nivel inventivo al ácido nucleico de la reivindicación 42, por lo cual se considera que carece de nivel inventivo.

Teniendo en cuenta lo señalado en el artículo 18 de la Decisión 486 de 2000 de la Comisión de la Comunidad Andina, la reivindicación independiente 43 (NC2020/0005362 presentado el 29 de abril de 2020) refiere a: *“Una composición que comprende un vector que comprende el ácido nucleico de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 27, y un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína Cas9 o un dominio de nucleasa de la misma (...)”*. A continuación, se presenta la tabla comparativa entre el objeto reivindicado y los documentos encontrados en el estado de la técnica:

CARACTERÍSTICAS ESENCIALES	D1	D2
Una composición que comprende	Una composición que comprende (Pág. 11, Secciones – Plasmid construction. y Cell culture transfection Fig. 2).	Una composición que comprende
un vector que comprende el ácido nucleico que comprende	Un vector que comprende el ácido nucleico que comprende, (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Pág. Págs. 2 a 7. Sección – Results, Figs. 1 a 4, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	Un vector que comprende el ácido nucleico que comprende (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
una secuencia que codifica un primer ARN guía de DMD que se dirige a una primera secuencia diana genómica,	una secuencia que codifica un primer ARN guía de DMD que se dirige a una primera secuencia diana genómica (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Págs. 2 a 6. Sección – Results, Figs. 1 a 3, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	una secuencia que codifica un primer ARN guía de EFGP (proteína verde fluorescente mejorada) que se dirige a una primera secuencia diana genómica (Fig, 8).
una secuencia que codifica un segundo ARN guía de DMD que se dirige a una segunda secuencia diana genómica,	una secuencia que codifica un segundo ARN guía de DMD que se dirige a una segunda secuencia diana genómica (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Pág. Págs. 2 a 6. Sección – Results, Figs. 1 a 3, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	una secuencia que codifica un segundo ARN guía de EFGP que se dirige a una segunda secuencia diana genómica (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y

Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181

		Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
una secuencia que codifica un tercer ARN guía de DMD que se dirige a una tercera secuencia diana genómica,	una secuencia que codifica un tercer ARN guía de DMD que se dirige a una tercera secuencia diana genómica (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Págs. 2 a 6. Sección – Results, Figs. 1 a 3, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	una secuencia que codifica un tercer ARN guía de EFGP que se dirige a una tercera secuencia diana genómica (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
un primer promotor, en donde el primer promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el primer ARN guía de DMD,	un primer promotor, en donde el primer promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el primer ARN guía de DMD (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Págs. 2 a 6. Sección – Results, Figs. 1 a 3, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	un primer promotor, en donde el primer promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el primer ARN guía de EFGP (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
un segundo promotor, en donde el segundo promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el segundo ARN guía de DMD,	un segundo promotor, en donde el segundo promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el segundo ARN guía de DMD (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Págs. 2 a 7. Sección – Results, Figs. 1 a 4, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	un segundo promotor, en donde el segundo promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el segundo ARN guía de EFGP (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
y un tercer promotor, en donde el tercer promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el tercer ARN guía de DMD,	No menciona	y un tercer promotor, en donde el tercer promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el tercer ARN guía de EFGP (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
en donde cada una de la primera secuencia diana genómica, la segunda secuencia diana genómica, y la tercera secuencia diana genómica comprende un sitio aceptor de corte y empalme de distrofina,	en donde cada una de la primera secuencia diana genómica y la segunda secuencia diana genómica comprende un sitio aceptor de corte y empalme de distrofina (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Pág. Págs. 2 a 7. Sección – Results, Figs. 1 a 4 y 7, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	en donde cada una de la primera secuencia diana genómica, la segunda secuencia diana genómica, y la tercera secuencia diana genómica comprende un sitio aceptor de corte y empalme de EFGP (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección –

Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181

		Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
en donde la secuencia que codifica el primer ARN guía de DMD, la secuencia que codifica el segundo ARN guía de DMD, y la secuencia que codifica el tercer ARN guía de DMD son idénticas	No menciona	en donde la secuencia que codifica el primer ARN guía de EFGP, la secuencia que codifica el segundo ARN guía de EFGP, y la secuencia que codifica el tercer ARN guía de EFGP son idénticas (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figuras 7D y 8S).
y un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína Cas9 o un dominio de nucleasa de la misma	y un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína Cas9 o un dominio de nucleasa de la misma (Pág. 11, Sección – Plasmid construction., Fig. 2).	y un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína Cas9 o un dominio de nucleasa de la misma (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figuras 7D y 8S).

D1 es considerado como el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 43, ya que divulga una composición que comprende un vector que comprende un ácido nucleico que comprende los componentes de un sistema CRISPR/Cas9, incluyendo la secuencia que codifica para la proteína Cas9, para restaurar la expresión del gen de la distrofina en células portadoras de mutaciones de distrofina que causan distrofia muscular de Duchenne (DMD), y un segundo ácido nucleico que son un sgRNAs que pueden ser simples o multiplexados para restaurar el marco de lectura de la distrofina dirigiéndose al punto de acceso mutacional en los exones 45–55 con el fin de introducir cambios dentro de los exones o eliminar uno o más exones, así, después de la edición de genes en mioblastos de pacientes con DMD, la expresión de distrofina fue restaurado *in vitro*. Así mismo, se logró detectar la restauración de DMD *in vivo* después del trasplante de células de pacientes en ratones inmunodeficientes, concluyendo que la edición de genes multiplex con un sistema CRISPR/Cas9 facilitan la generación de una solo gran delección que puede corregir hasta el 62% de las mutaciones de DMD (Abstract, Págs. 2 a 12).

Además, D1 divulga que el vector es el plásmido hCAS9 el cual contiene los promotores del primer sgRNA y el segundo sgRNA los cuales son idénticos el cual es un promotor musculo esquelético hU6 (Fig, 2), siendo el sitio de corte y empalme en la distrofina el sitio del aceptor de corte y empalme 5´del exón 51 y el ácido nucleico que contiene los elementos de un sistema CRISPR CAS9 también contiene un sitio de andamiaje spCAS9 (Págs. 4 y 5, Sección – Results) y la composición incluye el reactivo Lipofectamine 2000 (Pág. 11). Y adicionalmente, sugiere que dado el gran tamaño del gen Cas9 de *S. pyogenes* (~4,2 kilobases) y el desafío a su uso en vectores virales adeno-asociados de tamaño restringido con constitutivo típico o promotores específicos de músculo, pero los genes Cas9 de otras especies como *N. meningitidis* y *S. thermophilus*, son lo suficientemente pequeños para empaquetar eficientemente tanto Cas9 como casetes de

Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181

expresión de sgRNA en vectores AAV individuales para aplicaciones de edición de genes *in vivo* (Pág. 9, Sección – Discussion).

La diferencia entre la invención definida entre la reivindicación 43 y la composición divulgada en D1, consiste en que el vector nucleico cuenta con la presencia de un tercer promotor que dirige una tercera secuencia de sgRNA y que las tres secuencias de sgRNA sean idénticas.

No hay evidencia de que el incluir específicamente tres secuencias de sgRNA idénticas proporcione una composición con algún efecto técnico diferente al que ya proporcionaba el objeto de D1, puesto que una composición que comprende un vector que contiene el ácido nucleico que compone un sistema de CRISPR CAS9 para la omisión de exones de DMD incluyendo la secuencia que codifica para la proteína Cas9 ya había sido previsto en dicho documento (Abstract, Págs. 2 a 12).

Por lo tanto, el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: ¿Cómo modificar la composición de D1 con el fin de proporcionar una composición alternativa?

Sin embargo, el incluir tres copias de un sgRNA unidas a tres promotores en un vector que comprende un ácido nucleico que comprende un sistema de CRISPR-CAS9, está divulgado en D2 que se refiere a una composición que comprende ácidos nucleicos que comprende los componentes de un sistema de CRISPR CAS9 optimizado para la eliminación de genes inducibles en un solo paso, sean genes multiplexados o individuales estrictamente controlados en hPSC (células humanas pluripotentes) y en una amplia variedad de células diferenciadas. Así mismo, divulga líneas hESC (células madres embrionarias humanas) en las que un gen reportero fluorescente puede ser eliminado de manera inducible, para lo cual se dirigió a las hESC con el EGFPd2 (Proteína verde fluorescente mejorada), un sgRNA (dirigido contra EGFPd2) y un gen constitutivo de Cas9, donde la coexpresión de dos o tres copias del mismo casete de ARN guía de EGFP del mismo locus AAVS1 (sitio de inserción 1 de adenovirus en el genoma humano) fue suficiente para aumentar significativamente la velocidad y la eficiencia de la desactivación inducible de EGFPd2 en todas las sublíneas clonales analizadas (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs. 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).

En consecuencia, la persona normalmente versada en la materia estaría motivada a incluir tres copias de sgRNA idénticas con sus respectivos promotores como lo enseña el D2 en el ácido nucleico de D1, para así llegar al objeto de la reivindicación 43. Por lo cual se considera obvia.

Las reivindicaciones dependientes 44 a 52 no mencionan alguna característica que, junto con las características de la reivindicación independiente, aporte nivel inventivo al ácido nucleico de la reivindicación 43, por lo cual se considera que carece de nivel inventivo.

Teniendo en cuenta lo señalado en el artículo 18 de la Decisión 486 de 2000 de la Comisión de la Comunidad Andina, la reivindicación independiente 55 (NC2020/0005362 presentado el 29 de abril de 2020) refiere a: *“Una composición que comprende el ácido nucleico de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 27 y un vehículo farmacéuticamente aceptable (...)”*. A continuación, se presenta la tabla comparativa entre el objeto reivindicado y los documentos encontrados en el estado de la técnica:



Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181

CARACTERÍSTICAS ESENCIALES	D1	D2
Una composición que comprende	Una composición que comprende (Pág. 11, Secciones – Plasmid construction. y Cell culture transfection Fig. 2).	Una composición que comprende
un ácido nucleico que comprende	Un ácido nucleico que comprende, (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Pág. Págs. 2 a 7. Sección – Results, Figs. 1 a 4, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	Un ácido nucleico que comprende (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
una secuencia que codifica un primer ARN guía de DMD que se dirige a una primera secuencia diana genómica,	una secuencia que codifica un primer ARN guía de DMD que se dirige a una primera secuencia diana genómica (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Págs. 2 a 6. Sección – Results, Figs. 1 a 3, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	una secuencia que codifica un primer ARN guía de EFGP (proteína verde fluorescente mejorada) que se dirige a una primera secuencia diana genómica (Fig, 8).
una secuencia que codifica un segundo ARN guía de DMD que se dirige a una segunda secuencia diana genómica,	una secuencia que codifica un segundo ARN guía de DMD que se dirige a una segunda secuencia diana genómica (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Pág. Págs. 2 a 6. Sección – Results, Figs. 1 a 3, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	una secuencia que codifica un segundo ARN guía de EFGP que se dirige a una segunda secuencia diana genómica (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
una secuencia que codifica un tercer ARN guía de DMD que se dirige a una tercera secuencia diana genómica,	una secuencia que codifica un tercer ARN guía de DMD que se dirige a una tercera secuencia diana genómica (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Págs. 2 a 6. Sección – Results, Figs. 1 a 3, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	una secuencia que codifica un tercer ARN guía de EFGP que se dirige a una tercera secuencia diana genómica (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
un primer promotor, en donde el primer promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el primer ARN guía de DMD,	un primer promotor, en donde el primer promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el primer ARN guía de DMD (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Págs. 2 a 6. Sección – Results, Figs. 1 a 3, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	un primer promotor, en donde el primer promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el primer ARN guía de EFGP (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
un segundo promotor, en donde el segundo promotor dirige la expresión de la secuencia que	un segundo promotor, en donde el segundo promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el segundo ARN guía de	un segundo promotor, en donde el segundo promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el segundo ARN guía de



Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181

codifica el segundo ARN guía de DMD,	DMD (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Págs. 2 a 7. Sección – Results, Figs. 1 a 4, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	EFGP (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
y un tercer promotor, en donde el tercer promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el tercer ARN guía de DMD,	No menciona	y un tercer promotor, en donde el tercer promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el tercer ARN guía de EFGP (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
en donde cada una de la primera secuencia diana genómica, la segunda secuencia diana genómica, y la tercera secuencia diana genómica comprende un sitio aceptor de corte y empalme de distrofina,	en donde cada una de la primera secuencia diana genómica y la segunda secuencia diana genómica comprende un sitio aceptor de corte y empalme de distrofina (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Pág. Págs. 2 a 7. Sección – Results, Figs. 1 a 4 y 7, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	en donde cada una de la primera secuencia diana genómica, la segunda secuencia diana genómica, y la tercera secuencia diana genómica comprende un sitio aceptor de corte y empalme de EFGP (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
en donde la secuencia que codifica el primer ARN guía de DMD, la secuencia que codifica el segundo ARN guía de DMD, y la secuencia que codifica el tercer ARN guía de DMD son idénticas	No menciona	en donde la secuencia que codifica el primer ARN guía de EFGP, la secuencia que codifica el segundo ARN guía de EFGP, y la secuencia que codifica el tercer ARN guía de EFGP son idénticas (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figuras 7D y 8S).
y un vehículo farmacéuticamente aceptable	y un vehículo farmacéuticamente aceptable como es el caso de Lipofectamine 2000 (Pág. 11, Sección – Cell culture and transfection).	y un vehículo farmacéuticamente aceptable como es el caso de Lipofectamine 2000 (Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figuras 7D y 8S).

D1 es considerado como el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 55, ya que divulga una composición que comprende un vector que comprende un ácido nucleico que comprende los componentes de un sistema CRISPR/Cas9, incluyendo la secuencia que codifica para la proteína Cas9, para restaurar la expresión del gen de la distrofina en células portadoras de mutaciones de distrofina que causan distrofia muscular de Duchenne (DMD), y un segundo ácido nucleico que son



Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181

un sgRNAs que pueden ser simples o multiplexados para restaurar el marco de lectura de la distrofina dirigiéndose al punto de acceso mutacional en los exones 45–55 con el fin de introducir cambios dentro de los exones o eliminar uno o más exones, así, después de la edición de genes en mioblastos de pacientes con DMD, la expresión de distrofina fue restaurado *in vitro*. Así mismo, se logró detectar la restauración de DMD *in vivo* después del trasplante de células de pacientes en ratones inmunodeficientes, concluyendo que la edición de genes multiplex con un sistema CRISPR/Cas9 facilitan la generación de una solo gran delección que puede corregir hasta el 62% de las mutaciones de DMD (Abstract, Págs. 2 a 12).

Además, D1 divulga que el vector es el plásmido hCAS9 el cual contiene los promotores del primer sgRNA y el segundo sgRNA los cuales son idénticos el cual es un promotor musculo esquelético hU6 (Fig, 2), siendo el sitio de corte y empalme en la distrofina el sitio del aceptor de corte y empalme 5' del exón 51 y el ácido nucleico que contiene los elementos de un sistema CRISPR CAS9 también contiene un sitio de andamiaje spCAS9 (Págs. 4 y 5, Sección – Results) y la composición incluye el reactivo Lipofectamine 2000 (Pág. 11). Y adicionalmente, sugiere que dado el gran tamaño del gen Cas9 de *S. pyogenes* (~4,2 kilobases) y el desafío a su uso en vectores virales adeno-asociados de tamaño restringido con constitutivo típico o promotores específicos de músculo, pero los genes Cas9 de otras especies como *N. meningitidis* y *S. thermophilus*, son lo suficientemente pequeños para empaquetar eficientemente tanto Cas9 como casetes de expresión de sgRNA en vectores AAV individuales para aplicaciones de edición de genes *in vivo* (Pág. 9, Sección – Discussion).

La diferencia entre la invención definida entre la reivindicación 55 y la composición divulgada en D1, consiste en que la composición comprende un ácido nucleico que cuenta con la presencia de un tercer promotor que dirige una tercera secuencia de sgRNA y que las tres secuencias de sgRNA sean idénticas.

No hay evidencia de que el incluir específicamente tres secuencias de sgRNA idénticas proporcione una composición con algún efecto técnico diferente al que ya proporcionaba el objeto de D1, puesto que una composición que comprende un ácido nucleico que compone un sistema de CRISPR CAS9 para la omisión de exones de DMD incluyendo la secuencia que codifica para la proteína Cas9 ya había sido previsto en dicho documento (Abstract, Págs. 2 a 12).

Por lo tanto, el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: ¿Cómo modificar la composición de D1 con el fin de proporcionar una composición alternativa?

Sin embargo, el incluir tres copias de un sgRNA unidas a tres promotores en una composición que comprende un ácido nucleico que comprende un sistema de CRISPR-CAS9, está divulgado en D2 que se refiere a una composición que comprende ácidos nucleicos que comprende los componentes de un sistema de CRISPR CAS9 optimizado para la eliminación de genes inducibles en un solo paso, sean genes multiplexados o individuales estrictamente controlados en hPSC (células humanas pluripotentes) y en una amplia variedad de células diferenciadas. Así mismo, divulga líneas hESC (células madres embrionarias humanas) en las que un gen reportero fluorescente puede ser eliminado de manera inducible, para los cual se dirigió a las hESC con el EGFPd2 (Proteína verde fluorescente mejorada), un sgRNA (dirigido contra EGFPd2) y un gen constitutivo de Cas9, donde la coexpresión de dos o tres copias del mismo casete de ARN guía de EGFP del mismo locus AAVS1 (sitio de inserción 1 de adenovirus en el genoma humano) fue suficiente para aumentar significativamente la velocidad y la



Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181
eficiencia de la desactivación inducible de EGFPd2 en todas las sublíneas clonales analizadas (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).

En consecuencia, la persona normalmente versada en la materia estaría motivada a incluir tres copias de sgRNA idénticas con sus respectivos promotores como lo enseña del D2 en el ácido nucleico de D1, para así llegar al objeto de la reivindicación 55. Por lo cual se considera obvia.

Teniendo en cuenta lo señalado en el artículo 18 de la Decisión 486 de 2000 de la Comisión de la Comunidad Andina, la reivindicación independiente 56 (NC2020/0005362 presentado el 29 de abril de 2020) refiere a: “*Un vector que comprende el ácido nucleico de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 27 (...)*”. A continuación, se presenta la tabla comparativa entre el objeto reivindicado y los documentos encontrados en el estado de la técnica:

CARACTERÍSTICAS ESENCIALES	D1	D2
Un vector que comprende	Un vector que comprende (Pág. 11, Secciones – Plasmid construction. y Cell culture transfection Fig. 2).	Un vector que comprende
un ácido nucleico que comprende	Un ácido nucleico que comprende, (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Pág. Págs. 2 a 7. Sección – Results, Figs. 1 a 4, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	Un ácido nucleico que comprende (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
una secuencia que codifica un primer ARN guía de DMD que se dirige a una primera secuencia diana genómica,	una secuencia que codifica un primer ARN guía de DMD que se dirige a una primera secuencia diana genómica (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Págs. 2 a 6. Sección – Results, Figs. 1 a 3, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	una secuencia que codifica un primer ARN guía de EFGP (proteína verde fluorescente mejorada) que se dirige a una primera secuencia diana genómica (Fig, 8).
una secuencia que codifica un segundo ARN guía de DMD que se dirige a una segunda secuencia diana genómica,	una secuencia que codifica un segundo ARN guía de DMD que se dirige a una segunda secuencia diana genómica (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Pág. Págs. 2 a 6. Sección – Results, Figs. 1 a 3, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	una secuencia que codifica un segundo ARN guía de EFGP que se dirige a una segunda secuencia diana genómica (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
una secuencia que codifica un tercer ARN guía de DMD que se dirige a una tercera secuencia diana genómica,	una secuencia que codifica un tercer ARN guía de DMD que se dirige a una tercera secuencia diana genómica (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Págs. 2 a 6. Sección – Results,	una secuencia que codifica un tercer ARN guía de EFGP que se dirige a una tercera secuencia diana genómica (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible

Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181

	Figs. 1 a 3, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
un primer promotor, en donde el primer promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el primer ARN guía de DMD,	un primer promotor, en donde el primer promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el primer ARN guía de DMD (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Págs. 2 a 6. Sección – Results, Figs. 1 a 3, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	un primer promotor, en donde el primer promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el primer ARN guía de EFGP (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
un segundo promotor, en donde el segundo promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el segundo ARN guía de DMD,	un segundo promotor, en donde el segundo promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el segundo ARN guía de DMD (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Págs. 2 a 7. Sección – Results, Figs. 1 a 4, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	un segundo promotor, en donde el segundo promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el segundo ARN guía de EFGP (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
y un tercer promotor, en donde el tercer promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el tercer ARN guía de DMD,	No menciona	y un tercer promotor, en donde el tercer promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el tercer ARN guía de EFGP (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
en donde cada una de la primera secuencia diana genómica, la segunda secuencia diana genómica, y la tercera secuencia diana genómica comprende un sitio aceptor de corte y empalme de distrofina,	en donde cada una de la primera secuencia diana genómica y la segunda secuencia diana genómica comprende un sitio aceptor de corte y empalme de distrofina (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Pág. Págs. 2 a 7. Sección – Results, Figs. 1 a 4 y 7, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	en donde cada una de la primera secuencia diana genómica, la segunda secuencia diana genómica, y la tercera secuencia diana genómica comprende un sitio aceptor de corte y empalme de EFGP (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
en donde la secuencia que codifica el primer ARN guía de DMD, la secuencia que codifica el segundo ARN guía de DMD, y la secuencia que codifica el tercer ARN guía de DMD son idénticas	No menciona	en donde la secuencia que codifica el primer ARN guía de EFGP, la secuencia que codifica el segundo ARN guía de EFGP, y la secuencia que codifica el tercer ARN guía de EFGP son idénticas (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an



Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181

		optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs. 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figuras 7D y 8S).
--	--	---

D1 es considerado como el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 56, ya que divulga un vector que comprende un vector que comprende un ácido nucleico que comprende los componentes de un sistema CRISPR/Cas9, incluyendo la secuencia que codifica para la proteína Cas9, para restaurar la expresión del gen de la distrofina en células portadoras de mutaciones de distrofina que causan distrofia muscular de Duchenne (DMD), y un segundo ácido nucleico que son un sgRNAs que pueden ser simples o multiplexados para restaurar el marco de lectura de la distrofina dirigiéndose al punto de acceso mutacional en los exones 45–55 con el fin de introducir cambios dentro de los exones o eliminar uno o más exones, así, después de la edición de genes en mioblastos de pacientes con DMD, la expresión de distrofina fue restaurado *in vitro*. Así mismo, se logró detectar la restauración de DMD *in vivo* después del trasplante de células de pacientes en ratones inmunodeficientes, concluyendo que la edición de genes multiplex con un sistema CRISPR/Cas9 facilitan la generación de una solo gran delección que puede corregir hasta el 62% de las mutaciones de DMD (Abstract, Págs. 2 a 12).

Además, D1 divulga que el vector es el plásmido hCAS9 el cual contiene los promotores del primer sgRNA y el segundo sgRNA los cuales son idénticos el cual es un promotor musculo esquelético hU6 (Fig, 2), siendo el sitio de corte y empalme en la distrofina el sitio del aceptor de corte y empalme 5´del exón 51 y el ácido nucleico que contiene los elementos de un sistema CRISPR CAS9 también contiene un sitio de andamiaje spCAS9 (Págs. 4 y 5, Sección – Results).

La diferencia entre la invención definida entre la reivindicación 56 y el vector divulgado en D1, consiste en que el vector comprende un ácido nucleico que cuenta con la presencia de un tercer promotor que dirige una tercera secuencia de sgRNA y que las tres secuencias de sgRNA sean idénticas.

No hay evidencia de que el incluir específicamente tres secuencias de sgRNA idénticas proporcione una vector con algún efecto técnico diferente al que ya proporcionaba el objeto de D1, puesto que un vector que comprende un ácido nucleico que compone un sistema de CRISPR CAS9 para la omisión de exones de DMD incluyendo la secuencia que codifica para la proteína Cas9 ya había sido previsto en dicho documento (Abstract, Págs. 2 a 12).

Por lo tanto, el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: ¿Cómo modificar el vector de D1 con el fin de proporcionar un vector alternativo?

Sin embargo, el incluir tres copias de un sgRNA unidas a tres promotores en un vector que comprende un ácido nucleico que comprende un sistema de CRISPR-CAS9, está divulgado en D2 que se refiere a un vector que comprende ácidos nucleicos que comprende los componentes de un sistema de CRISPR CAS9 optimizado para la eliminación de genes inducibles en un solo paso, sean genes multiplexados o individuales estrictamente controlados en hPSC (células humanas pluripotentes) y en una amplia variedad de células diferenciadas. Así mismo, divulga líneas hESC (células madres embrionarias humanas) en las que un gen reportero fluorescente puede ser eliminado de

Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181
manera inducible, para los cual se dirigió a las hESC con el EGFPd2 (Proteína verde fluorescente mejorada), un sgRNA (dirigido contra EGFPd2) y un gen constitutivo de Cas9, donde la coexpresión de dos o tres copias del mismo casete de ARN guía de EGFP del mismo locus AAVS1 (sitio de inserción 1 de adenovirus en el genoma humano) fue suficiente para aumentar significativamente la velocidad y la eficiencia de la desactivación inducible de EGFPd2 en todas las sublíneas clonales analizadas (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).

En consecuencia, la persona normalmente versada en la materia estaría motivada a incluir tres copias de sgRNA idénticas con sus respectivos promotores como lo enseña del D2 en el vector de D1, para así llegar al objeto de la reivindicación 56. Por lo cual se considera obvia.

Las reivindicaciones dependientes 58 a 60 no mencionan alguna característica que, junto con las características de la reivindicación independiente, aporte nivel inventivo al ácido nucleico de la reivindicación 56, por lo cual se considera que carece de nivel inventivo.

Teniendo en cuenta lo señalado en el artículo 18 de la Decisión 486 de 2000 de la Comisión de la Comunidad Andina, la reivindicación independiente 57 (NC2020/0005362 presentado el 29 de abril de 2020) refiere a: *“Un vector que comprende el ácido nucleico de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 27, y/o el vector de la Reivindicación 51 comprende un promotor y una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína Cas9 o un dominio de nucleasa de la misma, en donde el vector comprende además un secuencia que codifica una repetición terminal invertida (ITR) de un elemento transponible (...)”*. A continuación, se presenta la tabla comparativa entre el objeto reivindicado y los documentos encontrados en el estado de la técnica:

CARACTERÍSTICAS ESENCIALES	D1	D2
Un vector que comprende	Un vector que comprende (Pág. 11, Secciones – Plasmid construction. y Cell culture transfection Fig. 2).	Un vector que comprende
un ácido nucleico que comprende	Un ácido nucleico que comprende, (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Pág. Págs. 2 a 7. Sección – Results, Figs. 1 a 4, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	Un ácido nucleico que comprende (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
una secuencia que codifica un primer ARN guía de DMD que se dirige a una primera secuencia diana genómica,	una secuencia que codifica un primer ARN guía de DMD que se dirige a una primera secuencia diana genómica (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Págs. 2 a 6. Sección – Results, Figs. 1 a 3, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	una secuencia que codifica un primer ARN guía de EFGP (proteína verde fluorescente mejorada) que se dirige a una primera secuencia diana genómica (Fig, 8).
una secuencia que codifica un segundo ARN guía de DMD que	una secuencia que codifica un segundo ARN guía de DMD que se dirige a una segunda	una secuencia que codifica un segundo ARN guía de EFGP que se dirige a una segunda

Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181

se dirige a una segunda secuencia diana genómica,	secuencia diana genómica (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Pág. Págs. 2 a 6. Sección – Results, Figs. 1 a 3, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	secuencia diana genómica (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
una secuencia que codifica un tercer ARN guía de DMD que se dirige a una tercera secuencia diana genómica,	una secuencia que codifica un tercer ARN guía de DMD que se dirige a una tercera secuencia diana genómica (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Págs. 2 a 6. Sección – Results, Figs. 1 a 3, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	una secuencia que codifica un tercer ARN guía de EFGP que se dirige a una tercera secuencia diana genómica (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
un primer promotor, en donde el primer promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el primer ARN guía de DMD,	un primer promotor, en donde el primer promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el primer ARN guía de DMD (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Págs. 2 a 6. Sección – Results, Figs. 1 a 3, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	un primer promotor, en donde el primer promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el primer ARN guía de EFGP (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
un segundo promotor, en donde el segundo promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el segundo ARN guía de DMD,	un segundo promotor, en donde el segundo promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el segundo ARN guía de DMD (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Págs. 2 a 7. Sección – Results, Figs. 1 a 4, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	un segundo promotor, en donde el segundo promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el segundo ARN guía de EFGP (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
y un tercer promotor, en donde el tercer promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el tercer ARN guía de DMD,	No menciona	y un tercer promotor, en donde el tercer promotor dirige la expresión de la secuencia que codifica el tercer ARN guía de EFGP (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
en donde cada una de la primera secuencia diana genómica, la segunda secuencia diana genómica, y la tercera secuencia diana genómica comprende un sitio aceptor de corte y empalme de distrofina,	en donde cada una de la primera secuencia diana genómica y la segunda secuencia diana genómica comprende un sitio aceptor de corte y empalme de distrofina (Pág. 11, Sección – Plasmid construction. Pág. Págs.	en donde cada una de la primera secuencia diana genómica, la segunda secuencia diana genómica, y la tercera secuencia diana genómica comprende un sitio aceptor de corte y empalme de EFGP (Págs. 4412 y 4413,



Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181

	2 a 7. Sección – Results, Figs. 1 a 4 y 7, Tabla 1, Tabla suplementaria 1).	sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).
en donde la secuencia que codifica el primer ARN guía de DMD, la secuencia que codifica el segundo ARN guía de DMD, y la secuencia que codifica el tercer ARN guía de DMD son idénticas	No menciona	en donde la secuencia que codifica el primer ARN guía de EFGP, la secuencia que codifica el segundo ARN guía de EFGP, y la secuencia que codifica el tercer ARN guía de EFGP son idénticas (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figuras 7D y 8S).
y/o un vector que comprende un promotor	El vector comprende un promotor (Pág. 11, Sección – Plasmid construction).	El vector comprende un promotor (Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figuras 7D y 8S).
y una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína Cas9 o un dominio de nucleasa de la misma,	y una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína Cas9 o un dominio de nucleasa de la misma (Pág. 11, Sección – Plasmid construction., Fig. 2).	y una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína Cas9 o un dominio de nucleasa de la misma (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figuras 7D y 8S).
en donde el vector comprende además un secuencia que codifica una repetición terminal invertida (ITR) de un elemento transponible	No menciona	No menciona ⁱ

D1 es considerado como el estado de la técnica más cercano a la invención definida en la reivindicación 57, ya que divulga un vector que comprende un vector que comprende un ácido nucleico que comprende los componentes de un sistema CRISPR/Cas9, incluyendo la secuencia que codifica para la proteína Cas9, para restaurar la expresión del gen de la distrofina en células portadoras de mutaciones de distrofina que causan distrofia muscular de Duchenne (DMD), y un segundo ácido nucleico que son un sgRNAs que pueden ser simples o multiplexados para restaurar el marco de lectura de la distrofina dirigiéndose al punto de acceso mutacional en los exones 45–55 con el fin de introducir cambios dentro de los exones o eliminar uno o más exones, así, después de la edición de genes en mioblastos de pacientes con DMD, la expresión de distrofina fue restaurado *in vitro*. Así mismo, se logró detectar la restauración de DMD *in vivo* después del trasplante de células de pacientes en ratones inmunodeficientes, concluyendo que la edición de genes multiplex con un sistema CRISPR/Cas9 facilitan la generación de una solo gran delección que puede corregir hasta el 62% de las mutaciones de DMD (Abstract, Págs. 2 a 12).

Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181

Además, D1 divulga que el vector es el plásmido hCAS9 el cual contiene los promotores del primer sgRNA y el segundo sgRNA los cuales son idénticos el cual es un promotor musculo esquelético hU6 (Fig, 2), siendo el sitio de corte y empalme en la distrofina el sitio del aceptor de corte y empalme 5' del exón 51 y el ácido nucleico que contiene los elementos de un sistema CRISPR CAS9 también contiene un sitio de andamiaje spCAS9 (Págs. 4 y 5, Sección – Results). Y adicionalmente, sugiere que dado el gran tamaño del gen Cas9 de *S. pyogenes* (~4,2 kilobases) y el desafío a su uso en vectores virales adeno-asociados de tamaño restringido con constitutivo típico o promotores específicos de músculo, pero los genes Cas9 de otras especies como *N. meningitidis* y *S. thermophilus*, son lo suficientemente pequeños para empaquetar eficientemente tanto Cas9 como casetes de expresión de sgRNA en vectores AAV individuales para aplicaciones de edición de genes *in vivo* (Pág. 9, Sección – Discussion).

La diferencia entre la invención definida entre la reivindicación 57 y el vector divulgado en D1, consiste en que el vector comprende un ácido nucleico que cuenta con la presencia de un tercer promotor que dirige una tercera secuencia de sgRNA y que las tres secuencias de sgRNA sean idénticas.

No hay evidencia de que el incluir específicamente tres secuencias de sgRNA idénticas proporcione un vector con algún efecto técnico diferente al que ya proporcionaba el objeto de D1, puesto que un vector que comprende un ácido nucleico que compone un sistema de CRISPR CAS9 para la omisión de exones de DMD incluyendo la secuencia que codifica para la proteína Cas9 ya había sido previsto en dicho documento (Abstract, Págs. 2 a 12).

Por lo tanto, el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: ¿Cómo modificar el vector de D1 con el fin de proporcionar un vector alternativo?

Sin embargo, el incluir tres copias de un sgRNA unidas a tres promotores en un vector que comprende un ácido nucleico que comprende un sistema de CRISPR-CAS9, está divulgado en D2 que se refiere a un vector que comprende ácidos nucleicos que comprende los componentes de un sistema de CRISPR CAS9 optimizado para la eliminación de genes inducibles en un solo paso, sean genes multiplexados o individuales estrictamente controlados en hPSC (células humanas pluripotentes) y en una amplia variedad de células diferenciadas. Así mismo, divulga líneas hESC (células madres embrionarias humanas) en las que un gen reportero fluorescente puede ser eliminado de manera inducible, para los cual se dirigió a las hESC con el EGFPd2 (Proteína verde fluorescente mejorada), un sgRNA (dirigido contra EGFPd2) y un gen constitutivo de Cas9, donde la coexpresión de dos o tres copias del mismo casete de ARN guía de EGFP del mismo locus AAVS1 (sitio de inserción 1 de adenovirus en el genoma humano) fue suficiente para aumentar significativamente la velocidad y la eficiencia de la desactivación inducible de EGFPd2 en todas las sublíneas clonales analizadas (Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S).

Adicionalmente, vectores que comprende sistemas de CRISPR CAS9 conteniendo transposones como Tn7⁶.

⁶Krupovic, M., et al. (2016). Casposons: a new superfamily of self-synthesizing DNA transposons at the origin of prokaryotic CRISPR-Cas immunity. BMC Biology 2014, 12 :36. Recuperado desde: <https://bmcbiol.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1741-7007-12-36.pdf>



Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181

En consecuencia, la persona normalmente versada en la materia estaría motivada a incluir tres copias de sgRNA idénticas con sus respectivos promotores como lo enseña del D2 en el vector de D1, para así llegar al objeto de la reivindicación 57. Por lo cual se considera obvia.

Las reivindicaciones dependientes 58 a 75 no mencionan alguna característica que, junto con las características de la reivindicación independiente, aporte nivel inventivo al ácido nucleico de la reivindicación 57, por lo cual se considera que carece de nivel inventivo.

9. Conclusión

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

Ítem	Documento	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D1	Ousterout, D. G., <i>et al. Nature communications</i>	1 a 28, 37 a 53, 55 a 75 y 79	Nivel inventivo
D2	Bertero, A., <i>et al. Development</i>	1 a 22, 37, 38, 41 a 53, 55 a 75 y 79	Nivel inventivo
D3	WO2014025887A1	23 a 26, 37, 38, 41, 53 y 56	Nivel inventivo
D4	Strausberg, R. L., T., <i>et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.</i>	27, 28, 37 a 41, 53 y 56	Nivel inventivo

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de 2000, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de sesenta (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.

Si como respuesta a este requerimiento, el solicitante modifica el capítulo reivindicatorio, deberá observar las instrucciones contenidas en el numeral 1.2.2.1.1., del Capítulo Primero del Título X de la Circular Única de esta Superintendencia. De igual forma, deberá tener presente que de conformidad con el literal a) del numeral 1.2.2.5.1. de la norma ibidem, será necesario acreditar el pago de la tasa por concepto de modificación a solicitudes en trámites, de conformidad con el valor establecido en la resolución de tasas vigentes.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 6.2 del Capítulo Sexto del Título I de la Circular Única, informándoles que contra el mismo no procede recurso alguno en actuación administrativa.



Edna Marcela Ramirez Orozco
DIRECTORA DE NUEVAS CREACIONES

Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181

INFORME DE BÚSQUEDA
EXAMEN DE PATENTABILIDAD

Solicitud No.		Examen de patentabilidad							
NC2019/0008181		1°	X	2°		3°		Revoca	
Solicitud Internacional No.		Fecha solicitud internacional: (DD/MM/AÑO)							
PCT/US2018/012558		5 de enero de 2018							
Fecha de determinación estado de la técnica (DD/MM/AÑO)				Prioridad		Presentación			
05/01/2017				X					
Solicitante									
THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM									
Reivindicaciones que no son objeto de búsqueda por:									
Art. 14	29 a 36 y 80 a 83	Art. 15	-	Art. 20	54 y 76 a 78	Art. 25 (Falta de unidad de invención)		-	
CRITERIOS DE BÚSQUEDA									
Reivindicaciones objeto de búsqueda				1 a 28, 37 a 53, 55 a 75 y 79					
Palabras clave utilizadas				CRISPR CAS9, Duchenne muscular dystrophy, exon skipping, RNA guide, Multiplex CRISPR/Cas9, DMD, spCas9, exon 23, exon 51, dystrophin, triple guide sequences, triple sgRNA, 7sk promoter, H1 promoter, U6 promoter, sgRNA, SEQ ID NO: 60 a 761, 763 a 864 y 947.					
Clasificaciones utilizadas para la búsqueda				CIP:	C12N 15/113, C12N 15/864, C12N 9/22, A61P 21/00, A61P 21/04				
DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES (Documentos patente, Literatura no patente (LNP): Artículos, catálogos, etc.)									
Informes de búsqueda / Bases de datos consultadas	N° de solicitud de patente / N° de patente / Autor LNP ⁽¹⁾	Fecha de Publicación /Presentación (DD/MM/AAAA)	Reivindicaciones /Secuencias afectadas	Citas relevantes del estado de la técnica			Categoría del documento citado (2)		
LENS	WO2014025887A1	13/02/2014	23 a 26, 37, 38, 41, 53 y 56	Abstract, Reivs. 1 a 15, Tablas 7 y 8-			Y		
	US20150225717A1	12/08/2015							
	CA292995A1	26/09/2013	-	-			A		
	WO2014052855	02/04/2014							
	EP1716227A4	06/01/2010	-	-			A		
	US7510867B2	31/03/2009	-	-			A		
PATBASE	US20070083334A1	12/04/2007	-	-			A		
	US20150329609A1	19/11/2015	-	-			A		
	CA2959130A1	18/02/2016	-	-			A		
	US8349327B2	08/01/2013	-	-			A		
	US20160201089A1	14/07/2016	-	-			A		
	ES2593836T3	13/12/2016	-	-			A		
	US20120172415A1	05/07/2012	-	-			A		
	US20120149756A1	14/06/2012	-	-			A		
	US20140343266A1	20/11/2014	-	-			A		
	US20110263682A1	27/10/2011	-	-			A		
	US20080200409A1	21/08/2008	-	-			A		
	US20110301218A1	08/12/2011	-	-			A		
US20090269755A1	29/10/2009	-	-			A			

Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181

	US20140315862A1	23/10/2014	-	-	A
	US20110263682A1	27/10/2011	-	-	A
	US20060099616A1	11/05/2006	-	-	A
	US20030235845A1	25/12/2003	-	-	A
	US20140080896A1	20/03/2014	-	-	A
	US20100130591A1	27/05/2010	-	-	A
	US20040091918A1	13/05/2004	-	-	A
	US20160074535A1	17/03/2016	-	-	A
	US20050064489A1	24/03/2005	-	-	A
	US20060252153A1	09/11/2006	-	-	A
	US20090298909A1	03/12/2009	-	-	A
	US20130085139A1	04/04/2013	-	-	A
	US20130210902A1	15/08/2013	-	-	A
	US20160257952A1	08/09/2016	-	-	A
	US20160354487A1	08/12/2016	-	-	A
	US20150056705A1	26/02/2015	-	-	A
	US20070092866A1	26/04/2007	-	-	A
	US20160346359A1	01/12/2016	-	-	A
PUBMED	Long, C., <i>et al.</i>	05/09/2014	-	-	A
	Long, C., <i>et al.</i> (	22/01/2016	-	-	A
	Nelson, C. E., <i>et al.</i>	22/01/2016	-	-	A
	Tabebordbar, M., <i>et al.</i>	22/01/2016	-	-	A
	Wojtal, D., <i>et al.</i>	07/01/2016	-	-	A
	Xu, L., <i>et al.</i>	03/2016	-	-	A
	Young, C. S., <i>et al.</i>	07/04/2016	-	-	A
	Ghosh, A., <i>et al.</i>	11/2009	-	-	A
	Cox, D. B., <i>et al.</i> (2015).	02/2015	-	-	A
	Ousterout, D. G., <i>et al.</i>	18/02/2015	1 a 28, 37 a 53, 55 a 75 y 79	Abstract, Págs. 2 a 6. Sección – Results, Pág. 11, Sección – Plasmid construction, Figs. 1 a 4, Tabla 1, Tabla suplementaria 1.	Y
	Wood H.	10/03/2015	-	-	A
PUBMED/ SCIENCE DIRECT	Mizutani, T., <i>et al.</i>	18/09/2015	-	-	A
	Li, H. L., <i>et al.</i>	13/01/2015	-	-	A
GOOGLE	Mendell, J., <i>et al</i>	01/03/2016	-	-	A
	Bertero, A., <i>et al.</i>	01/12/2016	1 a 22, 37, 38, 41 a 53, 55 a 75 y 79	Págs. 4412 y 4413, sección - Development of an optimized inducible CRISPR/Cas9 knockout platform in hPSCs y Págs, 23 a 28 material suplementario sección – Molecular cloning, Figura 7D y 8S	Y
	Ni, W., <i>et al.</i>	15/03/2012	-	-	A
	Redman <i>et al.</i>	08/04/2016	-	-	A
GOOGLE/ PUBMED	VandenDriessche, T., & Chuah, M. K.	03/2016	-	-	A



Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181

	Tremblay, J. P., et al.	11/2016	-	-	A
	Strausberg, R. L., T., et al	24/12/2002	27, 28, 37 a 41, 53 y 56	Todo el documento	Y
	Krupovic , M., et al.(	19/05/2014	-	-	A
GOOGLE/ PUBMED/ SCIENCE DIRECT	Zhu, Z., et al.	2014	-	-	A
GOOGLE PATENTS	US9012139B2	21/04/2015	-	-	A
(¹) Cita completa literatura no patente (LNP) Apellido, A. A. (Fecha). Título del artículo. Nombre de la revista. Volumen(Número), pp-pp. O Apellido, A. A. (Fecha). Título del artículo. Nombre de la revista. Recuperado de http://xxxxxxx. Long, C., et al. (2014). Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. <i>Science (New York, N.Y.)</i>, 345(6201), 1184–1188. Long, C., et al. (2016). Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. <i>Science (New York, N.Y.)</i>, 351(6271), 400–403. Nelson, C. E., et al. (2016). In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. <i>Science (New York, N.Y.)</i>, 351(6271), 403–407. Tabebordbar, M., et al. (2016). In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. <i>Science (New York, N.Y.)</i>, 351(6271), 407–411. Wojtal, D., et al. (2016). Spell Checking Nature: Versatility of CRISPR/Cas9 for Developing Treatments for Inherited Disorders. <i>American journal of human genetics</i>, 98(1), 90–101. Xu, L., et al. (2016). CRISPR-mediated Genome Editing Restores Dystrophin Expression and Function in mdx Mice. <i>Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy</i>, 24(3), 564–569. Young, C. S., et al. (2016). A Single CRISPR-Cas9 Deletion Strategy that Targets the Majority of DMD Patients Restores Dystrophin Function in hiPSC-Derived Muscle Cells. <i>Cell stem cell</i>, 18(4), 533–540. Ghosh, A., et al. (2009). Systemic Trans-splicing adeno-associated viral delivery efficiently transduces the heart of adult mdx mouse, a model for duchenne muscular dystrophy. <i>Human gene therapy</i>, 20(11), 1319–1328. Cox, D. B., et al. (2015). Therapeutic genome editing: prospects and challenges. <i>Nature medicine</i>, 21(2), 121–131. Ousterout, D. G., et al. (2015). Multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for correction of dystrophin mutations that cause Duchenne muscular dystrophy. <i>Nature communications</i>, 6, 6244. Wood H. (2015). Neuromuscular disease: CRISPR/Cas9 gene-editing platform corrects mutations associated with Duchenne muscular dystrophy. <i>Nature reviews. Neurology</i>, 11(4), 184. Wood H. (2016). Neuromuscular disease: Genome editing shows promise in an in vivo model of Duchenne muscular dystrophy. <i>Nature reviews. Neurology</i>, 12(2), 63. Mizutani, T., et al. (2015). Transgene integration into the human AAVS1 locus enhances myosin II-dependent contractile force by reducing expression of myosin binding subunit 85. <i>Biochemical and biophysical research communications</i>, 465(2), 270–274. Mendell, J., et al. (2016). Duchenne muscular dystrophy: CRISPR/Cas9 treatment. <i>Cell Res</i> 26, 513–514 Bertero, A., et al. (2016). Optimized inducible shRNA and CRISPR/Cas9 platforms for in vitro studies of human development using hPSCs. <i>Development (Cambridge, England)</i>, 143(23), 4405–4418. VandenDriessche, T., & Chuah, M. K. (2016). CRISPR/Cas9 Flexes Its Muscles: In Vivo Somatic Gene Editing for Muscular Dystrophy. <i>Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy</i>, 24(3), 414–416. Tremblay, J. P., et al. (2016). Gene Editing for Duchenne Muscular Dystrophy Using the CRISPR/Cas9 Technology: The Importance of Fine-tuning the Approach. <i>Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy</i>, 24(11), 1888–1889. Zhu, Z., et al. (2014). The iCRISPR platform for rapid genome editing in human pluripotent stem cells. <i>Methods in enzymology</i>, 546, 215–250. Redman et al. (2016). What is CRISPR/Cas9?. <i>Arch Dis. Child Educ Pract Ed</i>, 101, 213–215 Strausberg, R. L., T., et al. (2002). Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. <i>Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America</i>, 99(26), 16899–16903.					



Oficio N° 8572 de 7 de junio de 2022

Ref. Expediente N° NC2019/0008181

	Ni, W., et al. (2012). Sheep 7SK promoter for short hairpin RNA expression. <i>Electronic Journal of Biotechnology</i>, 15(2), 10. Krupovic , M., et al.(2016). Casposons: a new superfamily of self-synthesizing DNA transposons at the origin of prokaryotic CRISPR-Cas immunity. <i>BMC Biology</i>, 12 :36. Li, H. L., et al. (2015). Precise correction of the dystrophin gene in duchenne muscular dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9. <i>Stem cell reports</i>, 4(1), 143–154.
(2) Categorías de documentos citados	
“A” Documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante. “E” Solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior. “L” Documento citado para llamar la atención sobre por ejemplo, dudas acerca de una reivindicación de prioridad o para determinar la fecha de publicación de otra cita, siempre van acompañados de una explicación, por la cual se citan. “O” Documento del tipo actas de conferencia, este tipo de documentos siempre estará acompañado por otra letra que indique la pertinencia del documento, por ejemplo, O,X, O,Y o bien O,A. “P” Documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	“T” Documento publicado en fecha posterior a la de presentación o la de prioridad de la solicitud internacional y no entra en conflicto con dicha solicitud, pero puede ser útil para la mejor comprensión del principio o teoría en que se basa la invención, o para demostrar que el razonamiento o los hechos en los que se basa dicha invención son incorrectos. “X” Documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado. “Y” Documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
Fecha del reporte de búsqueda: (22/05/2022)	